

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS

ORGANIZACION DEL NUCLEOLO Y DE LOS BIVALENTES
NUCLEOLARES DEL ESPERMATOCITO HUMANO DURANTE
EL PAQUITENO DE LA PROFASE MEIOTICA

MARIA SOLEDAD BERRIOS DEL SOLAR

- 1984 -



ORGANIZACION DEL NUCLEOLO Y DE LOS BIVALENTES
NUCLEOLARES DEL ESPERMATOCITO HUMANO DURANTE
EL PAQUITENO DE LA PROFASE MEIOTICA

Tesis

entregada a la

Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas

con mención en Biología Celular

por

MARIA SOLEDAD BERRIOS DEL SOLAR

Patrocinante de Tesis: Dr. Raúl Fernández-Donoso

1984



FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS Y FARMACEUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Post-Grado de la Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata

MARIA SOLEDAD BERRIOS DEL SOLAR

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito de Tesis para el Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular

Patrocinante de Tesis

.....
Dr. Raúl Fernández-Donoso

Comisión Informante de Tesis

.....
Dr. Juan Fernández Hidalgo

.....
Dr. Jorge Garrido Negri

.....
Dr. Luis Izquierdo Fernández

.....
Dr. Angel Spotorno Oyarzún



A mis padres



A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Raúl Fernández-Donoso por su paciencia, permanente estímulo y valiosa crítica en la realización de esta tesis.

A mis amigos y colegas de la Unidad de Citogenética, en especial a Juana Pincheira por su permanente apoyo y a Juan Oyarce por su generosa colaboración.

Al Dr. Eduardo Bustos y al Dr. A.F. Holstein por el material facilitado para la realización de parte de este trabajo.

A los colegas del Departamento de Biología Celular y Genética en especial a Patricia Iturra, Remigio López, Alejandro Guadarrama y Carlos Valenzuela.

A la Sra. Pilar Valenzuela y Srta. Julia Palma por la dedicada transcripción del manuscrito.

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por el proyecto B-517-8355 y B-1977-8413 del Departamento de Desarrollo de la Investigación, Universidad de Chile.



I N D I C E D E M A T E R I A S

| | PAG. |
|--|------|
| A. PAGINAS PRELIMINARES | |
| Página de título | i |
| Informe de aprobación | |
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Índice de Materias | iv |
| Lista de tablas | vii |
| Lista de figuras | viii |
| Abreviaturas | xiii |
| Resumen | xiv |
| Abstract | xvii |
| | |
| B. PAGINAS DE TEXTO | |
| INTRODUCCION | |
| 1. El Espermatozoido en Paquiteno y sus núcleolos | 1 |
| 2. Las Asociaciones entre cromosomas nucleolares | 6 |
| 3. Propósitos de la tesis | 16 |



INDICE DE MATERIAS (CONT.)

| | PAG. |
|--|------|
| MATERIALES Y METODOS | |
| 1. Obtención del material y selección de los Espermatocitos | 17 |
| 2. Fijación e inclusión del material | 20 |
| 3. Control del material | 22 |
| 4. Microscopía electrónica | 23 |
| 5. Microscopía de luz | 29 |
| 6. Esparcidos de Bivalentes | 30 |
| RESULTADOS | |
| 1. Espermatocitos humanos en Paquiteno | 33 |
| 2. Bivalentes Nucleolares y Dominios Nucleolares | 44 |
| 3. Nucléolos en las células germinales y en las células de Sertoli | 65 |
| 4. Asociaciones de Bivalentes en los Dominios Nucleolares | 78 |

INDICE DE MATERIAS (CONT.)

| | PAG. |
|---|------|
| DISCUSION | 101 |
| 1. Los Bivalentes Nucleolares humanos | 103 |
| 2. El Dominio Nucleolar y el nucléolo | 112 |
| 3. Asociaciones de los Bivalentes Nucleolares | 125 |
| CONCLUSIONES | 146 |
| BIBLIOGRAFIA | 149 |

L I S T A D E T A B L A S

| | PAG. |
|---|------|
| 1. Incidencia de anomalías cromosómicas en nacidos vivos y en abortos espontáneos. | 9 |
| 2. Tamaño y número de nucléolos por núcleo de Espermatoцитos en Paquitenos en las 5 muestras examinadas. | 59 |
| 3. Localización de Dominios Nucleolares y asociaciones de Bivalentes Nucleolares en 10 núcleos en Paquitenos, tomados al azar de un individuo, y reconstruidos completos. | 81 |

L I S T A D E F I G U R A S

| | PAG. |
|---|------|
| 1. Esquemas de los estados III y IV de la gametogénesis humana de acuerdo a Heller y Clermont (1964). | 41 |
| 2. Estados III y IV de la gametogénesis humana de material fijado en glutaraldehido e incluido en plástico. | 41 |
| 3. Diferenciaciones nucleares de los Espermatocitos humanos en Paquiteno. | 42 |
| 4. Diferenciaciones citoplasmáticas de los Espermatocitos humanos en Paquiteno. | 43 |
| 5. Esparcidos de núcleos de Espermatocitos en Paquiteno - Giemsa. | 47 |
| 6. Esparcidos de núcleos de Espermatocitos en Paquiteno - Plata. | 48 |

| | PAG. |
|--|------|
| 7. Espermatocitos en Paquitenio Medio, contrastados con Uranilo - Plomo y observados al microscopio electrónico. | 60 |
| 8. Serie del extremo nucleolar de un Bivalente D. | 61 |
| 9. Estructura fina del Dominio Nucleolar de Espermatocitos en Paquitenio. | 62 |
| 10. Espermatocitos en Paquitenio, tratados con la técnica de Bernhard. | 63 |
| 11. Dominios Nucleolares de Espermatocitos en Paquitenio, tratados con la técnica de Bernhard. | 64 |
| 12. Los nucléolos de las células germinales. | 72 |
| 13. El nucléolo de las células de Sertoli. | 73 |
| 14. Los nucléolos de los meiocitos en preleptoteno y Leptoteno. | 74 |

PAG.

15. Los Dominios Nucleolares de los Espermatocitos en Zigoteno-Paquiteno temprano. 75
16. Cambios en la organización del nucléolo en diferentes etapas de la profase meiótica de los Espermatocitos. 76
17. Organización del Bivalente y Dominio Nucleolar del Espermatocito en Paquiteno. 77
18. Asociaciones de Bivalentes en los Dominios Nucleolares, observaciones al microscopio de luz. 90
19. Asociación de dos Bivalentes Nucleolares, en un Dominio Nucleolar. 91
20. Asociación de dos Bivalentes Nucleolares, en un Dominio Nucleolar. 92
21. Asociación de dos Bivalentes Nucleolares, en un Dominio Nucleolar. 93

| | PAG. |
|---|------|
| 22. Asociación de tres Bivalentes Nucleolares, en un Dominio Nucleolar. | 94 |
| 23. Asociación de tres Bivalentes Nucleolares, en un Dominio Nucleolar. | 95 |
| 24. Asociación de cuatro Bivalentes Nucleolares, en un Dominio Nucleolar. | 96 |
| 25. Asociación entre el bivalente XY y un Bivalente Nucleolar, en la periferia nuclear o alejada de ellas. | 97 |
| 26. Asociación entre el bivalente XY y tres Bivalentes Nucleolares. | 98 |
| 27. Asociación entre el bivalente XY y dos Bivalentes Nucleolares sin inserción de los Telómeros 1 en la envoltura nuclear. | 99 |
| 28. Asociación entre bivalente XY y nucléolo. | 100 |

29. Equivalencia entre Bivalentes Nucleolares y cromosomas nucleolares mitóticos, con especial referencia al brazo p. 140
30. Esquema que ilustra un modelo integrado de los cambios en la organización del nucléolo y Dominio Nucleolar durante las etapas de la profase meiótica, observados en esta tesis. 141
31. Bivalentes Nucleolares y Dominios Nucleolares. 142
32. Dominios Nucleolares y asociaciones de Bivalentes. 143
33. Los telómeros 1 de los Bivalentes Nucleolares en Dominios Nucleolares simples o compuestos, y unidos al bivalente XY. 144
34. Reordenamientos entre cromosomas nucleolares D y G, del tipo translocaciones robertsonianas. 145

A B R E V I A T U R A S

- BK : Basal knob o cromatina condensada basal
- CC : Cromatina de Conexión
- CS : Complejo Sinaptonémico
- DNP : Desoxirribonucleoproteína
- en : Envoltura nuclear
- FC-NOR : Centro fibrilar de la región organizadora del nucléolo.
- f-Nu : Zona fibrilar del nucléolo
- g-Nu : Zona granular del nucléolo
- P : Espermatocono en Paquiteno de la profase meiótica
- rRNA : Acido ribonucleico ribosomal
- RNP : Ribonucleoproteína
- T₁ : Telómero uno o nucleolar
- T₂ : Telómero dos o no nucleolar

R E S U M E N

En esta Tesis se ha estudiado la estructura fina, la organización y la disposición espacial de los nucléolos y Bivalentes Nucleolares dentro del núcleo del Espermatozocito humano, mediante la observación de series de cortes al microscopio de luz y electrónico.

En el Espermatozocito en Paquiteno medio el nucléolo es generalmente único, de forma esférica, mide de 1 a 2 μm de diámetro, está compuesto principalmente de gránulos y está adherido a una masa de cromatina condensada la que a su vez está ampliamente unida a la envoltura nuclear.

La cromatina a la cual el nucléolo aparece unido corresponde a los brazos cortos de uno o más Bivalentes Nucleolares. En su interior se localiza parte del complejo sinaptonémico de el o los Bivalentes Nucleolares que se asocian. Su estructura fina revela que esta cromatina es heterogénea y que sus elementos constituyentes se corresponden en su ordenación con las bandas descritas para los brazos cortos de los cromosomas nucleolares mitóticos.

El nucléolo se une al brazo corto del Bivalente Nucleolar por medio del FC-NOR y la Cromatina de Conexión, en un punto próximo a la inserción del respectivo telómero en la envoltura nuclear. La unión específica del nucléolo al Bivalente Nucleolar determina su localización periférica en el núcleo del Espermatocito.

Al territorio nuclear formado por el nucléolo y las cromatinas comprometidas en su organización lo denominamos "Dominio Nucleolar". En cada Dominio Nucleolar se observa un solo nucléolo junto con la cromatina correspondiente a los brazos cortos de uno o más Bivalentes Nucleolares. Encontramos que en 4 de cada 10 Espermatocitos en Paquiteno, el Dominio Nucleolar está compuesto por más de un Bivalente. Los Bivalentes Nucleolares que a través de sus brazos cortos constituyen en asociación un Dominio Nucleolar, pueden ser dos, tres o cuatro y estar reunidos en combinaciones diferentes de Bivalentes D y G. En estas asociaciones de Bivalentes el nucléolo único está conectado con un solo FC-NOR.

Durante la profase meiótica la organización y estructura de los componentes del NOR y nucléolo varían, y dicha variación se correlaciona con la funcionalidad y regulación nucleolares.

El FC-NOR es compartido por los cromosomas homólogos presentes en un Dominio Nucleolar simple, o puede ser compartido por los Bivalentes que se asocian en un Dominio Nucleolar compuesto. Por ello se estima que constituye uno de los sectores de mayor riesgo para la ocurrencia de anomalías de disyunción cromosómicas.

Por otra parte, la falta de apareamiento en el extremo nucleolar observada en asociaciones de varios Bivalentes Nucleolares es considerada como una situación que genera inestabilidad, de la cual podrían derivar reordenamientos estructurales entre cromosomas heterólogos como translocaciones del tipo Robertsoniano.

A B S T R A C T

In the course of this Thesis, the fine structure, organization and spatial arrangement of nucleoli and Nucleolar Bivalents have been studied by means of light and electron microscope observations of complete series of consecutive thin sections.

In mid-Pachynema spermatocytes, the nucleolus is usually single, spherical and 1-2 μm diameter. It is mainly composed by granules and attached to a mass of dense chromatin largely associated to the nuclear envelope.

Nucleolus attached chromatin corresponds to the short arms of one or more Nucleolar Bivalents. Inside of it, part of the synaptonemal complex (or complexes) of the concurring Nucleolar Bivalents is found. The fine structure of this chromatin is heterogeneous and its components are arranged following an order which corresponds to that of the short arm bands of the mitotic nucleolar chromosomes.

The nucleolus is attached to the short arm of the Nucleolar Bivalent by means of the FC-NOR and the Connection Chromatin, near the insertion of the respective telomere to the nuclear envelope. The specific attachment of the nucleolus to the Nucleolar Bivalent determines its peripheral location in the Spermatocyte nucleus.

We have named Nucleolar Domain the nuclear region where the nucleolus and the chromatin involved in organizing it are found. Every Nucleolar Domain shows only one nucleolus and the short arm chromatin from one or more Nucleolar Bivalents. We found that 4 out of 10 Pachynema Spermatocytes had a Nucleolar Domain composed by more than one Bivalent. In this case, there may be two, three or four Nucleolar Bivalents in different combinations of D and G Bivalents, which through the association of their short arms constitute a single Nucleolar Domain. In these Bivalent associations, the nucleolus is associated to one FC-NOR only.

The organization and structure of the NOR and nucleolus components change along the meiotic prophase. These changes seem to be related to the nucleolus function and regulation.

The FC-NOR is shared by the homologous chromosomes of a single Nucleolar Domain or may be shared by the associated Bivalents of a complex Nucleolar Domain. That is why the FC-NOR is considered one of the riskiest regions regarding the incidence of chromosomes disjunction anomalies.

Moreover, the lack of pairing in the nucleolar end which has been observed in associations of several Nucleolar Bivalents, is regarded as a source of instability which may enhance structural rearrangements between heterologous chromosomes, such as Robertsonian translocations.

I N T R O D U C C I O N

1. EL ESPERMATOCITO EN PAQUITENO Y SUS NUCLEOLOS

Durante el Paquiteno de la profase meiótica, los cromosomas están unidos por sus telómeros a la envoltura nuclear y los cromosomas homólogos se encuentran apareados entre sí en toda su longitud mediante el Complejo Sinaptonémico (Wettstein and Sotelo, 1967; Moses, 1968; Gillies, 1973; Rasmussen and Holm, 1978, 1980).

El Complejo Sinaptonémico estabiliza el apareamiento cromosómico y está constituido por dos ejes de proteínas y RNP de recorrido paralelo, designados como "laterales". Cada uno pertenece a un cromosoma homólogo. Entre ambos laterales se encuentra una estructura de un grosor aproximado de 200 nm, en el interior de la cual se destaca un elemento central de espesor y periodicidad variables designado como "medial" (Moens, 1969, 1978; Esponda and Stockert, 1971; Westergaard and von Wettstein, 1972).

La cromatina de cada cromosoma se encuentra duplicada y ordenada en asas alrededor del respectivo lateral. Su condensación es semejante a la de la cromatina de la interfase somática y el orden existente en la cromatina dispuesta en torno a un lateral, es el mismo que el encontrado en el lateral del correspondiente homólogo apareado. Al mismo tiempo, existe una secuencia de tipos de cromatina (telomérica, intercalar, centromérica, organizadora del nucléolo, etc.) a lo largo del bivalente, que es equivalente a la secuencia que se observa en los mismos cromosomas durante la metafase somática (Fernández-Donoso et al., 1979; Fernández-Donoso, 1982a y b).

Por otra parte, la cromatina durante la profase meiótica es funcionalmente activa en cuanto a síntesis de RNA. Este fenómeno ha sido claramente demostrado mediante experimentos de incorporación de uridina radioactiva en núcleos profásicos (Monesi, 1965; Kierszenbaum and Tres, 1974; Tres, 1975; Monesi et al., 1978). Durante este período existe una activa síntesis de RNA ribosomal, fenómeno que es además evidente por la aparición de nucléolos.

Los nucléolos de la profase meiótica han sido descritos en diversas especies animales y vegetales y se caracterizan por estar unidos al Bivalente Nucleolar que les da origen, y en particular a la región organizadora del nucléolo (NOR) a través del Centro Fibrilar (Goessens, 1974; Jordan and Luck, 1976; Goessens and Le-point, 1979; Fernández-Donoso et al., 1979). Esta relación estructural se mantiene con pocas variaciones durante la profase meiótica. Ella resulta más evidente hacia el estado de Paquiteno avanzado por cuanto en este estado culmina la segregación nucleolar, fenómeno que por su naturaleza facilita la individualización de la cromatina y material nucleolar participantes en esta región (Fernández-Donoso et al., 1979; Mirre et al., 1980). Por estas razones, el nucléolo constituye un excelente marcador para la identificación de los Bivalentes Nucleolares, así como también, para el estudio funcional y morfológico de las regiones cromosómicas que le dan origen durante la profase de la meiosis.

Si se conoce el número, morfología y distribución longitudinal de la cromatina, de los cromosomas nucleolares de una especie, se puede utilizar a los Bivalentes Nucleolares y sus nucléolos como marcadores

para el estudio de la organización del núcleo meiótico respectivo. En efecto, en el Paquiteno de la meiosis el Complejo Sinaptonémico de cada bivalente describe un arco dentro del núcleo debido a la inserción de sus extremos en la envoltura nuclear. Este fenómeno compromete a toda la cromatina ordenada en torno al Complejo Sinaptonémico del bivalente, la cual queda entonces distribuida en un espacio limitado dentro del núcleo. En los Bivalentes Nucleolares esta situación determina que la cromatina del NOR, el Centro Fibrilar y el Nucléolo queden localizados en una posición relativamente fija en el ámbito del núcleo de los meiocitos (Fernández-Donoso et al., 1979). Es así como en los espermatocitos de varias especies animales estudiadas por nosotros hemos podido predecir y explicar: el número de nucléolos presentes, la posición que ellos ocupan dentro del núcleo y las relaciones que dichos Bivalentes tienen con otros sectores o dominios nucleares (Fernández-Donoso et al., 1979; Berríos y col., 1980; Fernández-Donoso, 1982b).

El Espermatocito humano en Paquiteno y sus Bivalentes Nucleolares, constituyen un muy buen modelo para el estudio de la organización nuclear en el sentido que hemos señalado. Ello se debe al elevado número y a

las características de organización y estructura de los cromosomas nucleolares de la especie humana. Se ha demostrado que en el hombre son 10 los cromosomas que poseen los cistrones con la información para la síntesis del RNA ribosomal (Henderson et al., 1972). También se ha demostrado que todos estos cromosomas son subtelocéntricos y que la región organizadora del nucléolo queda en el brazo corto de todos ellos (ISCN, 1978). Cabe esperar entonces: a) que en la profase meiótica haya 5 Bivalentes Nucleolares, b) que los nucléolos aparezcan en relación con uno de los extremos de estos Bivalentes, y c) que en los núcleos tales nucléolos se sitúen muy próximos a la envoltura nuclear.

Considerando estos antecedentes, es nuestro propósito identificar en forma inequívoca y describir la organización de los Bivalentes Nucleolares humanos y de sus nucléolos dependientes durante el período de Paquiteno. Asimismo, pretendemos caracterizar la microanatomía de las regiones organizadoras del nucléolo y su disposición dentro del espacio nuclear del meiocito.

2. LAS ASOCIACIONES ENTRE CROMOSOMAS NUCLEOLARES

En el cariotipo humano, a los 10 cromosomas nucleolares se les ha ordenado de acuerdo a su tamaño y morfología en los grupos D (pares 13, 14 y 15) y G (pares 21 y 22) (ISCN, 1978). Estos cromosomas nucleolares se encuentran entre los más pequeños del cariotipo, son los únicos de tipo subtelocéntrico y todos son portadores de constricciones secundarias organizadoras de nucléolo en sus brazos cortos (p). Estas regiones no siempre son reconocibles al microscopio de luz debido a la escasa longitud de los brazos cromosómicos p. Sin embargo, mediante hibridación "in situ" se ha demostrado que todas ellas contienen los cistrones ribosomales (Henderson et al., 1972).

En las placas con cromosomas metafásicos humanos en dispersión, a los cromosomas nucleolares se les identifica sin dificultad debido a su tamaño y características morfológicas, así como también debido a que aparecen muy próximos entre sí o asociados (Ferguson-Smith and Handmaker, 1961, 1963). En estas asociaciones se observa una estrecha proximidad entre las constricciones secundarias (NORs) de los cromosomas y en algunos

casos finos filamentos que las conectan. Estos filamentos, apenas visibles al microscopio de luz, se hibridan con (^3H)rRNA 18S y 28S (Henderson et al., 1973) y se tiñen con la plata amoniacal. Esta técnica identifica a proteínas participantes en la síntesis nucleolar (Goodpasture and Bloom, 1975; Miller, O.J. et al., 1976; Denton et al., 1976; Miller, D.A. et al., 1977). Estos últimos resultados apoyan la naturaleza cromatínica de los elementos responsables de estas asociaciones, al mismo tiempo que apoyan la hipótesis de que tales asociaciones metafásicas son un remanente de la actividad nucleolar conjunta, presentada por los mismos cromosomas durante la interfase.

Numerosos trabajos han abordado el fenómeno de la asociación nucleolar mediante el estudio de las distribuciones de los cromosomas nucleolares en las placas metafásicas (Cohen and Shaw, 1967; Cooke, 1972; Bobrow and Heritage, 1980). Estos trabajos señalan que éste es un fenómeno de gran complejidad, que se manifiesta con cierta variación en diferentes individuos, que compromete a cromosomas nucleolares D y G y que no es al azar.

El conocimiento acerca de cómo estos cromosomas se relacionan entre sí adquiere especial significación en la especie humana, debido a que los cromosomas nucleolares se ven frecuentemente comprometidos en alteraciones cromosómicas tales como translocaciones robertsonianas o aquellas provocadas por no disyunciones (Ohno et al., 1961; Henderson et al., 1973; Hsu et al., 1975).

Respecto de este problema, las anomalías de los cromosomas D y G constituyen más del 36% del total de las anomalías cromosómicas detectadas en los nacidos vivos (Hamerton et al., 1975). Esta incidencia es notable también en los abortos espontáneos en los cuales solamente las trisomías D o G alcanzan cerca de un 24% del total de las anomalías cromosómicas. Las que tienen un valor global muy superior en los abortos espontáneos (Chandley, 1979; Hassold et al., 1980). Para mayores detalles ver Tabla 1.

T A B L A 1
 INCIDENCIA DE ANOMALIAS CROMOSOMICAS EN
 EN 46.150 NACIDOS VIVOS

| | N° Total | Frecuencia |
|---|----------|----------------------|
| Anomalías cromosómicas | 258 | $5.59 \cdot 10^{-3}$ |
| Anomalías cromosómicas D y G | 94 | $2.03 \cdot 10^{-3}$ |
| Porcentaje DG de las anomalías cromosómicas totales | 36,43% | |

(Tabla basada en datos de Hamerton et al., 1975).

INCIDENCIA DE ANOMALIAS CROMOSOMICAS EN
 2.498 ABORTOS ESPONTANEOS

| | N° Total | Frecuencia |
|---|----------|------------|
| Anomalías cromosómicas | 1384 | 0.55 |
| Trisomías D o G | 331 | 0.13 |
| Porcentaje trisomías D o G sobre las anomalías cromosómicas totales | 23,92% | |

(Tabla basada en datos de Chandley, 1979 y Hassold et al., 1980).

Considerando ambas situaciones, los estudios cromosómicos realizados en nacidos vivos y en abortos espontáneos, parece claro que las anomalías de los cromosomas nucleolares tienen alta incidencia entre las anomalías cromosómicas totales no sólo porque son más viables que otras sino porque ocurren con gran frecuencia.

La proximidad cromosómica sería una de las condiciones necesarias para que en determinadas circunstancias funcionales y/o estructurales se produzcan reordenamientos cromosómicos (Fernández-Donoso, 1982b). En el núcleo humano existen condiciones especiales para poner a prueba esta hipótesis, debido al alto número de cromosomas nucleolares que posee, a la gran frecuencia de asociaciones detectadas y a las características de las no disyunciones y translocaciones DG supuestamente derivadas de estas asociaciones (Berríos, Proyecto de Tesis, 1981).

De la evaluación de los antecedentes que hemos presentado, surge la evidente necesidad que el fenómeno de asociación nucleolar sea estudiado en las células germinales. En efecto, basándose en estudios

de asociaciones nucleolares mitóticas, numerosos autores han propuesto que un fenómeno similar debería ser el desencadenante de las aberraciones cromosómicas de origen meiótico.

A este respecto se ha establecido que las madres de edades más avanzadas tienen mayor probabilidad de tener hijos con trisomía 21. Se presume que ello dependería del largo período profásico en el que permanecen los ovocitos con sus nucléolos presentes, situación que afectaría la posterior disyunción normal de los cromosomas nucleolares N° 21 (Evans, 1967; Giraud et al., 1975; del Mazo et al., 1983).

La duración de la profase del espermatocito humano es de 22 días y por lo tanto breve (Heller and Clermont, 1964), comparada con los 14 a 44 años que dura la profase del ovocito (Baker, 1963; Mauleón, 1968). Se ha demostrado que en las trisomías 21, a que hacíamos referencia, el cromosoma 21 extra es en el 20% de los casos de origen paterno (Mattei et al., 1979). Esto lleva a suponer que el fenómeno de disyunción cromosómica anormal se podría presentar en el espermatocito en una forma y cuantía semejantes a las descritas para el

ovocito. Especialmente teniendo en cuenta que en la línea germinal y gametos masculinos podría repercutir en forma drástica la selección celular, fenómeno que minimizaría la incidencia de alteraciones cromosómicas de origen paterno presentes en el cigoto.

En las células germinales humanas y de otras especies de mamíferos estudiadas, la síntesis de RNA ribosomal y el desarrollo de nucléolos ocurre normalmente durante la profase de la meiosis (Monesi, 1965; Oakberg, 1968; Kierszenbaun and Tres, 1974; Monesi et al., 1978; Hofgartner et al., 1979). Durante las metafases meióticas no existe síntesis de rRNA. Posteriormente, y sólo en los inicios de la diferenciación de las espermátidas de algunos mamíferos, se ha detectado una breve y significativa síntesis de rRNA y aparición de nucléolos (Krimer and Esponda, 1979; Hofgartner et al., 1979; Fernández-Donoso and Berríos, 1980).

Estudios al microscopio de luz de dispersiones nucleares de espermátocitos humanos en profase, han demostrado la presencia de nucléolos que aparecen unidos a ciertos bivalentes. Además se ha observado que dos o más Bivalentes Nucleolares pueden aparecer asociados en-

tre sí o en torno a un nucléolo (Hungerford 1971a; Bordjadze et al., 1971; Berríos, 1983).

Estas observaciones nos muestran que en el espermatocito en profase meiótica también ocurren asociaciones entre Bivalentes Nucleolares. Por otra parte, se confirma también que la asociación cromosómica nucleolar, en este caso entre bivalentes, ocurre en relación a la síntesis de nucléolo, puesto que podemos observar directamente que los Bivalentes y sus nucléolos se presentan simultáneamente.

Considerando estos antecedentes, es nuestro interés estudiar dentro del núcleo del espermatocito en profase meiótica, el carácter de las asociaciones entre los Bivalentes Nucleolares.

La organización nucleolar en la meiosis humana ha sido estudiada en detalle en ovocitos humanos. En dichos trabajos se ha considerado que la estrecha asociación observada entre Bivalentes Nucleolares, es especialmente riesgosa para el surgimiento de aberraciones, debido a la larga duración del estado de dictioteno en el cual tal asociación se mantendría (Evans, 1967; Gi-

raud et al., 1975; del Mazo et al., 1983; Mirre et al., 1980).

Los estudios ultraestructurales de núcleos de espermatoцитos humanos en profase meiótica son escasos y generalmente han perseguido otros propósitos. Mediante reconstrucción tridimensional, se han descrito los complejos sinaptonémicos de todos los bivalentes en paquitenio, sus longitudes relativas, la presencia de nódulos de recombinación, la aparición de "interlockings", etc. (Holm and Rasmussen, 1977a y b; Rasmussen and Holm, 1978, 1980; Berthelsen, 1980). También se ha caracterizado a los ejes de los cromosomas sexuales X e Y y la manera como éstos se aparean (Solari and Tres, 1967, 1970). Recientemente, se ha incorporado además al estudio de los bivalentes humanos la técnica de microesparcidos (Solari, 1982), la cual ha permitido componer el cariotipo meiótico completo del hombre con muy buena resolución. En estos trabajos, no se ha abordado el problema de la organización de los Bivalentes Nucleolares y nucléolos con la orientación que aquí proponemos. Solamente en Octubre de 1983, cuando esta tesis estaba en redacción, ha aparecido una publicación (Stahl et al., 1983) en la que el análisis que se realiza es parcial-

mente coincidente con nuestros resultados y proposiciones (Berríos y col., 1980; Berríos, Proyecto de Tesis, 1981; Berríos y Fernández-Donoso, 1981; Berríos, 1983).

En resumen, las asociaciones entre cromosomas nucleolares han sido propuestas como inductoras de los fenómenos de no disyunción y de translocaciones de tipo Robertsoniano de los cromosomas D y G. Estas proposiciones se han basado fundamentalmente en observaciones al microscopio de luz de esparcidos de metafases somáticas y de núcleos meióticos, así como también se han basado en estudios epidemiológicos estadísticos y familiares de aberraciones cromosómicas DG. Al evaluar estas hipótesis resulta evidente que es necesario estudiar en detalle a las asociaciones y en condiciones en que no se disperse a los cromosomas que así están unidos.

En este trabajo no se pretende resolver el mecanismo de generación de las aberraciones, sino que caracterizar cuáles elementos y en qué forma participan en una asociación, que debe generalmente culminar en una disyunción y segregación normales. Dicha caracterización permitirá al mismo tiempo inferir las fallas que pudieren surgir en la resolución de las asociaciones y comprender mejor su derivación hacia una disyunción o segregación anormales.

3. PROPOSITOS DE LA TESIS

Consecuentemente con lo desarrollado en 1. y 2., los propósitos específicos de esta tesis han sido¹¹¹:

1. Identificar y describir la organización de los Bivalentes Nucleolares humanos y sus nucléolos dependientes en el Espermatocono en Paquiteno.
2. Caracterizar la estructura fina de los dominios cromosómicos comprometidos en la organización del nucléolo y su disposición dentro del núcleo.
3. Analizar las asociaciones interbivalentes y discutir los posibles mecanismos a través de los cuales estas asociaciones podrían culminar en:
 - a) Una disyunción y segregación normales.
 - b) Una disyunción y/o segregación anormales.
 - c) Cambios cromosómicos de tipo Robertsoniano.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

1. OBTENCION DEL MATERIAL Y SELECCION DE LOS ESPERMATOCITOS

Se utilizó tejido testicular humano proveniente de 5 individuos adultos normales. Este material fue seleccionado de biopsias cuyos diagnósticos determinaron normalidad en la línea germinal de los individuos. Las muestras respectivas fueron cedidas por la Unidad de Reproducción del Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y por el Departamento de Anatomía Microscópica, Universidad de Hamburgo, Alemania.

Para el desarrollo global del trabajo propuesto se requirió que el tratamiento técnico empleado, conservara al máximo las características estructurales y de relación de los espermatoцитos. Por lo tanto se utilizaron de preferencia técnicas que aseguraran óptimos resultados de conservación, al mismo tiempo que mínimos riesgos de pérdida, considerando que se trata de material humano normal.

Como técnicas complementarias se utilizó la disrupción celular con soluciones hipotónicas con la finalidad de obtener la dispersión de bivalentes meióticos. Estas técnicas no están diseñadas para estudiar las relaciones interbivalentes, aunque controlando el tiempo de acción de la hipotonía es posible recuperar algunos núcleos en los cuales los bivalentes conservan sus relaciones. En estos términos es posible reconocer y estudiar Bivalentes Nucleolares D o G y su relación con los nucléolos.

En la espermatogénesis humana se han descrito VI estados (Clermont, 1963; Heller and Clermont, 1964). Cada estado corresponde a una agrupación típica de generaciones de células germinales. Este hecho hace posible que mediante la identificación del estado de la espermatogénesis se pueda conocer también el estado de la profase meiótica en el cual se encuentra el espermatocito a estudiar.

Los VI estados de la gametogénesis humana y los estados profásicos meióticos (Leptoteno, Zigoteno,

Paquiteno y Diploteno) correspondientes, de acuerdo a Heller y Clermont (1964) son los siguientes:

| Estados de la gametogénesis | Estados de la profase meiótica | |
|-----------------------------|--------------------------------|-------------------|
| IV | Leptoteno | Paquiteno medio* |
| V | Leptoteno | Paquiteno tardío* |
| VI | Zigoteno | Diploteno |
| I | Paquiteno temprano* | Diploteno |
| II | Paquiteno temprano* | Diploteno |
| III | Paquiteno medio* | |

* El estado de Paquiteno se ha subdividido en Paquiteno temprano, medio y tardío para lo cual se ha tomado en cuenta la duración relativa de cada estado de la gametogénesis.

Se seleccionaron para el estudio los Espermatocitos en Paquiteno medio, los cuales se encuentran en los estados III y IV del ciclo seminífero humano de Heller y Clermont (1964).

2. FIJACION E INCLUSION DEL MATERIAL

Pequeños trozos de tejido testicular fueron tratados según se detalla a continuación:

1. Se fijó en glutaraldehído recién preparado al 3,5% en buffer fosfato 0.1 M pH 7.2, sobre una placa de Petri cubierta con cera dental sólida, durante 15 minutos y a temperatura ambiente.
2. Se seccionó el material sobre la cera, obteniéndose en total 3 trozos de aproximadamente 1 mm^3 , los cuales fueron transferidos a un frasco con fijador fresco hasta completar las 2 horas de fijación a temperatura ambiente.
3. Se lavó en 4 a 5 cambios de buffer fosfato 0.1 M pH 7.2, siendo cada uno de ellos de aproximadamente 15 minutos.
4. Se postfijó en OsO_4 al 1% en buffer fosfato 0.1 M pH 7.2 durante 1 hora y a temperatura ambiente.
5. Se lavó nuevamente en 3 - 4 cambios, cada uno de 15 minutos, en el mismo buffer fosfato.

6. Se deshidrató el tejido en varios cambios de alcoholes ascendentes, cada uno de aproximadamente 15 minutos y en las gradaciones 25°, 50°, 70° y 100°.
7. Se continuó la deshidratación con 3 cambios cada uno de 15 minutos en acetona 100%.
8. Se infiltró el tejido utilizando mezclas de acetona plástica en concentraciones ascendentes del plástico 25%, 50%, 75% y 100%. En cada una de estas concentraciones de plástico las muestras estuvieron aproximadamente 30 minutos.
9. Se infiltró a temperatura ambiente, cuidando que el ambiente fuese seco pues los plásticos se hidratan con facilidad. La última infiltración es en plástico 100% por 5 horas.
10. Se incluyó en el mismo plástico en que se infiltró: Durcupan ACM (araldita), SPURR o Epon 812. Se colocó el plástico de inclusión en pequeños moldes de silicona en los que se puso los trocitos de material y alguna denominación para señalar su procedencia.

11. Se dejó polimerizar el plástico en un horno a 37°C por 24 horas y a 60°C por 48 horas más.
12. La dureza del bloque se utilizó como índice de una adecuada polimerización.

3. CONTROL DEL MATERIAL

En cada bloque de plástico se talló con hoja de afeitar una pirámide trunca de base ancha, cuya cara superior tenía una amplitud suficiente como para contener los túbulos seminíferos que se apreciaban en la inclusión.

Sobre esta superficie se realizaron cortes semifinos de aproximadamente 1 μ m, con ultramicrotomo Sorvall MT2b.

Los cortes semifinos se colocaron sobre un portaobjetos y se adhirieron a él por calentamiento. Se tiñeron posteriormente con una solución de azul de toluidina al 1% en tetraborato de sodio al 1%. Para teñir los cortes se coloca un volumen de esta solución que cu-

bra el área en que quedaron adheridos. Posteriormente las preparaciones fueron calentadas en una platina térmica o por flameo durante 3 minutos. Se dejó luego escurrir el colorante con agua corriente. Se secó por calor. El uso de cubreobjetos era optativo.

4. MICROSCOPIA ELECTRONICA

4.1. Series de cortes

Los sectores de material seleccionados y diagnosticados se tallaron para lograr una superficie total más pequeña y al mismo tiempo ajustada al sector de material escogido. Es importante que el tallado tuviese sólo dos lados paralelos con el fin de lograr por una parte, la unión de los cortes sucesivos y por otra un indicador de la dirección de los cortes.

Los cortes en serie tienen un espesor de 80 a 100 nm. Se recogen en rejillas de cobre con una apertura única alargada, cuyas medidas son 1 y 2 mm de ancho y largo respectivamente.

La rejilla que contiene los cortes suspendidos en agua, se deposita sobre un bastidor de cobre con perforaciones cubiertas con una película de formvar. Cada bastidor contiene 15 perforaciones, siendo cada una de éstas de mayor tamaño que una rejilla. Se debe señalar aquí el orden de las rejillas para mantener la secuencia en la serie total. La película de formvar que cubre los bastidores se realizó a partir de una solución de formvar en cloroformo al 0.35%.

Una vez seco el dispositivo, se recoge la rejilla que ahora tiene incorporado el film de formvar. Se recorta el formvar de su contorno con las puntas de una pinza fina. Se recoge la rejilla con cuidado y se deposita en la caja correspondiente, anotando las coordenadas que la identifican.

4.2. Cortes al azar

Los cortes de 50 a 70 nm se recogen en rejillas de cobre con una trama de 200 "mesh". Color de interferencia gris-plateado. Se tiñen por flotación en soluciones de acetato de uranilo y citrato

de plomo según se detalla a continuación.

4.3. Tinción de los Cortes

Se utilizó la tinción de Reynolds (1963).

Las rejillas se hacen flotar sobre las soluciones de acetato de uranilo saturada (2%) por 10 minutos y de citrato de plomo por 6 minutos. En ambos casos se colocó pequeñas gotas de estas soluciones sobre cera dental sólida, sobre las que se hizo flotar las rejillas.

En el teñido de series, debe cuidarse el orden de las rejillas como también su secado, puesto que es fácil que se rompa la película de formvar que cubre su única perforación y se pierda el material con interrupción de la serie.

4.4. Tinciones Citoquímicas

Como complemento a la caracterización morfológica se utilizó la técnica citoquímica de Bernhard (Bernhard, 1969). Es una tinción regresiva

para ribonucleoproteínas. Se utiliza material fijado en glutaraldehído, sin postfijación e incluido en Epon.

Procedimiento:

1. Las rejillas cubiertas con formvar y con secciones de aproximadamente 100 nm de espesor, se hacen flotar en una gota de acetato de uranilo acuoso 5%, por dos minutos y en la oscuridad. Se lava con agua destilada.
2. Las rejillas se hacen flotar en gotas de una solución de EDTA preparada según la técnica de Bernhard (1969). Se utilizaron tiempos entre 30 y 40 minutos siendo el más adecuado aproximadamente 35 minutos.
Se lavan con agua destilada.
3. Las rejillas se colocan en la solución de citrato de plomo de Reynolds por 5 minutos.
Se lavan en agua destilada y se secan.

Este método se basa esencialmente en la capacidad del EDTA de diferenciar la tinción de uranilo, destiñendo preferencialmente las desoxirribonucleoproteínas (DNP). Se desconoce el mecanismo por el cual en presencia del agente quelante EDTA, las RNP retienen el acetato de uranilo y las DNP no (Hayat, 1975). Es probable que un factor crítico sea la menor afinidad de las DNP por el acetato de uranilo.

4.5. Estimación tridimensional de series

El material seleccionado se observó y fotografió en un microscopio electrónico Phillips 300 y en un microscopio Zeiss 109. En el microscopio Zeiss se fotografió con película Agfa-ortho de 35 y 60 mm (con cargas de 48 y 8 exposiciones respectivamente).

Las fotografías numeradas y ordenadas en la secuencia correspondiente a la serie, se reproducen en grupos sobre una lámina transparente con el objeto de componer tridimensionalmente las estructuras y sus relaciones.

Se utiliza aquella sección en que el núcleo aparece de mayor diámetro como referencia para dibujar la circunferencia de la envoltura nuclear, y dentro de ella, se representan en forma esquemática los Complejos Sinaptonémicos y las estructuras relacionadas de las cuales interesa conocer su distribución, tales como: centrómeros, telómeros, nucléolos, etc.

Las dimensiones de una estructura se estiman de acuerdo al número de cortes secuenciales en los que la estructura está presente y al espesor de dichos cortes. La longitud total del Complejo Sinaptonémico correspondiente a un bivalente, se estima según su recorrido respecto al plano de la sección. Si el Complejo Sinaptonémico aparece paralelo al plano de la sección se calcula su longitud por triangulación; en cambio si su recorrido es perpendicular al plano de la sección, se estima la longitud allí comprometida, de acuerdo al espesor del corte (Sotelo and Wettstein, 1966).

5. MICROSCOPIA DE LUZ

5.1. Series de cortes

Se realizaron series de cortes de 8 nm de espesor. Se depositó ordenadamente cada uno de los cortes obtenidos sobre un portaobjetos limpio que contenía una secuencia de gotitas de agua. Posteriormente los cortes se adhirieron por calentamiento al portaobjetos.

Los cortes se tiñeron según se indicó en 3., con azul de toluidina 1% en tetraborato de sodio 1%. Se lavaron con agua corriente, se secaron y posteriormente se cubrieron con resina sintética neutra y cubreobjetos.

5.2. Reconstrucción de los Espermatocitos

Se observó y fotografió al microscopio de luz el mismo sector de túbulo seminífero, en los diferentes cortes. Posteriormente se trabajó con las fotografías. Sobre ellas, se siguieron los diferentes Espermatocitos previamente marcados para facilitar su reconocimiento.

En las series se analizó la Morfología general de los Espermatocitos y el número y posición en el núcleo de: nucléolos, Bivalentes Nucleolares y bivalentes XY. Doce núcleos en Paquiteno de cada muestra, en total 60, fueron observados y fotografiados secuencialmente (Tabla 2 de Resultados).

6. ESPARCIDOS DE BIVALENTES

6.1. Obtención de los esparcidos

Se preparó una suspensión celular homogénea por disgregación mecánica del tejido testicular en solución salina de Hank. Se centrifugó luego a 800 r.p.m. (100 g) por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en una solución hipotónica de KCl 0.075 M con heparina (20.000 U/I) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

Se centrifugó nuevamente a 800 r.p.m. (100 g) por 10 minutos, descartándose el sobrenadante. Se fijó el pellet en una solución de metanol ácido acético 3:1 durante 10-15 minutos a temperatura ambien

te. Se agitó la suspensión dejándose otros 15 minutos en reposo, para luego cambiar dos veces el fijador. Se controló la fijación y concentración del material al microscopio de luz. Se hizo caer una gota de la suspensión sobre un portaobjetos limpio y se dejó secar al aire.

6.2. Tinción

- Giemsa: Se tiñó con una solución de Giemsa 10%. Se lavaron las preparaciones con agua destilada, se secaron al aire y se cubrieron con resina sintética y cubreobjetos.

- Plata amoniaca (AgAs-NOR): Algunas de éstas preparaciones se trataron según la técnica de Goodpasture and Bloom (1975) que identifica organizadores nucleolares y específicamente proteínas asociadas a la síntesis nucleolar (Hubbel et al., 1979). Se cubre el portaobjetos con una solución de Nitrato de plata 50%, la cual se incuba durante 10 minutos bajo una ampollita de 200 a 250 Watts y a 25 cm de distancia. Se retira el cubreobjetos y la preparación se sumerge en agua

destilada. Se deja caer sobre el portaobjetos 4 gotas de la solución de plata amoniacal (4 grs de AgNO_3 , 5 cc de agua desmineralizada y 5 cc de hidróxido de amonio concentrado) y 4 gotas de formalina 3%. Se coloca cubreobjetos, y absorbe con papel filtro el exceso de líquido. Se controla la tinción al microscopio de contrastes de fase, siendo el tiempo aproximado de 2 a 4 minutos. Para desprender el cubreobjetos se sumerge la preparación en agua destilada y posteriormente se deshidrata en una serie de etanoles 70°, 95° y 100° y se cubren con resina sintética y cubreobjetos.

R E S U L T A D O S

1. ESPERMATOCITOS HUMANOS EN PAQUITENO

1.1. Definición del Estado del Epitelio Germinal

Los Espermatoцитos en Paquiteno medio de la profase meiótica están presentes en las asociaciones celulares de los Estados III y IV del epitelio seminífero humano. De acuerdo a la descripción de Heller y Clermont (1964), las células del epitelio germinal presentes en tales Estados desde la pared tubular hasta el lumen son las siguientes (Figs. 1a y b):

- a) Espermatoгонias oscuras y pálidas (A), llamadas así por estos autores debido a la diferente afinidad tintorial que presentan sus núcleos por los colorantes nucleares. Las espermatoгонias tienen una localización basal, sus núcleos son ovales y con varios nucléolos (Figs. 1a y b).
- b) Células premeióticas o Espermatoцитos en profase meiótica temprana, Leptoteno o Zigoteno (L o Z).

El núcleo de estas células se caracteriza por poseer una cromatina finamente granular o fibrilar (Figs. 1a y b).

- c) Espermatocitos en Paquiteno medio de la profase meiótica (P). Son las células de mayor tamaño en el conjunto de células germinales. En el núcleo la cromatina se caracteriza por estar condensada en los bivalentes entre los cuales quedan espacios claros (Figs. 1a y b).
- d) Espermatidas presentes en sólo una generación. Las Espermatidas más tempranas (Estado III) poseen un núcleo aplanado en la región acrosómica, la cromatina está en condensación y posee algunos cromocentros. No se observa flagelo. Las espermatidas más avanzadas (Estado IV), presentan una franca polarización celular y están orientadas hacia la base del epitelio. El núcleo es ovalado, la cromatina está condensada, poseen flagelo y el citoplasma está desplazado hacia la región caudal (Figs. 1a y b).
- e) Las células de Sertoli (S) están unidas a la membrana basal y ocupan todo el espesor del epi-

telio. Se identifican por sus núcleos de forma irregular, con un nucléolo prominente (Figs. 1a y b).

El epitelio en su conjunto y fundamentalmente las Espermatogonias y células de Sertoli, están adheridas a la membrana basal que está rodeada por fuera por varias capas de células peritubulares (Figs. 1a y b).

Las características de estas asociaciones celulares fueron estudiadas en material fijado en Zenker-formol e incluido en parafina para microscopía de luz (Clermont, 1963; Heller and Clermont, 1964). Las células observadas por nosotros que fueron fijadas en glutaraldehído y los cortes realizados en material incluido en plástico, (Figs. 2a y b) se corresponden con aquellas descritas anteriormente.

En una sección transversal de un túbulo seminífero humano pueden estar presentes varios estados del epitelio seminífero. Esta distribución heterogénea, obliga a que se seleccione sólo aquel

sector de túbulo en donde ocurre la agrupación celular pertinente. Se tuvo en cuenta para el diagnóstico del estado del epitelio germinal, la diferenciación de las espermatidas y las características de la profase meiótica de los Espermatoцитos, puesto que las otras células del epitelio a este nivel permanecen prácticamente invariantes (Figs. 2a y b).

La organización tisular observada al microscopio electrónico en secciones más finas y contrastadas con uranilo y plomo, aparece concordante con la descrita al microscopio de luz. Las poblaciones celulares y las células germinales son perfectamente identificables (Figs. 3a y 7). Debido a la mejor resolución que tiene la observación al microscopio electrónico, se aprecian con mayor detalle algunas de las diferenciaciones de las células germinales tales como: el grado de condensación y distribución de la cromatina, la morfología y distribución de los organelos citoplasmáticos, las uniones intercelulares y las relaciones con el citoplasma de las células de Sertoli.

1.2. Algunos elementos que permiten evaluar el grado de diferenciación de los Espermatoцитos humanos en Paquiteno

Los Espermatoцитos en el Paquiteno de la pro-fase meiótica son células germinales en diferenciación, las cuales presentan peculiaridades morfo-funcionales que permiten reconocerlas inequívocamente. Describiremos brevemente algunas de estas características, pues sirvieron de indicador y de control para el diagnóstico de los Espermatoцитos y el grado de avance de su diferenciación (Figs. 3 y 4).

- a) Es frecuente observar puentes o uniones intercelulares entre Espermatoцитos (Figs. 4a y b). Esta continuidad citoplasmática originada de una citodieresis incompleta se caracteriza por el acúmulo de una sustancia electrodensa en los límites de la unión (Fig. 4b). Estos puentes intercelulares muchas veces comprometen a todo un conjunto de Espermatoцитos, los que permanecen comunicados durante su desarrollo incluso hasta la generación de Espermátidas (Fawcett et al., 1959; Dym and Fawcett, 1971).

- b) El núcleo del Espermatozoido es voluminoso y en su interior se destacan los Complejos Sinaptonémicos, que permiten individualizar y situar a los bivalentes (Figs. 3a y b). El Complejo Sinaptonémico es una estructura trilaminar de longitud variable, proporcional a la del bivalente, y cuyos extremos se unen estrechamente a la envoltura nuclear (Wettstein and Sotelo, 1967; Moses, 1968).
- c) Algunos sectores de la superficie externa de la envoltura nuclear se encuentran recubiertos por ribosomas y sobre ellos se sitúan membranas separadas entre sí por un espacio semejante al espacio perinuclear (Fig. 3c). En algunos puntos, estas membranas acompañadas de los ribosomas aparecen parcialmente unidas a la envoltura nuclear (Fig. 3d). En el sector citoplasmático, su aspecto es de retículo endoplasmático rugoso (Chemes et al., 1978). Este fenómeno aparentemente no ocurre en los Espermatozoidos en Paquiteno avanzado puesto que la envoltura nuclear aparece desprovista de estas membranas.

- d) La envoltura nuclear presenta complejos de poro o "annuli" distribuidos irregularmente en su superficie (Fawcett and Chemes, 1979). Los poros están ausentes de los sectores donde la envoltura nuclear es compleja (Fig. 3a), o donde ocurre la inserción de algún bivalente. En cada poro se observa una disminución de la distancia existente entre la membrana externa e interna del núcleo y acúmulo de material electrodensso (Figs. 3e, f y g).
- e) El sistema de Golgi es un organelo citoplasmático que adquiere gran desarrollo durante la profase. Generalmente se observa situado rodeando al centríolo y próximo a la envoltura nuclear (Figs. 4c y d).
- f) Las mitocondrias se agrupan en un número de 3 a 12, formando rosetas (Fawcett et al., 1970) (Fig. 4e). Permanecen estrechamente unidas debido a la presencia entre ellas de un material cementante electrodensso que se tiñe intensamente con la técnica de Bernhard (1969) (Figs. 4e y f). En el interior de cada una de las mitocon-

drias, las membranas de las crestas mitocondriales se modifican adoptando un aspecto vacuolado (Fig. 4e). Esta organización mitocondrial ha sido descrita como característica de las células germinales de mamíferos (Fawcett et al., 1970).

FIGURA 1

Esquema de asociaciones celulares de la es-
permatogénesis humana de acuerdo a Heller y Clermont (1964),
correspondientes a:

- a) Estado III
- b) Estado IV

FIGURA 2

Secciones de túbulos seminíferos humanos, in-
cluidos en plástico y teñidos con azul de toluidina.

- a) Estado III
- b) Estado IV

Las flechas señalan los respectivos nucléolos.

De lumen a lámina basal en ambas figuras:

- Sp = espermatida
- P = Espermatocito en Paquiteno
- Z = Espermatocito en Zigoteno
- L = Espermatocito en Leptoteno
- A = Espermatogonia
- S = Célula de Sertoli

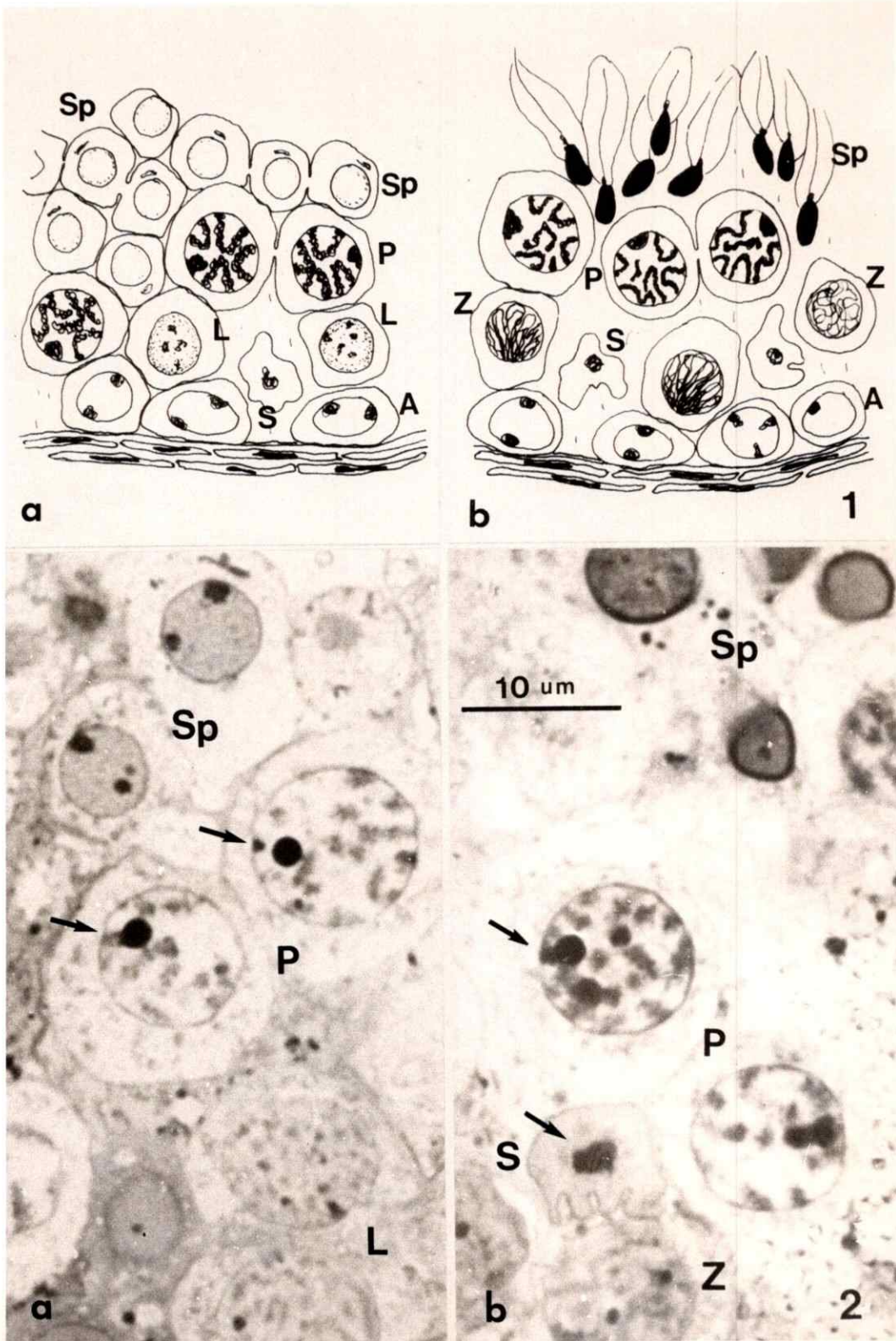


FIGURA 3

Diferenciaciones nucleares de los Espermato-
citos en Paquiteno.

- a) Espermatocono en Paquiteno. En el núcleo, de 10 a 12 μ m de diámetro, se observan Complejos Sinaptonémicos (CS) de los bivalentes (\blacktriangle). Las puntas de flecha indican los límites de un sector de envoltura nuclear compleja. Nótese también la relación del Espermatocono con la célula de Sertoli (S).
- b) Inserción a la envoltura nuclear de un Complejo Sinaptonémico (\blacktriangle). Se observa la estructura trilaminar del Complejo Sinaptonémico, formado por dos elementos laterales (L) y por un elemento medial (M). El material electrondenso junto a cada lateral corresponde a cromatina de cada cromosoma homólogo apareado.
- c y d) Envoltura nuclear compleja por sobreposición de membranas, separadas por ribosomas. Las membranas externas cubiertas de ribosomas (d) pueden aparecer parcialmente en el citoplasma adoptando aspecto de retículo endoplásmico rugoso (d).
- e, f y g) Poros nucleares (\blacktriangle). En estos sitios, la lámina externa y la lámina interna de la envoltura nuclear aparecen fusionadas. En cada poro, de ± 50 nm diámetro (\blacktriangle), se aprecia una sustancia electrondensa. No se observan poros donde la envoltura nuclear es compleja (c y d) o donde hay inserción de algún Complejo Sinaptonémico (b).

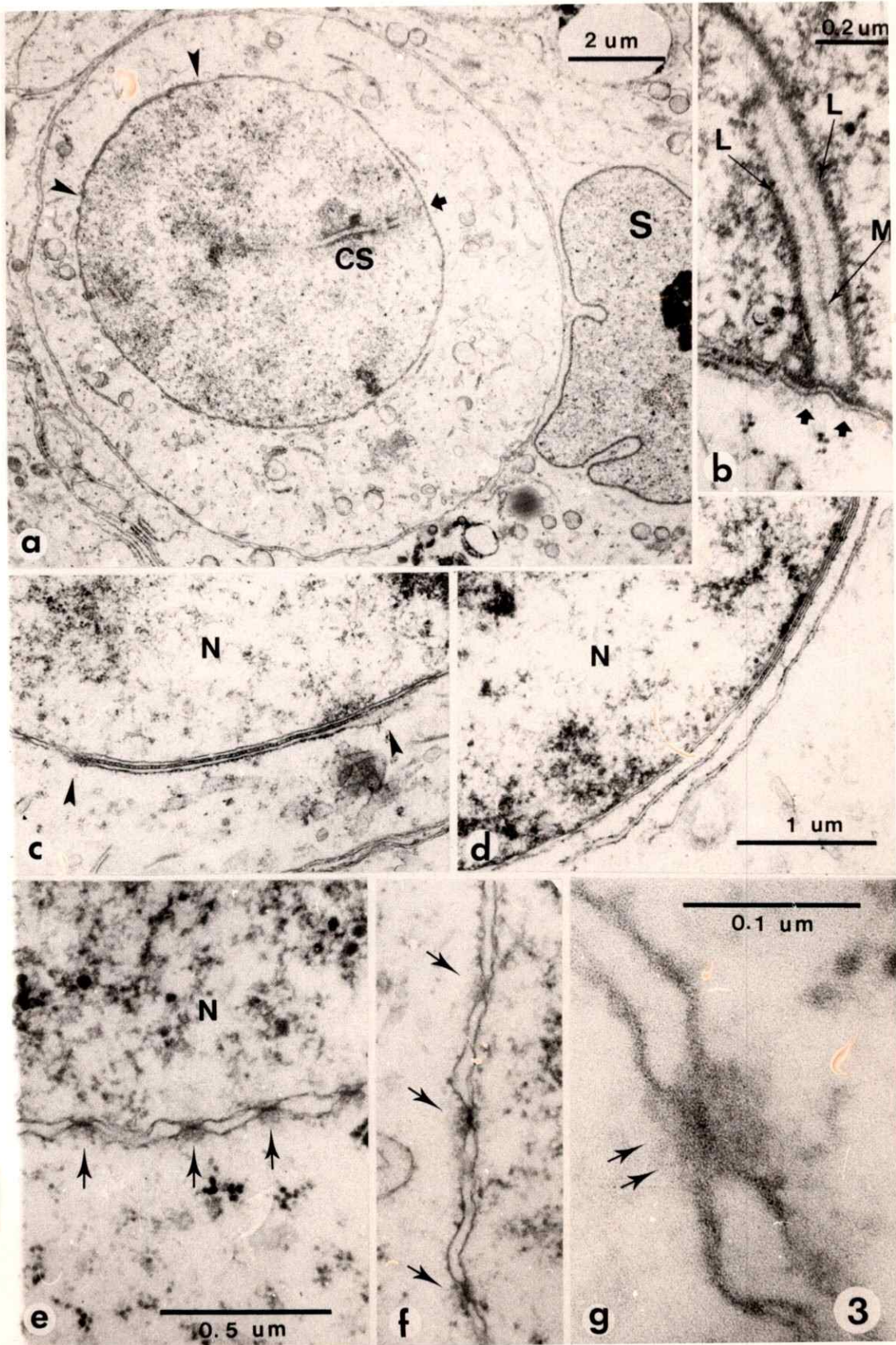
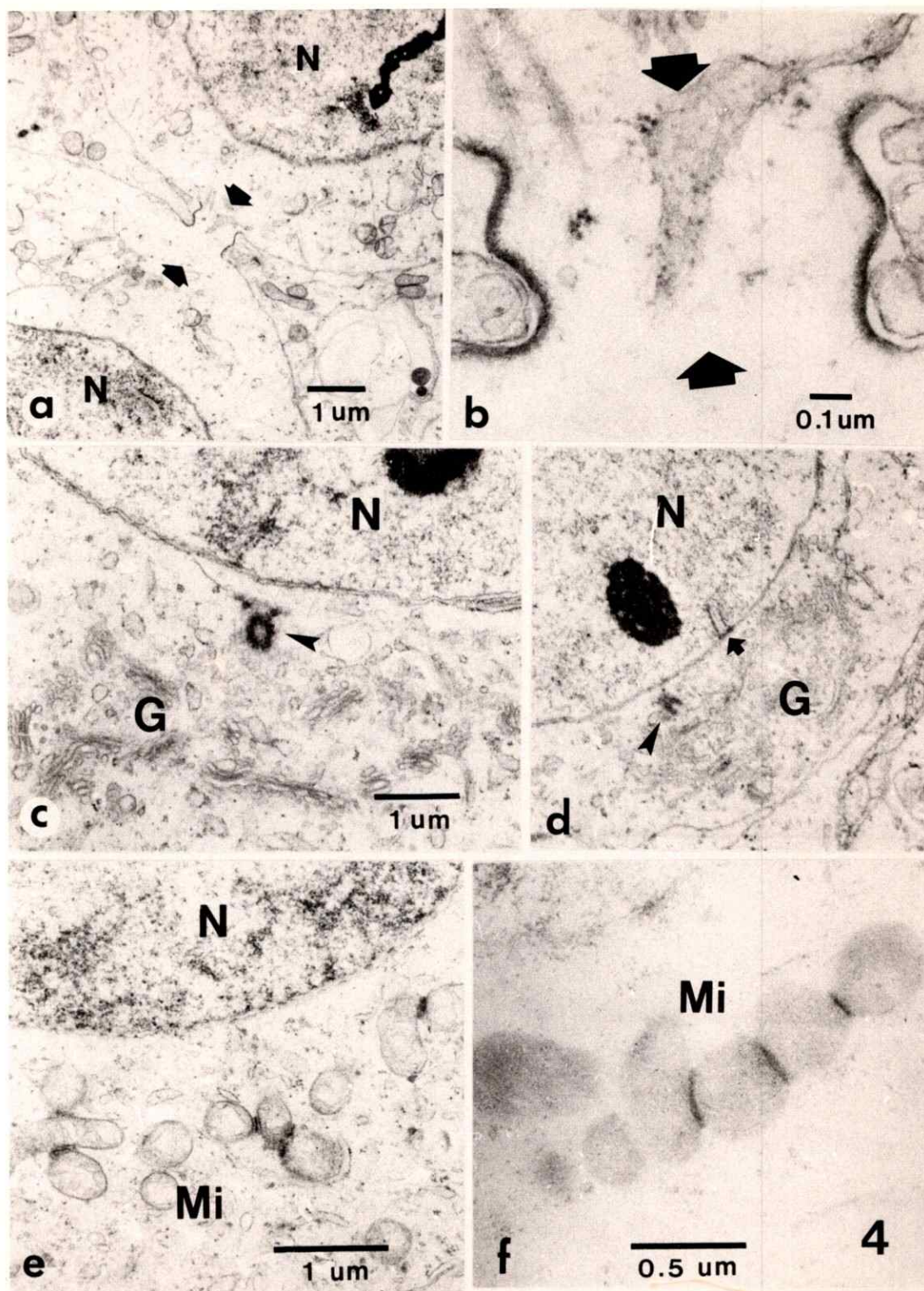


FIGURA 4

Diferenciaciones citoplasmáticas de los Espermatoцитos en Paquiteno.

- a) Las flechas indican un puente intercelular el cual comunica ampliamente a dos Espermatoцитos en Paquiteno (▲).
- b) Las membranas citoplasmáticas comprometidas en la unión intercelular están recubiertas en su superficie interna por una sustancia electrondensa. El sector abierto a una y otra célula mide de 1 a 2 μm de ancho.
- c y d) El aparato de Golgi (G) presenta un gran número de sacos membranosos. Se localiza en un sector definido del citoplasma en inmediación al núcleo, y por lo general aparece rodeando al centriolo (▲).
- e) Las mitocondrias están agregadas entre sí en grupos de 3 a 12. La unión entre ellas es mediada por una sustancia cementante electrondensa. Las crestas mitocondriales se modifican, mostrando un aspecto vacuolado el cual es típico de las mitocondrias de los Espermatoцитos.
- f) La sustancia cementante que participa en la agregación mitocondrial resultó ser fuertemente positiva a la técnica de Bernhard.





2. BIVALENTES NUCLEOLARES Y DOMINIOS NUCLEOLARES

2.1. Identificación de los Bivalentes Nucleolares en dispersiones nucleares de Espermatocitos

En las preparaciones de dispersiones de Espermatocitos se observa una gran variedad de núcleos en diferentes etapas de la meiosis. Entre ellos predominan los núcleos de Espermatocitos en Paquiteno con diferentes grados de separación de los bivalentes. En algunos núcleos se puede contar fácilmente los veintitrés bivalentes y se distingue claramente el par sexual (Fig. 5). En el conjunto de cromosomas es también posible reconocer a los Bivalentes D y G por su longitud y por la presencia en uno de sus extremos del "cromómero nucleolar" (Ferguson-Smith, 1964; Hungerford, 1971a). De entre los núcleos en Paquiteno, se eligió aquellos que hubieren alcanzado un diámetro aproximado de 15 a 20 μm , ya que en ellos aparece mejor conservada la relación entre bivalentes y nucléolos. Es necesario tener en cuenta que la técnica utilizada (Hungerford, 1971a) no fue diseñada para observar nucléolos. Su objetivo principal está diri-

gido a obtener una dispersión cromosómica tal, que permita realizar cariotipos de bivalentes. Por tanto, es razonable suponer que podría ocurrir pérdida de nucléolos y separación de asociaciones de "cromómeros nucleolares". Sin embargo, a pesar de la disrupción nuclear producida, se conservan nucléolos y algunas de las relaciones interbivalentes (Fig. 5).

En 100 Espermatocitos observados (Fig. 5), el 60% presentó un nucléolo grande de un diámetro de $\pm 3 \mu\text{m}$ y de forma ovoide. Un 10% de los núcleos mostró más de un nucléolo, los cuales aparecen de menor tamaño que el descrito, y en el 30% restante no se observó nucléolos. Todos los nucléolos observados aparecieron asociados o en proximidad a uno o varios "cromómeros nucleolares" de diferentes Bivalentes D o G (Figs. 5a y b). El "cromómero nucleolar" es claramente visible en el extremo del Bivalente Nucleolar que está unido al nucléolo y aparece como una estructura de un diámetro aproximado de $1 \mu\text{m}$ fuertemente teñida con Giemsa, (Fig. 5f). Con la técnica de la plata amoniacal se tiñó intensamente el ápice del "cromómero nucleolar" ade

más del sector proximal del nucléolo (Fig. 6).

Frecuentemente los "cromómeros nucleolares" de dos o tres Bivalentes, asociados a un nucléolo, aparecen íntimamente unidos formando una sola masa de cromatina (Figs. 5d y e). En estos casos el tamaño de este cuerpo cromatínico es proporcional al número de "cromómeros nucleolares" comprometidos. En otros casos, dos o más Bivalentes aparecen próximos, con los respectivos "cromómeros nucleolares" unidos al mismo nucléolo (Fig. 5c).

FIGURA 5

Esparcido de bivalentes teñido con Giemsa y obtenido por tratamiento hipotónico de Espermatocitos en Paquiteno.

Se muestra en cada Espermatocito a los nucléolos (↑) y su relación con los respectivos Bivalentes Nucleolares.

- a) Un gran nucléolo en contacto con un Bivalente G, a través del "cromómero nucleolar".
- b) Un gran nucléolo en contacto con un Bivalente D, a través del "cromómero nucleolar".
- c) Un nucléolo en contacto con dos Bivalentes D.
- d) Tres nucléolos: uno en contacto con dos Bivalentes G, otro en contacto con un D y un tercero en relación a dos D íntimamente asociados por "cromómeros nucleolares".
XY - bivalente sexual
- e) Un nucléolo al cual contactan un G y dos D por los "cromómeros nucleolares" íntimamente asociados.
- f) Un nucléolo en contacto con un Bivalente G por el "cromómero nucleolar" y otros varios Bivalentes.

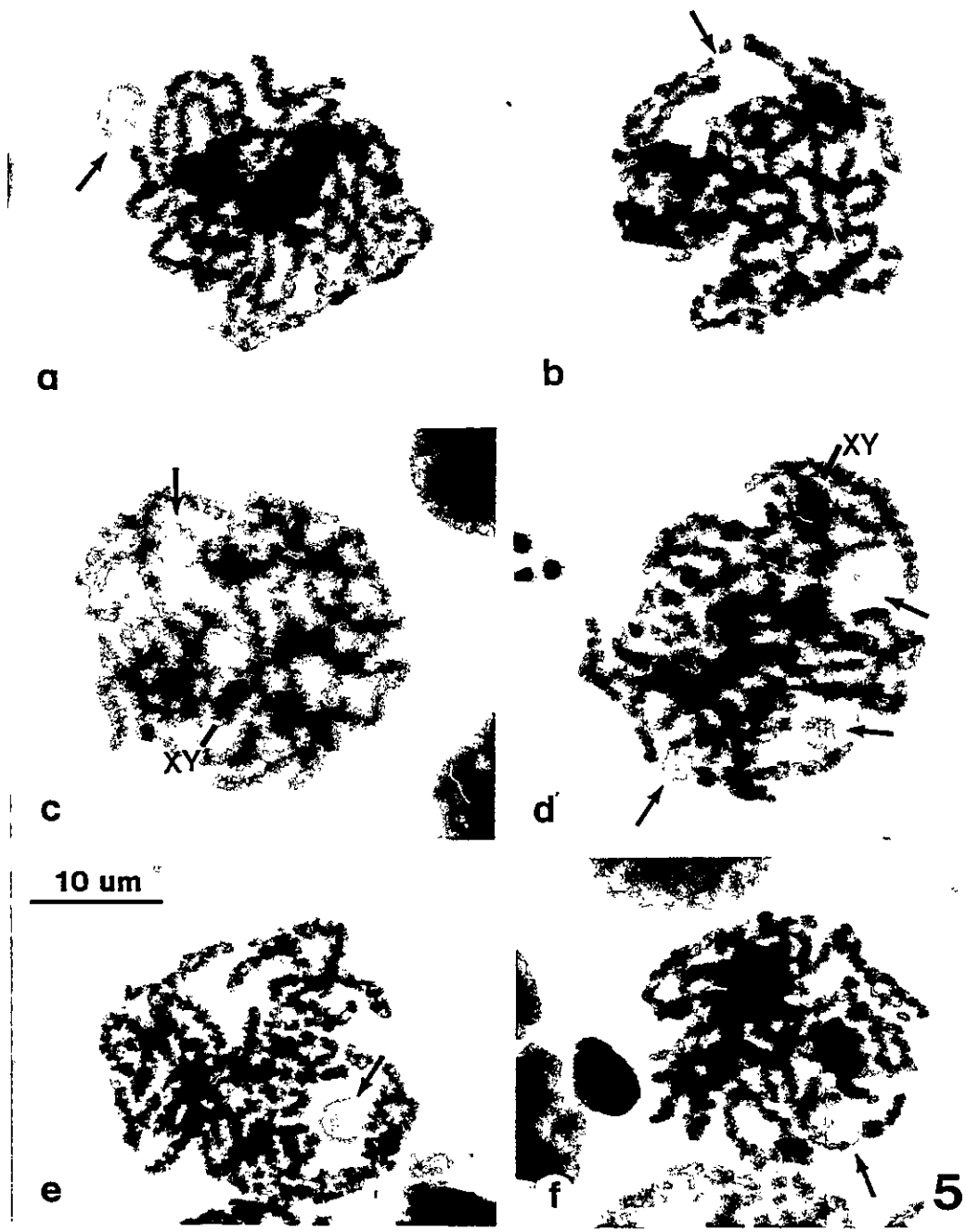


FIGURA 6

Esparcido de bivalentes impregnados con plata obtenidos por tratamiento hipotónico de Espermatoцитos en Paquiteno.

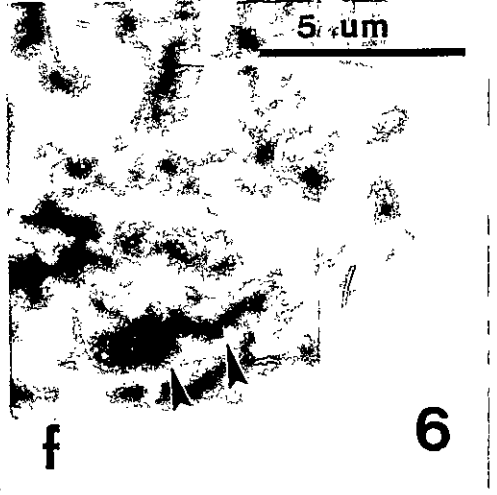
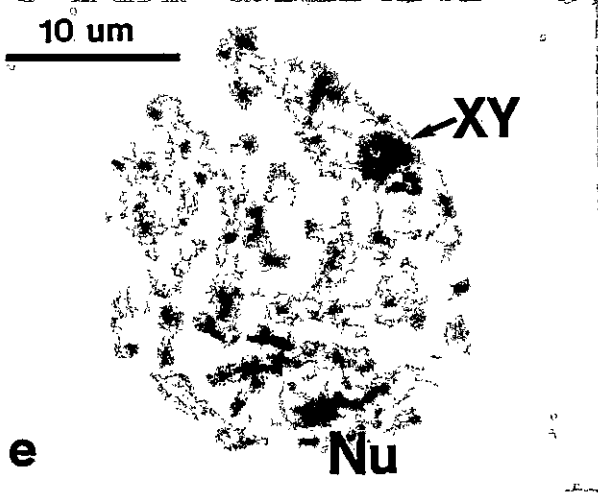
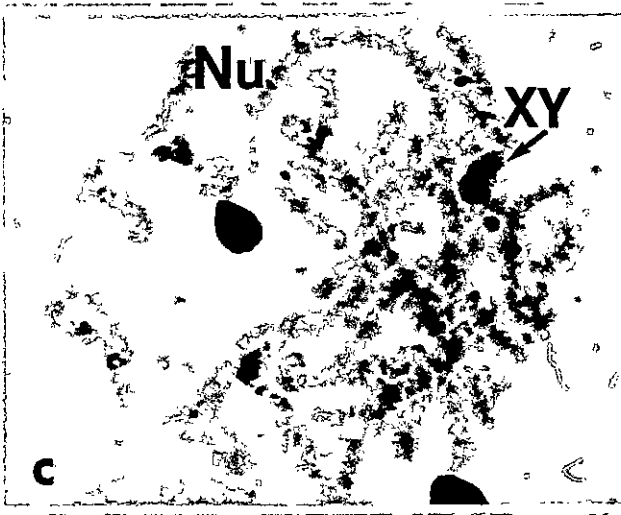
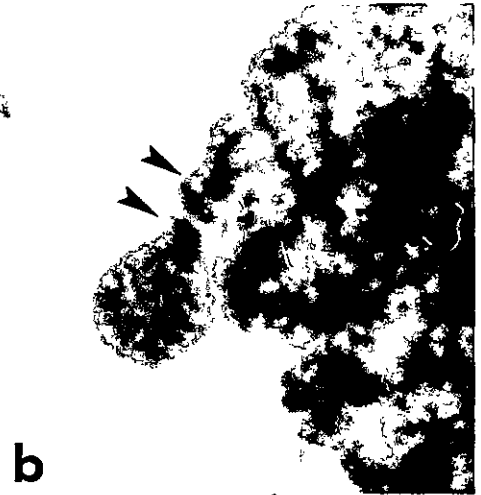
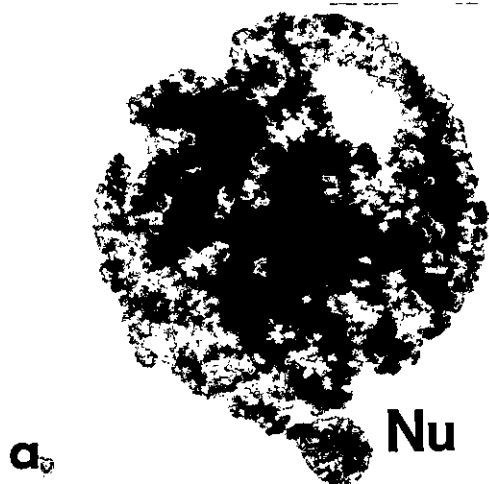
a y b) Espermatoцитo en Paquiteno, en el cual se observa un gran nucléolo unido al extremo de un Bivalente Nucleolar (a). El "cromómero nucleolar" y la región basal de la esfera nucleolar aparecen fuertemente afines a la plata (b).

c y d) Espermatoцитo en Paquiteno, en el cual se observa un gran nucléolo unido al extremo de un Bivalente Nucleolar D (c). El "cromómero nucleolar" y el sector basal de la esfera nucleolar aparecen teñidos con la plata (d).

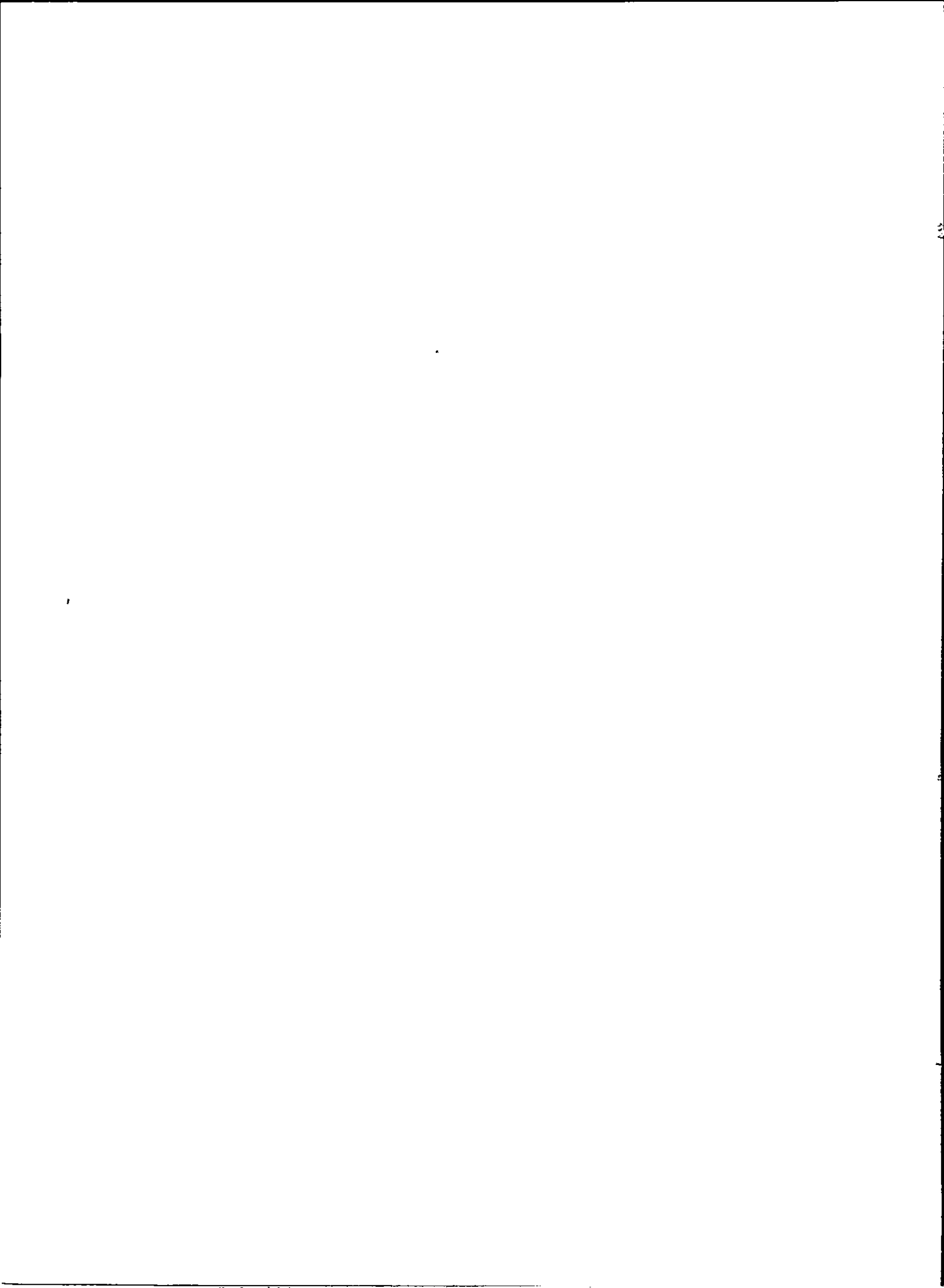
XY = bivalente sexual

e y f) Espermatoцитo en Paquiteno, en el cual se observa un gran nucléolo unido al extremo de un Bivalente Nucleolar D (e). El "cromómero nucleolar" aparece distendido en dos cromómeros ambos afines a la plata al igual que el sector basal del nucléolo (f).

XY = bivalente sexual



6



2.2. Caracterización de los Bivalentes y Dominios Nucleolares

En esta tesis se ha introducido el término Dominio Nucleolar, entendiéndose por tal, al conjunto de elementos cromatínicos y no cromatínicos que configuran en el núcleo el territorio nucleolar. El término "dominio" tiene la connotación de: ámbito, territorio o compartimento, tanto para el núcleo como para los cromosomas (ver Discusión). El Dominio Nucleolar en el Espermatocito está formado por el nucléolo y por las regiones cromosómicas a las cuales permanece unido.

a) Observaciones al microscopio de luz

Se analizó un conjunto de series de cortes de Espermatocitos en Paquiteno de los Estados III y IV del epitelio germinal, fijados en glutaraldehído, incluidos en plástico y teñidos con azul de toluidina (Figs. 2a y b, 18a).

Sesenta núcleos completos de Espermatocitos de cinco muestras individuales con doce núcleos

cada una fueron observados, y se fotografiaron con el objeto de investigar la organización de la cromatina y para averiguar el número y posición de los nucléolos existentes en cada núcleo (Tabla 2). Los núcleos en Paquitenos tienen un diámetro de $\pm 12 \mu\text{m}$ y se pudieron seguir en aproximadamente 14 cortes seriados de $0.8 \mu\text{m}$ de espesor cada uno. Todos los Espermatoцитos en Paquitenos analizados presentaron nucléolos. El 58% de los núcleos presentó un único y gran nucléolo. El 42% restante mostró 2, 3 y hasta 4 nucléolos (en el total de núcleos: 27%, 12% y 3% respectivamente). En ninguno de los núcleos se observó 5 o más nucléolos (Tabla 2). En los núcleos en que se observaron varios nucléolos, siempre uno de ellos fue de mayor tamaño y semejante en dimensiones al nucléolo único que presentan la mayoría de los Espermatoцитos.

Cada nucléolo aparece como una esfera muy densa, fuertemente teñida, de 1.5 a $2.5 \mu\text{m}$ de diámetro y unido a la envoltura nuclear a través de una masa de cromatina de tamaño y forma variables (Figs. 18a, b, c y d). Este conjunto es

el que configura el Dominio Nucleolar del núcleo del Espermatozocito (Fig. 18a). La masa de cromatina del Dominio Nucleolar generalmente aparece compuesta de unidades de forma aproximadamente cónica, cuyas bases contactan con la envoltura nuclear y cuyos ápices están dirigidos hacia el nucléolo (Figs. 18b y d). Cada unidad tiene una dimensión de 1 a 1.5 μm de diámetro. Ella se distingue claramente del nucléolo o de condensaciones de cromatina como la del bivalente sexual o de la de los restantes cromosomas (Fig. 18a). Esta masa de cromatina, sería equivalente al "basal knob" (BK) descrito por Solari and Tres (1970) en Espermatozocitos humanos observados al microscopio electrónico. Nosotros utilizaremos la denominación BK para referirnos a las unidades cromatínicas que forman parte de un Dominio Nucleolar.

Las observaciones realizadas en sesenta núcleos revelan, que el 85% de los nucléolos aparecen conectados a la envoltura nuclear a través de uno o varios BK (Fig. 18). El 15% restante no muestra evidencias claras de estar en contac-

to con la envoltura nuclear. Sin embargo, no es posible descartar que lo estén pero a través de conexiones más laxas.

Los diferentes Espermatocitos examinados nos revelan que los Dominios Nucleolares tienen una organización básica muy constante, la cual es similar en los diferentes individuos estudiados (Tabla 2).

b) Observaciones al microscopio electrónico

Los Dominios Nucleolares se observan en la periferia de cada núcleo y aparecen constituidos por un gran nucléolo unido a una masa de cromatina condensada compuesta por uno o varios BK (Figs. 7, 8 y 9). Este conjunto aparece estrechamente asociado a un sector de la envoltura nuclear (Figs. 9a, b y c). En cada BK se observa parte del Complejo Sinaptonémico de un Bivalente Nucleolar, el cual forma un arco de aproximadamente 1 μ m de longitud desde su inserción en la envoltura nuclear hasta que emerge del BK (Figs. 8a, b, c, d y e).

Veintitrés Dominios Nucleolares en los cuales había sólo un Complejo Sinaptonémico comprometido fueron seguidos en cortes seriados y fotografiados secuencialmente. Diez de éstos estaban relacionados con Complejos Sinaptonémicos que midieron entre 7.5 y 9.5 μm de longitud, por lo que fueron considerados como pertenecientes a Bivalentes D. Trece se relacionaron con Complejos Sinaptonémicos que midieron entre 3.5 y 4.5 μm , los cuales fueron considerados como pertenecientes a Bivalentes G.

Las longitudes de los Complejos Sinaptonémicos para los mismos Bivalentes estimadas entre T_1 (telómero nucleolar) y T_2 (telómero no nucleolar) están de acuerdo con las publicadas por Holm y Rasmussen (1977a y b) y por Solari (1982). En el Paquitenio medio, el Dominio Nucleolar organizado por Bivalentes D o G es similar. En ellos resulta además evidente la marcada segregación del nucléolo así como también la constitución heterogénea del BK.

Nucléolo: Se distingue claramente como una masa esférica de 1 a 1.5 μm de diámetro, compuesta

principalmente de granitos homogéneos de 25 nm de tamaño (Fig. 9c), electrónicamente densos y similares a los de la zona granular de los nucléolos. La esfera de granitos es densa, no se observan Complejos Sinaptonémicos en su interior y en algunas ocasiones aparecen espacios claros en su centro (Fig. 9a). El Nucléolo se asienta sobre el ápice del BK contactándose con el Centro Fibrilar (FC) de la Región Organizadora del Nucléolo (NOR). FC por Fibrillar Centre, Recher et al., 1969; NOR por Nucleolar Organizer Region, ver Goessens and Lepoint, 1979 (Fig. 8a y 9a).

Basal knob: Aparece como un cuerpo de 1 a 1.5 μm^3 de forma aproximadamente cónica cuya base se adhiere a la envoltura nuclear y su ápice está dirigido hacia la esfera nucleolar (Figs. 8a y b, 9a, b y c). Está constituido por una gran masa de cromatina condensada, de aspecto semejante al que tiene la cromatina condensada de los cromosomas mitóticos. Esta cromatina aparece unida a la envoltura nuclear y rodeando totalmente al Complejo Sinaptonémico comprometido (Figs. 8c y

d). En el ápice del BK se ubica el FC-NOR, el cual aparece como un cuerpo esférico de aproximadamente 500 nm de diámetro y de menor densidad electrónica que la cromatina del BK (Figs. 9a, b y c). Las finas fibras que componen al FC-NOR están apretadamente empaquetadas y miden entre 5 y 7 nm de espesor (Fig. 9c). El FC-NOR no tiene contacto directo con el Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar. Dicho contacto se produce a través de un tipo distinto de cromatina que distinguimos como un tercer elemento constituyente del BK (Figs. 9b y c).

Esta cromatina está compuesta por fibras de 25 a 30 nm de espesor que se organizan en una trama laxa y regular que aparece electrónicamente más densa que el resto de la cromatina del BK (Figs. 9b y c). Se distribuye en forma semejante a una copa, en la cual el continente de la copa está marcadamente delineado en la superficie que se relaciona con el FC-NOR (Figs. 9b y c; 17b; 29). El pie de la copa es bifurcado y contacta directamente con los elementos laterales del Complejo Sinaptonémico a $\pm 0.3 \mu\text{m}$ de la inser-

ción de éste en la envoltura nuclear (Figs. 8c y d; 9b y c). A esta cromatina la hemos llamado "Cromatina de Conexión".

Obviamente cada BK corresponde al "cromómero nucleolar" de un Bivalente D o G (Hungerford, 1971a). Si consideramos además la posición del BK en el extremo del Complejo Sinaptonémico nucleolar, la relación del BK con el nucléolo, y principalmente la extensión del BK sobre el Complejo Sinaptonémico respectivo, éste debería corresponder al brazo p de los cromosomas D o G, (Fig. 29). Por otra parte, los elementos constituyentes del BK tienen una ordenación sobre el Complejo Sinaptonémico que es consistente con aquella de las bandas 11, 12 y 13 de los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos humanos (ver Discusión).

La envoltura nuclear en la zona de adhesión del BK aparece desprovista de poros o annuli (Figs. 8 y 9) y en el punto de inserción del Complejo Sinaptonémico, aparece diferenciada en forma semejante a las inserciones de cualquier

otro telómero autosómico (Figs. 8d, 9b, 17a y 3b).

En los Espermatocitos en que se observó más de un nucléolo, éstos se relacionaban con Dominios Nucleolares de organización semejante a la descrita (Fig. 18e).

c) Citoquímica

Se realizó la técnica de Bernhard (1969) sobre series de núcleos en Paquiteno con el fin de identificar citoquímicamente los sectores ricos en RNP presentes en los Dominios Nucleolares (Figs. 10 y 11).

En el núcleo, se tiñeron intensamente los gránulos pericromatínicos, las fibrillas intercromatínicas y los laterales de los Complejos Sinaptonémicos. La cromatina de los cromocentros apareció desteñida (Figs. 10a y c).

En los Dominios Nucleolares, se tiñeron intensamente los gránulos presentes en la esfera nucleolar (Figs. 10 b y d), los laterales del

Complejo Sinaptonémico Nucleolar (Figs. 10b y d; 11i y j), y con mucho menor intensidad el FC-NOR (Fig. 10d). La cromatina condensada del BK apareció desteñida incluyendo a la Cromatina de Conexión que relaciona al FC-NOR con los laterales (Figs. 10b, 11g, i y j). Sin embargo, la zona de contacto entre la cromatina de conexión y el FC-NOR apareció claramente definida por una fuerte reacción positiva para RNP, semejante en intensidad a la que presentan los elementos laterales del Complejo Sinaptonémico o los gránulos y fibrillas nucleolares (Figs. 11c, d, e, g, h y j). La observación de series de cortes revela que esta reacción en la superficie de contacto entre el FC-NOR y la Cromatina de Conexión es discontinua y está ausente en los sectores que están más próximos a la unión con el Complejo Sinaptonémico Nucleolar (Figs. 11a, b, f y j).

T A B L A 2

TAMAÑO Y N° DE NUCLEOS POR NUCLEO DE ESPERMATOCITOS
EN PAQUITENO EN LAS 5 MUESTRAS EXAMINADAS

| Muestra | N° de Núcleos observados | N° de Núcleos | | | | Total Nucléolos |
|-----------------|-----------------------------|---------------|------------------|-----------------|---------------|--------------------|
| | | 1Nu | 2Nu | 3Nu | 4Nu | |
| A | 12 | 7 | 4 | 1 | 0 | 18 |
| B | 12 | 8 | 4 | 0 | 0 | 16 |
| C | 12 | 7 | 3 | 2 | 0 | 10 |
| D | 12 | 7 | 3 | 1 | 1 | 20 |
| E | 12 | 6 | 2 | 3 | 1 | 23 |
| Total Núcleos | 60 | 35 (58%) | 16 (27%) | 7 (12%) | 2 (3%) | |
| Total Nucléolos | | 35 (*35) | 32 (16* + 16) | 21 (7* + 14) | 8 (2* + 6) | 96 (60* + 36) |

\bar{Nu} = nucléolos

\bar{X} de Nu por núcleo = 1.6

(*) Nucléolos mayores de 2 μ m de diámetro, en un 50% asociados a más de 1 basal knob

FIGURA 7

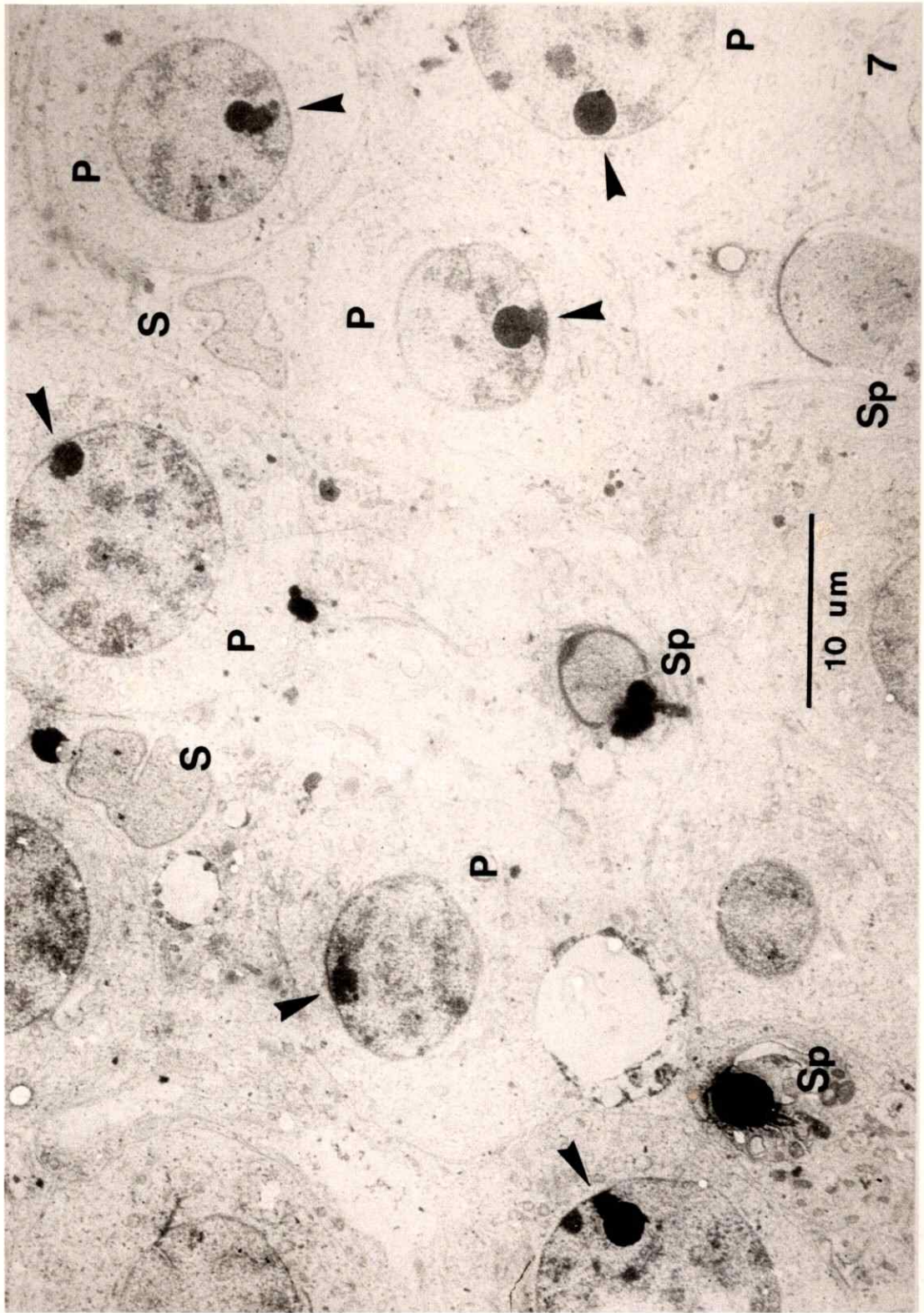
Espermatocitos en Paquiteno medio, contrastados con uranilo-plomo y observados al microscopio electrónico.

Las flechas (▲) indican la localización de los Dominios Nucleolares en los núcleos respectivos.

P : Espermatocito en Paquiteno

Sp: Espermatida

S : Célula de Sertoli



7

Sp

10 um

P

Sp

Sp

P

P

P

S

S

P

FIGURA 8

Serie parcial de Microscopía electrónica del extremo nucleolar de un Bivalente D. Se observa la relación entre el Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar y el Dominio Nucleolar respectivo, así como la relación de ambos con la envoltura nuclear.

Nu : material nucleolar granular

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del Nucleolo.

BK : basal knob, o cromatina condensada basal

SC : Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar

NE : envoltura nuclear

↑ : inserción del Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar (CS).

▲ : Cromatina de Conexión, que une al FC-NOR con el Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar.

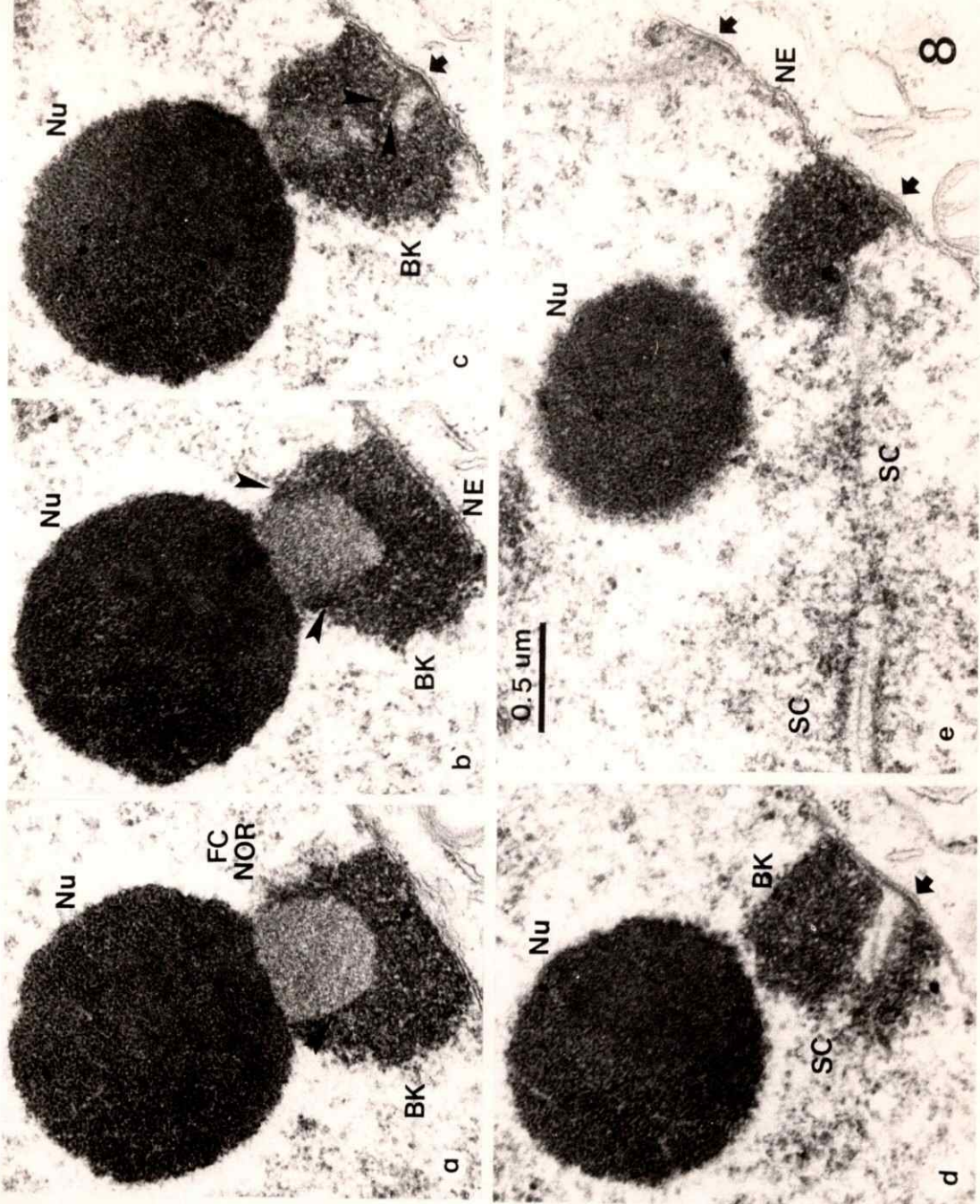


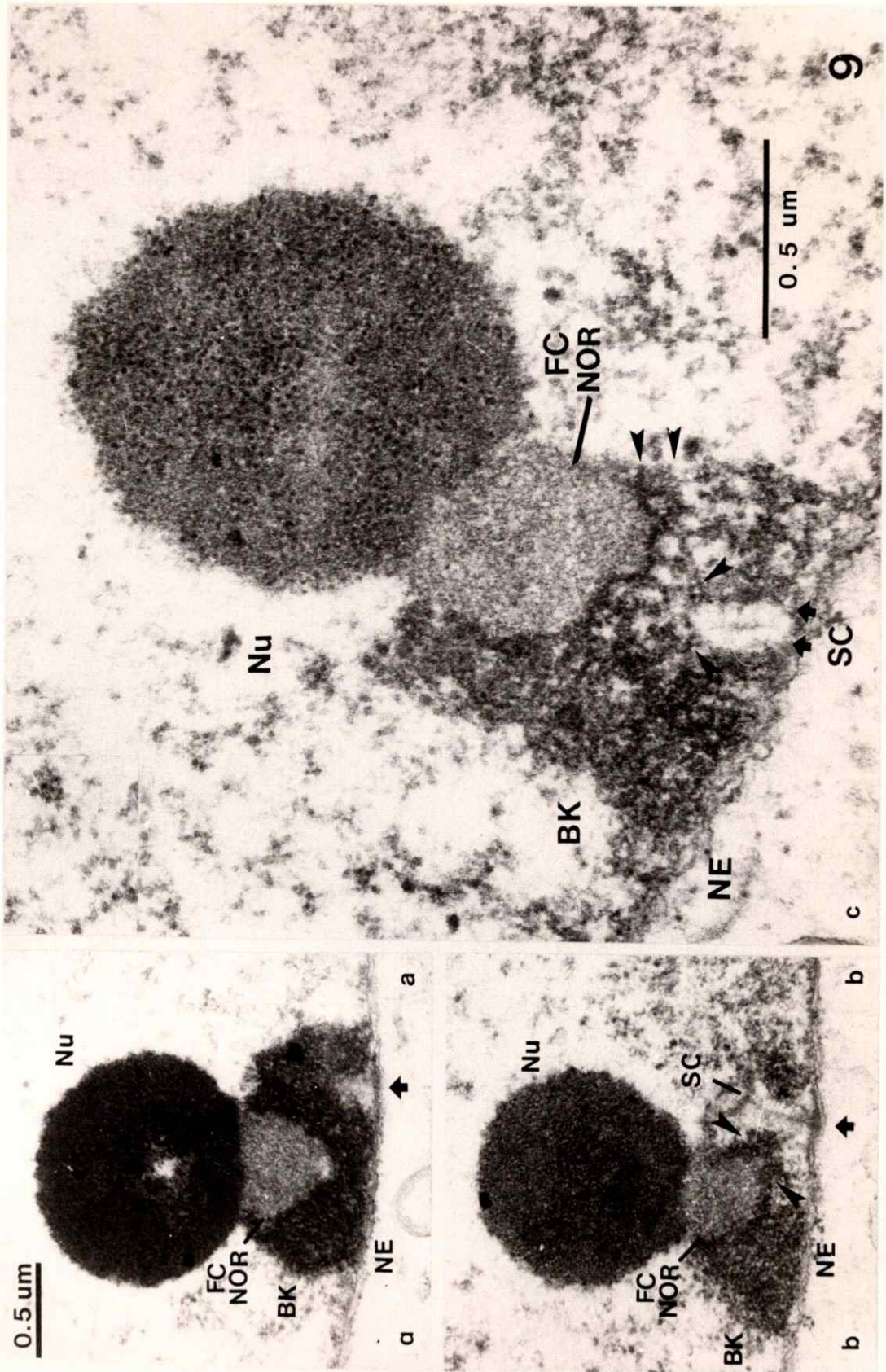
FIGURA 9

Estructura fina del Dominio Nucleolar de Espermatoцитos Humanos en Paquiteno.

Las figuras 9a, b y c son imágenes de Dominios Nucleolares pertenecientes a distintos núcleos.

- 9a) El FC-NOR aparece unido a la esfera de material nucleolar y rodeado por el resto de la cromatina condensada del BK. El BK está ampliamente adosado a la envoltura nuclear.
- 9b) Se señala la presencia de "Cromatina de Conexión" en torno al FC-NOR y en unión a los laterales del Complejo Sinaptonémico.
- 9c) Aparece con más detalle la particular organización de la Cromatina de Conexión. Esta cromatina se extiende por la superficie del hemisferio del FC-NOR en contacto con el resto del BK y se prolonga en trabéculas fibrilares de 25 nm de espesor hasta los laterales del CS. Los gránulos del material nucleolar miden de 20 a 25 nm. Las fibrillas del NOR entre 5 y 7 nm de espesor.

Nu: material nucleolar; FC-NOR: Centro fibrilar de la región organizadora del nucléolo; BK: basal knob; NE: envoltura nuclear; SC: Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar; \uparrow : inserción del Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar; \blacktriangle : Cromatina de Conexión que une al FC-NOR con el Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar.



9

FIGURA 10

Espermatocitos en Paquiteno tratados con la técnica de Bernhard.

- a y b) Espermatocito que presenta un Nucléolo fuertemente teñido y la cromatina del BK asociada a él decolorada al igual que los cromocentros (a). El detalle (b) revela intensa tinción de los gránulos de la esfera nucleolar y de los gránulos pericromatínicos (↑). Los laterales del Complejo Sinaptonémico, parcialmente seccionados, también aparecen teñidos.
- c y d) Espermatocito que presenta el Dominio Nucleolar de un Bivalente en estrecha proximidad al bivalente XY en la periferia del núcleo (c). Aparecen fuertemente teñidos (d) los gránulos de la esfera nucleolar, los laterales de los Complejos Sinaptonémicos, los gránulos pericromatínicos y una estructura anular (↑) inmersa en la cromatina del Bivalente sexual (XY). También aparece teñido el FC-NOR.
- e) Dominio Nucleolar constituido por 2 Bivalentes Nucleolares. Se observa teñida la esfera nucleolar, el FC-NOR, los laterales de los Complejos Sinaptonémicos y se decoloró insuficientemente la cromatina condensada del BK.

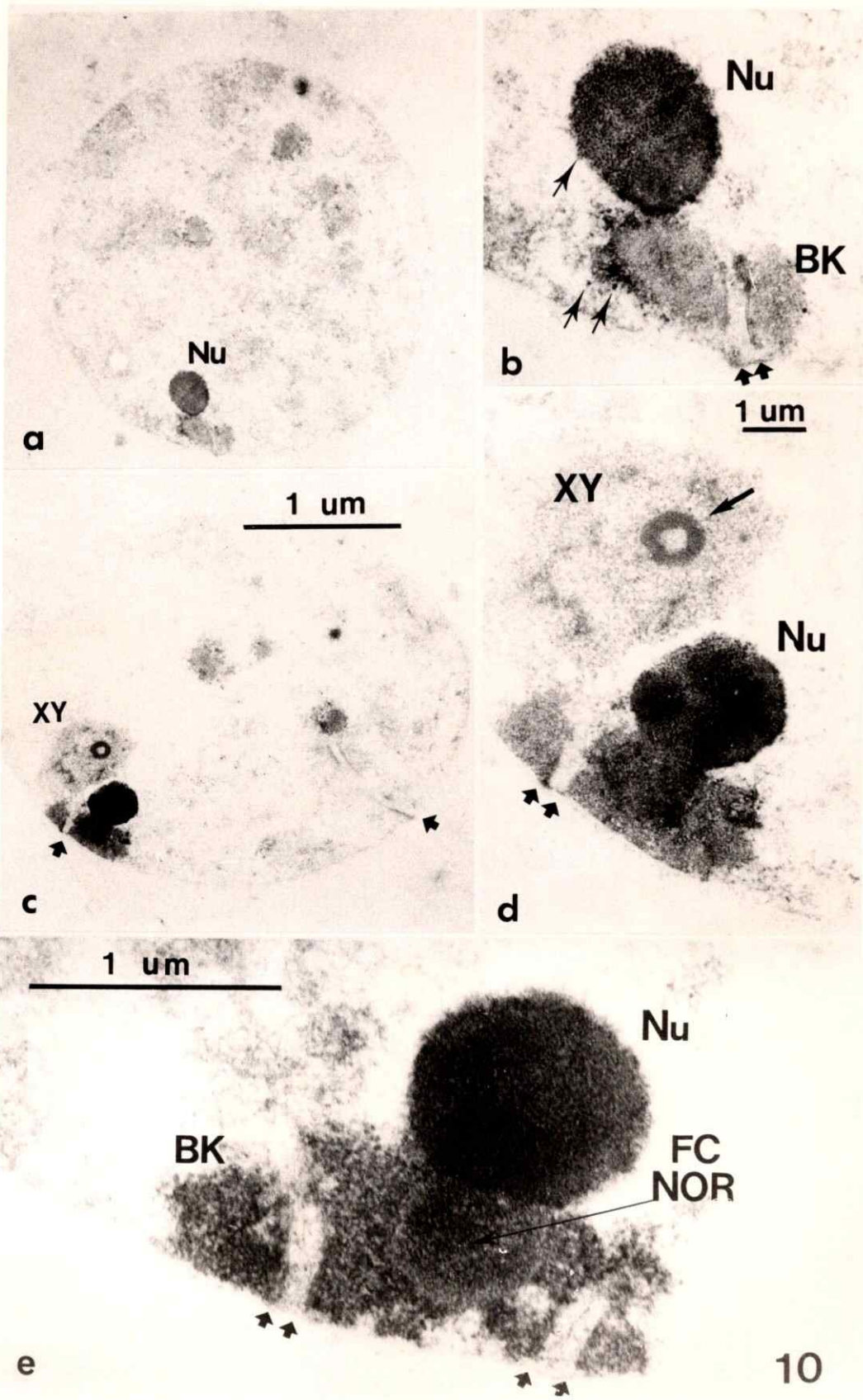
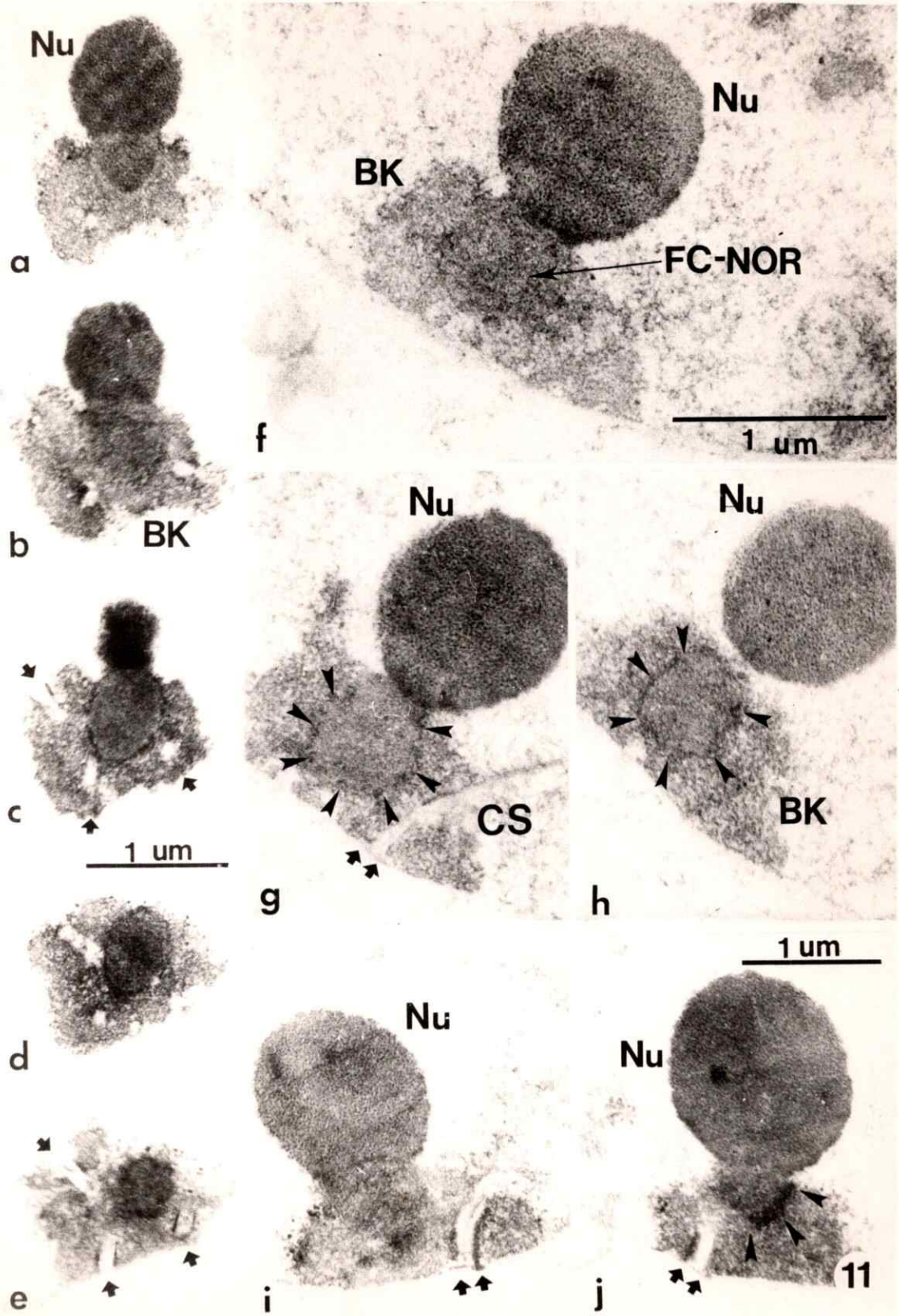


FIGURA 11

Dominios Nucleolares de Espermatocitos en Paquiteno tratados con la técnica de Bernhard.

- a - e) Serie parcial de un Dominio Nucleolar constituido por 3 Bivalentes Nucleolares. Destaca la fuerte reacción positiva a la técnica de Bernhard que resulta en parte de la superficie del FC-NOR (c, d y e). La superficie del FC-NOR próxima al nucléolo (a y b) no reacciona.
- f - h) Serie parcial de un Dominio Nucleolar constituido por un Bivalente. La superficie del FC-NOR indicada (▲) aparece constituida por gránulos afines a la técnica de Bernhard. Se observa parcialmente el Complejo Sinaptonémico respectivo en su inserción en la envoltura nuclear (⬆).
- i y j) Dominios Nucleolares de diferentes Espermatocitos en los cuales aparecen teñidos los gránulos de la esfera nucleolar y los gránulos que rodean la cromatina del BK decolorada. Los laterales del Complejo Sinaptonémico (i, j) y la superficie del FC-NOR (▲), muestran una fuerte reacción positiva.





3. NUCLEOLOS EN LAS CELULAS GERMINALES Y EN LAS CELULAS DE SERTOLI

3.1. Características generales de la organización nucleolar en las células germinales humanas

En el núcleo, los nucléolos pueden aparecer en un número diferente, adoptar diversas formas y tener diferentes localizaciones. Sin embargo, a pesar de esta variación, en cada tipo celular se puede reconocer un cierto patrón de organización nucleolar. Teniendo en cuenta la organización microanatómica tan constante encontrada en los nucléolos de los Espermatocitos en Paquiteno y la continuidad generacional que existe entre las células que componen la línea germinal, nos interesó saber si existía algún comportamiento nucleolar particular en las células germinales.

Los núcleos de las Espermatogonias oscuras, pálidas o intermedias presentan de 3 a 5 nucléolos periféricos, compactos o trabeculados (Figs. 12a, b y c). Los nucléolos de las Espermatogonias pálidas presentan el FC-NOR de cada nucléolo estrechamente unido a la envoltura nuclear y rodeado por algunas

capas de material fibrilar denso (Fig. 12a). Los nucléolos de las Espermatogonias oscuras o intermedias también con un FC-NOR periférico, aparecen con un mayor desarrollo fibrinogranular por lo cual los nucléolos se extienden más hacia el centro del núcleo (Figs. 12b y c). En el Preleptoteno y en los Estados iniciales de la profase meiótica de Leptoteno-Zigoteno, los nucléolos también son periféricos, se encuentran de 3 a 5 por núcleo, están compuestos de material fibrilar y adoptan una forma alargada hacia el centro del núcleo (Figs. 12d; 14a, b, c). Posteriormente durante el Paquiteno, los nucléolos son periféricos, aparecen en menor número, generalmente uno por cada núcleo, y están compuestos principalmente por gránulos agregados en una masa esférica (Fig. 12e). Durante las divisiones Meióticas I y II, las cuales son sucesivas, no aparece actividad nucleolar (Fig. 12f). Durante la espermiogénesis, sólo en las Espermatidas redondas es posible observar de 2 a 3 grumos de material nucleolar con una localización no típica dentro del núcleo (Figs. 12g y h). En las espermatidas avanzadas con la cromatina en proceso de condensación, sólo permanecen algunos sectores con

cromatina descondensada en los cuales no se aprecian nucléolos (Fig. 12i).

3.2. El nucléolo en las células de Sertoli

En la mantención del epitelio seminífero juegan un rol fundamental las células de Sertoli. En ellas el nucléolo es único, de gran tamaño y con una marcada ordenación del material nucleolar en torno al FC-NOR (Fig. 13a). El FC-NOR aparece en estas células como un cuerpo esférico de baja densidad electrónica de aproximadamente 700 nm de diámetro y rodeado de material fibrilar de alta densidad electrónica. Todo este conjunto está rodeado de trabéculas de componentes granulares (Fig. 13c). Como era esperable, el material nucleolar y especialmente las fibrillas de RNP que rodean al FC-NOR, se tiñeron intensamente con la técnica de Bernhard (Fig. 13b). La cromatina apareció levemente teñida (Fig. 13b). La localización de este nucléolo es difícil de precisar. Muchas veces parece estar en relación con las invaginaciones de la envoltura nuclear, por lo que su posición podría ser también periférica. Por otra parte, aunque no

realizamos un estudio en particular, pareciera que el nucléolo de las células de Sertoli conserva la misma organización en los diferentes Estados del epitelio seminífero humano.

3.3. Cambios en la organización del nucléolo durante las etapas de la profase meiótica

En los Espermatocitos que inician la profase meiótica, los nucléolos están constituidos fundamentalmente de fibrillas de RNP (Fig. 14e). Los FC-NOR aparecen en elevado número, aproximadamente 6 por núcleo, y se localizan en su periferia. Cada nucléolo tiene una forma alargada y por uno de sus extremos se conecta al FC-NOR (Figs. 14d y e). El material nucleolar fibrilar de nucléolos unidos a diferentes FC-NOR, puede coalescer por sus extremos distales (Figs. 14d y e). Desde el FC-NOR y hasta la envoltura nuclear se observa la cromatina del correspondiente BK, la cual está levemente condensada (Figs. 14d y e). Los ejes cromosómicos son poco definidos en esta etapa meiótica, están inmersos en la cromatina del BK, y por sus extremos están unidos a la envoltura nuclear (Figs. 14d y e).

En Espermatocitos en Zigoteno-Paquiteno temprano, los nucléolos aparecen en un número de 3 a 5 (Fig. 15), cada uno con un FC-NOR de aproximadamente 200 nm de diámetro y que está en relación a un Complejo Sinaptonémico nucleolar (Figs. 15a, b, c y 16b). El material nucleolar está compuesto por fibrillas y gránulos de RNP, componentes que aparecen ordenados espacialmente desde los FC-NOR en la periferia del núcleo (Figs. 16b, c, f y g). En estos nucléolos se aprecian claramente el FC-NOR, una zona fibrilar alargada y luego una zona granular de forma redondeada (Figs. 16c, d, e, f, g). Desde el FC-NOR y hacia la envoltura nuclear se distribuye la cromatina del BK la cual está más condensada que en etapas anteriores y el Complejo Sinaptonémico nucleolar correspondiente aparece rodeado por ella (Figs. 16b y c). En cada núcleo, todos los nucléolos observados presentan un desarrollo similar con fibrillas y gránulos de RNP, lo cual podría reflejar una cierta sincronía en la actividad nucleolar de los diferentes Bivalentes Nucleolares (Fig. 15).

La estructura fina del Dominio nucleolar del Espermatocito en Paquiteno, ya fue descrita en el

punto 2. de esta tesis. Sin embargo para mantener la continuidad en la descripción de los cambios nucleolares señalaremos brevemente que el nucléolo del Paquiteno se caracteriza por estar constituido principalmente de gránulos de RNP los cuales forman una esfera compacta, que permanece unida al FC-NOR (Figs. 16h, 9, 17). El FC-NOR está relacionado con el Complejo Sinaptonémico nucleolar a través de la "cromatina de conexión". Todo este conjunto aparece rodeado por cromatina del BK, ahora muy condensada y con un amplio sector estrechamente unido a la envoltura nuclear (Figs. 16h, 9, 17).

En Espermatocitos en profase muy avanzada, otras características son observables en la organización microanatómica del Dominio Nucleolar. La masa de material nucleolar granular aparece unida a un cuerpo esférico, de aspecto vacuolado de aproximadamente 500 nm de diámetro, el cual ocupa respecto del material nucleolar, la posición microanatómica que tenía el FC-NOR (Fig. 16i). Sin embargo, en él no se observan las finas fibras que caracterizan al FC-NOR. Este cuerpo y el nucléolo no están conectados al BK, en el cual además no se ob-

serva la cromatina de conexión al Complejo Sinapto-némico (Fig. 16i).

Este fenómeno ha sido observado frecuentemente en profases muy avanzadas y es probable que corresponda a nucléolos en desprendimiento del Dominio Nucleolar (Figs. 16i; 25e, e', f, f'; 28a).

En la Figura 17b se resume la microanatomía y organización de un Bivalente Nucleolar completo (G), considerándose especialmente la estructura del Dominio Nucleolar. Sus dimensiones aproximadas son semejantes con las del Bivalente G de la Figura a.

FIGURA 12

Los nucléolos de las células germinales (▲).

- a - c) Espermatogonias oscuras, pálidas o intermedias. Presentan generalmente de 3 a 5 nucléolos periféricos, constituidos por material fibrinogranular compacto o trabeculado.
- d) Espermatocito en Paquiteno. Presenta generalmente de 3 a 5 nucléolos periféricos de forma alargada compuestos principalmente de fibrillas.
- e) Espermatocito en Paquiteno Medio. Presenta un nucléolo compuesto de gránulos agregados en una masa esférica de localización periférica.
- f) Metafase meiótica, no se observa actividad nucleolar.
- g) Espermátida redonda. Se observa generalmente de 2 a 3 grumos de material nucleolar en una localización no típica dentro del núcleo.
- h e i) Espermátidas Estados III y IV. No se observan nucléolos.

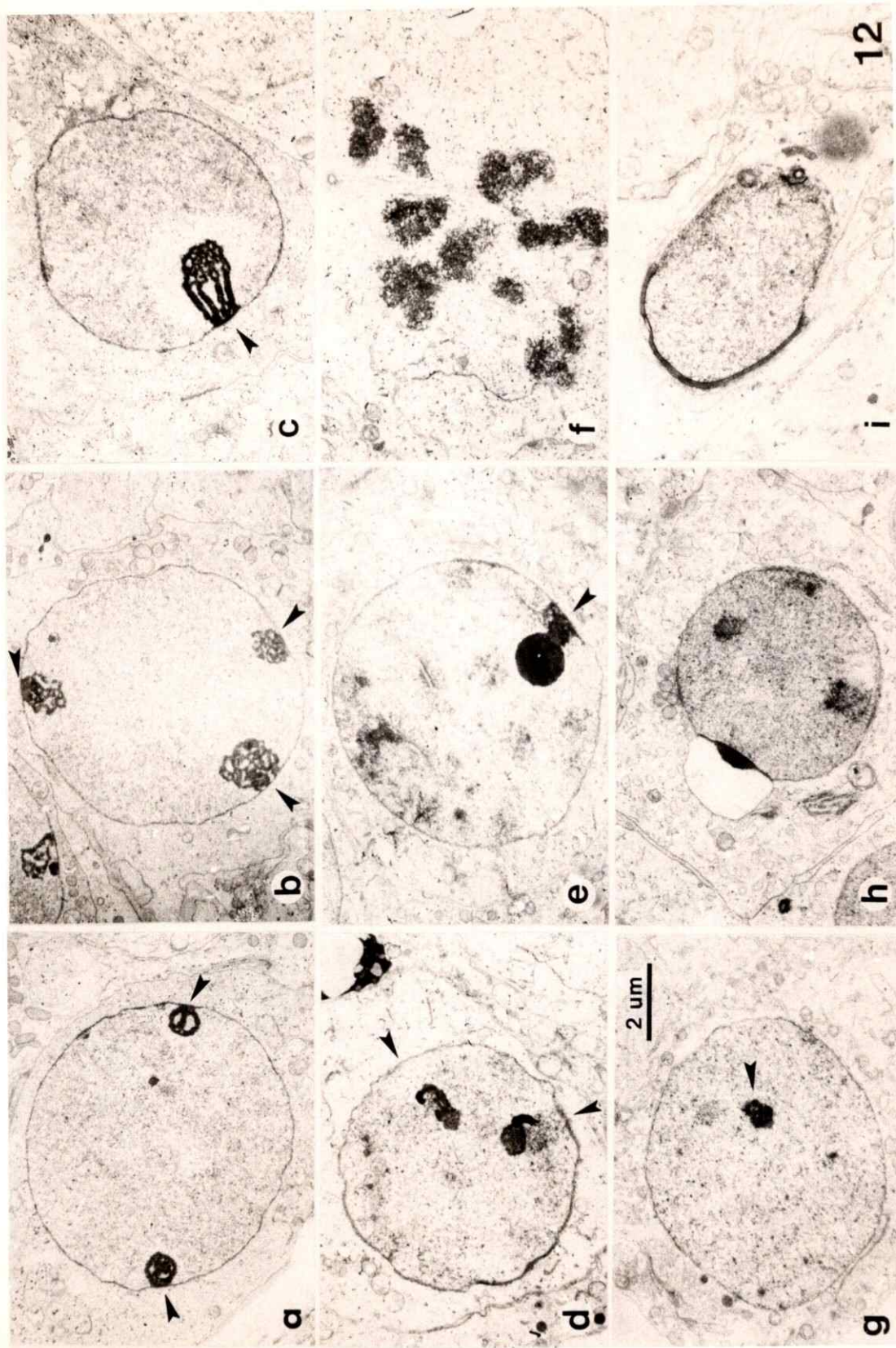


FIGURA 13

El nucléolo de las células de Sertoli.

- a) El núcleo de gran tamaño y de forma muy irregular y con profundas invaginaciones (↑) presenta un gran nucléolo trabeculado en el cual se distingue claramente un gran FC-NOR.
- b) Con la técnica de Bernhard aparece teñido el nucléolo, especialmente su zona fibrilar que rodea al FC-NOR, y la zona granular que se organiza en trabéculas o se agrega en acúmulos compactos.
- c) Detalle de la organización típica del nucléolo de las células de Sertoli. Un gran FC-NOR finamente fibrilar, de hasta 1 μm de diámetro, aparece estrechamente rodeado por fibrillas (f-Nu) y más externamente rodeado por trabéculas de fibrillas y gránulos o solamente por gránulos (g-Nu).

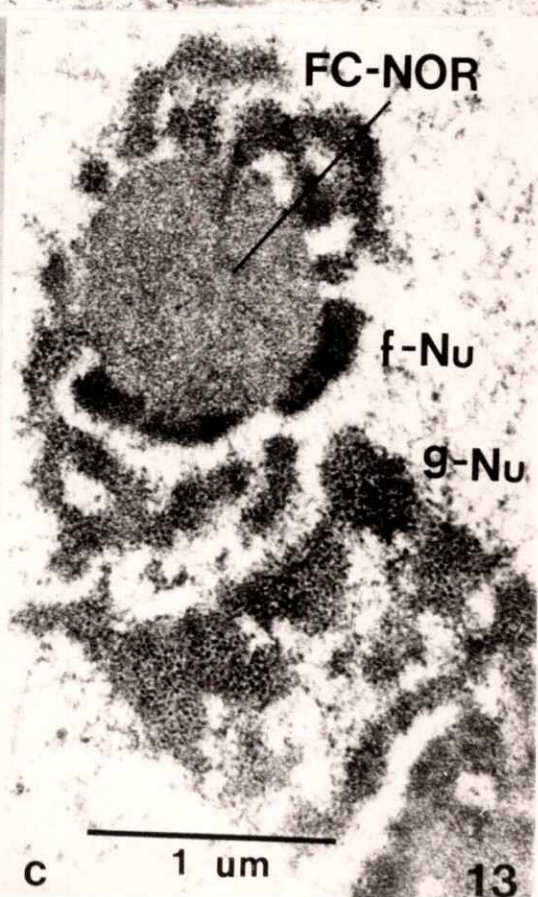
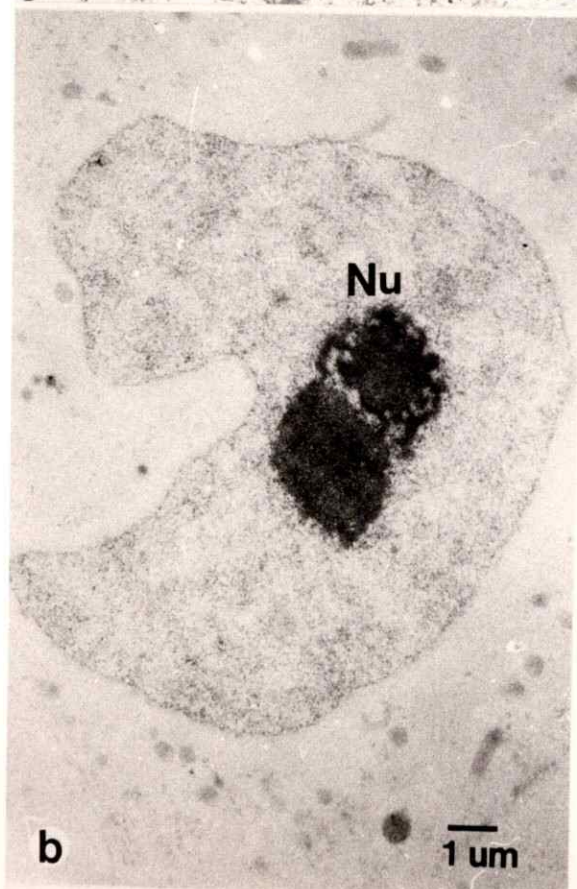
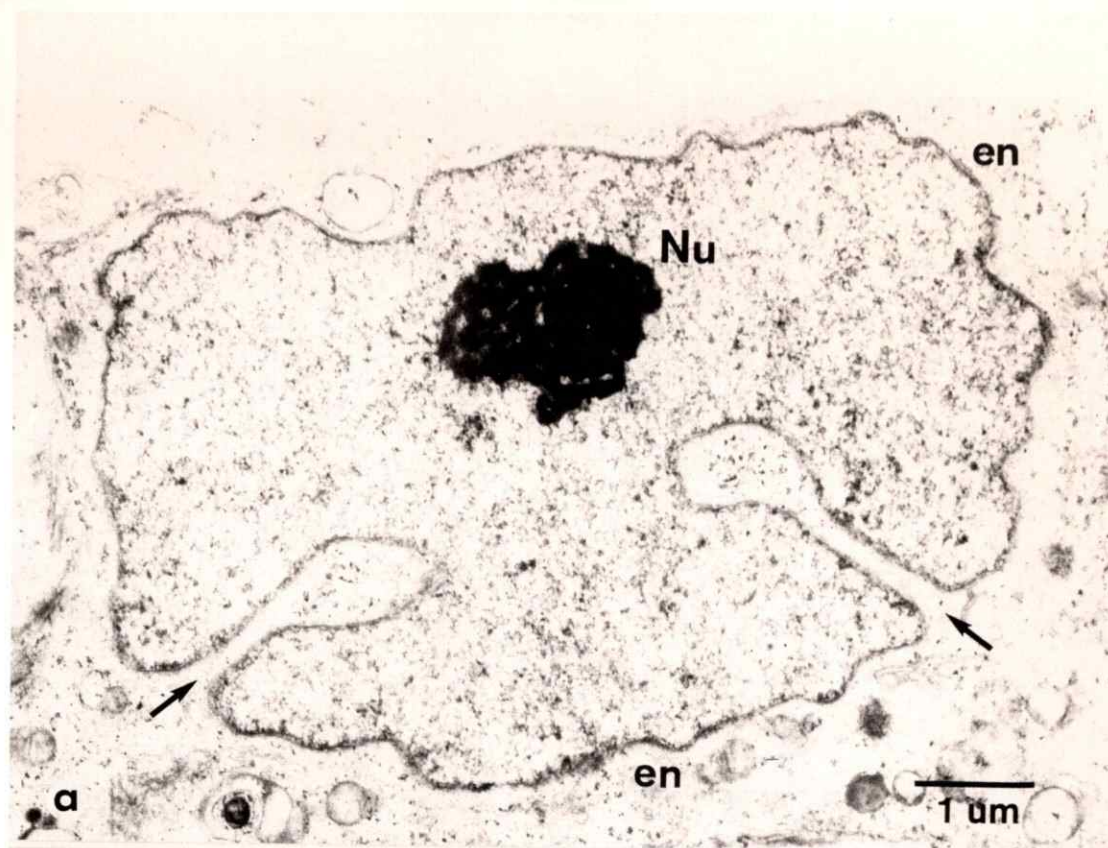


FIGURA 14

Los nucléolos de los meiocitos en preleptoteno y leptoteno.

a - c) Serie parcial de un meiocito en preleptoteno. En el núcleo se observan dos FC-NOR diferentes y distantes relacionados entre sí a través de zona granular. Cada FC-NOR aparece rodeado de zona fibrilar (f-Nu) y luego por zona granular (g-Nu).

d y e) Dos imágenes secuenciales de un Espermatozocito en Leptoteno. En la periferia nuclear se observan tres FC-NOR (↑). Rodeando a cada FC-NOR aparece zona fibrilar (f-Nu) y luego se extiende a la zona granular. Las zonas granulares provenientes de FC-NOR próximos pueden coalescer (g-Nu). El material nucleolar que se origina en uno de los FC-NOR aparece estrechamente unido a la cromatina del XY.

↑ : FC-NOR
f-Nu : zona fibrilar de Nucléolo
g-Nu : zona granular de Nucléolo
en : envoltura nuclear

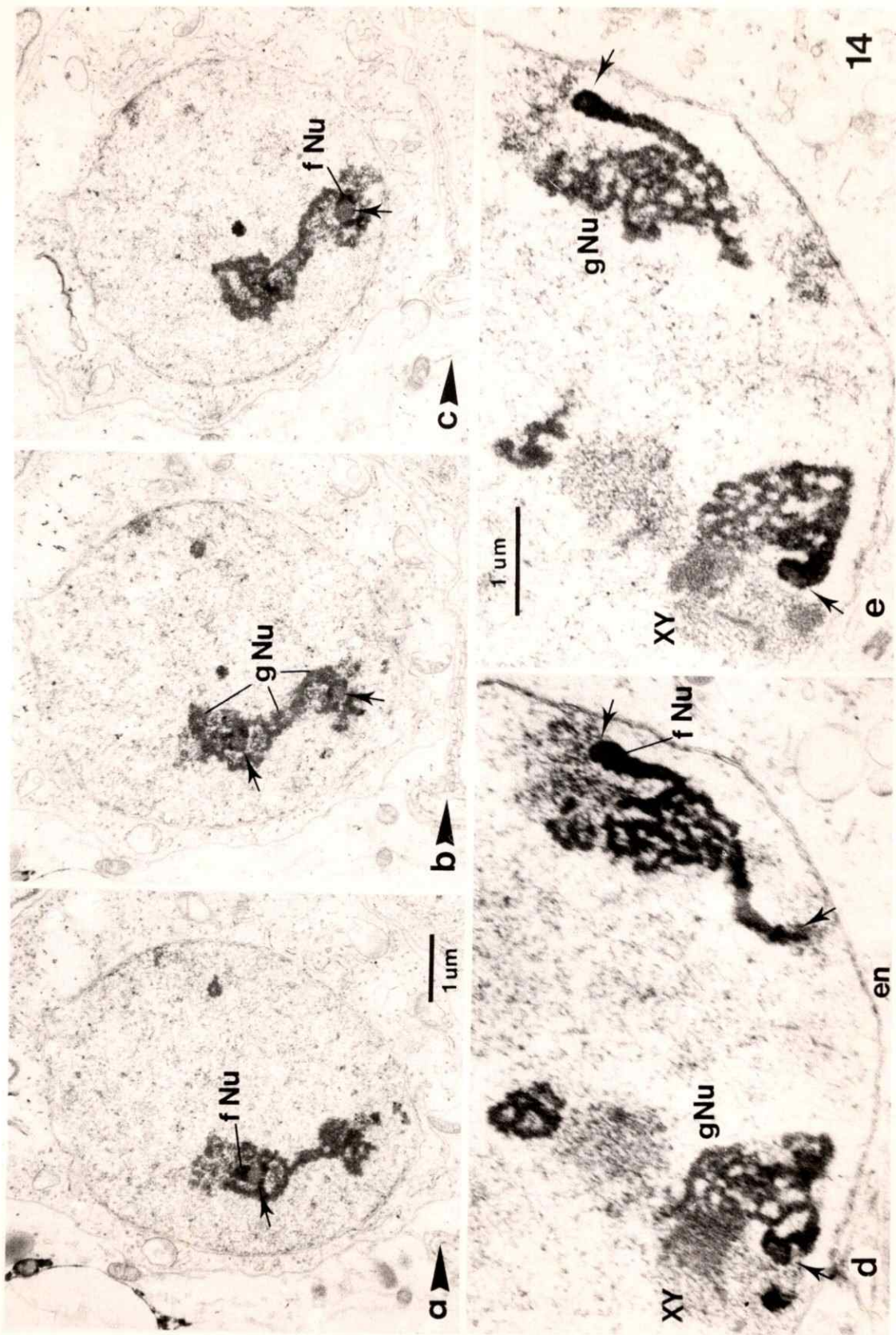


FIGURA 15

Los Dominios Nucleolares de los Espermatocitos en Zigoteno, Paquiteno temprano.

Se observan cuatro imágenes secuenciales (a, b, c, d) del mismo núcleo en el cual se aprecian tres Dominios Nucleolares, cada uno con un desarrollo nucleolar semejante.

En cada Dominio Nucleolar se aprecia un FC-NOR rodeado de zona fibrilar y luego de zona granular. El FC-NOR aparece en relación al Complejo Sinaptonémico del respectivo Bivalente Nucleolar (CS). Cromatina del BK ligeramente condensada rodea al CS antes de su inserción en la envoltura nuclear (▲). La zona granular del nucléolo de uno de los Dominios Nucleolares aparece estrechamente unida al bivalente XY.

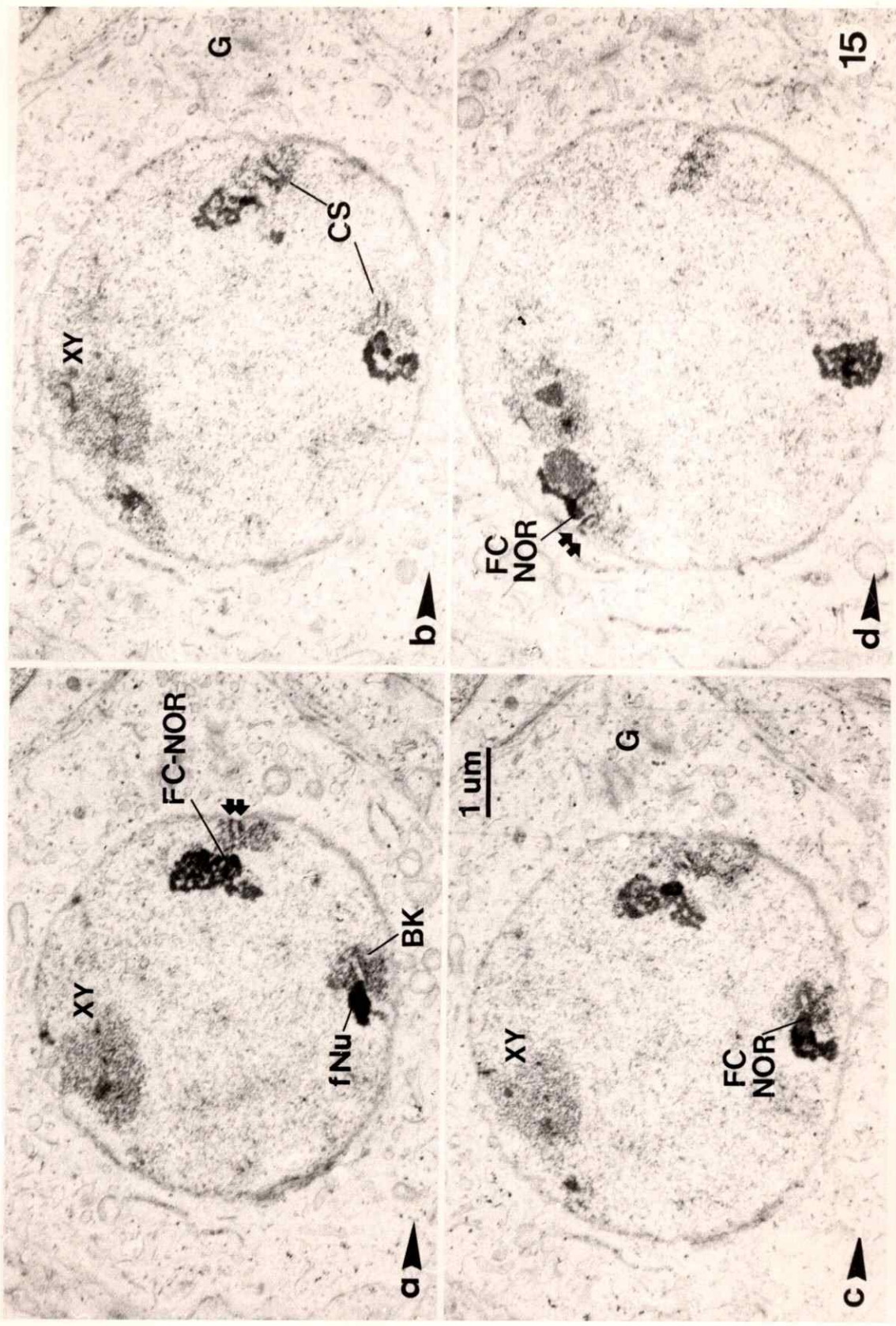


FIGURA 16

Cambios en la organización del nucléolo en diferentes etapas de la profase meiótica de los Espermatoцитos.

- a) En Leptoteno, en torno al FC-NOR se observan fibrillas y más lejano a él algunos gránulos.
- b) En Zigoteno, el FC-NOR aparece unido al Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar en proximidad a la inserción del telómero 1 en la envoltura nuclear. El FC-NOR está rodeado de fibrillas y de trabéculas de fibrillas y gránulos.
- c - e) En Paquiteno temprano, el material nucleolar se distribuye en forma ordenada. Adyacente al FC-NOR se observan las fibrillas (f-Nu) y hacia el centro del núcleo los gránulos (g-Nu). El Complejo Sinaptonémico al cual el FC-NOR aparece unido corresponde por su longitud desde el telómero 1 (T_1) hasta el telómero 2 (T_2) a un Bivalente G.
- f - g) Detalle de la distribución ordenada del material nucleolar compuesto por fibrillas (f-Nu) y gránulos (g-Nu) desde el FC-NOR inmerso en cromatina del BK. La granulación ocurre junto a cromatina del bivalente sexual (XY).
- h) En Paquiteno Medio, el nucléolo aparece compuesto únicamente por gránulos, los cuales conforman una apretada esfera que se mantiene conectada al FC-NOR; CC: Cromatina de Conexión; BK: basal knob.
- i) En Paquiteno avanzado, la esfera de material nucleolar granular aparece desprendida de su unión cromosómica. *: cuerpo proteico (ex FC-NOR).

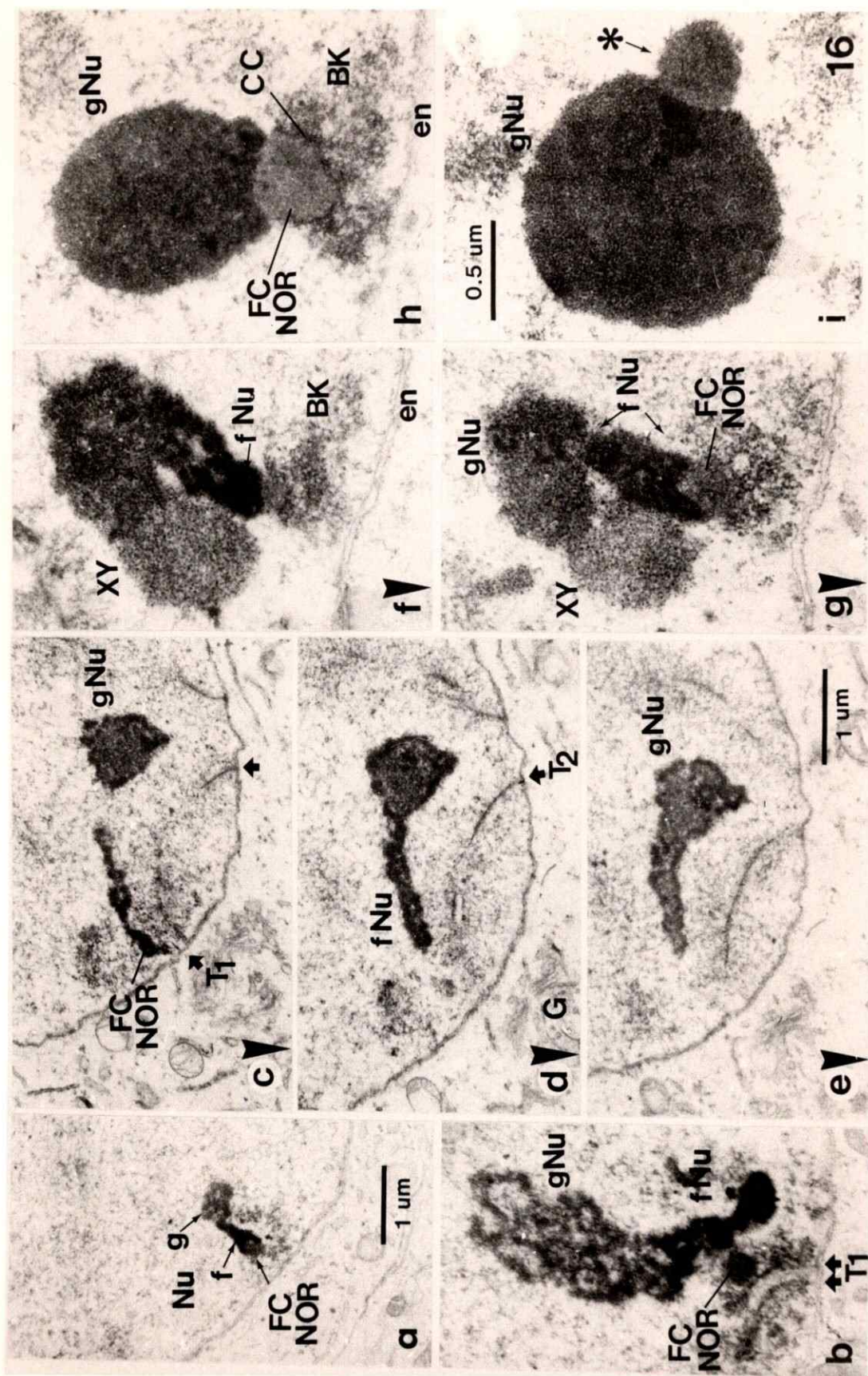


FIGURA 17

Organización del Bivalente y Dominio Nucleolar del Espermatozoido en Paquiteno.

- a) Sección contrastada con uranilo y plomo y observada al microscopio electrónico.
- b) Esquema representativo de todos los componentes del Dominio Nucleolar y del Bivalente completo.

T₁ : Telómero 1 o nucleolar

T₂ : Telómero 2 o no nucleolar

Nu : Nucléolo compuesto por gránulos

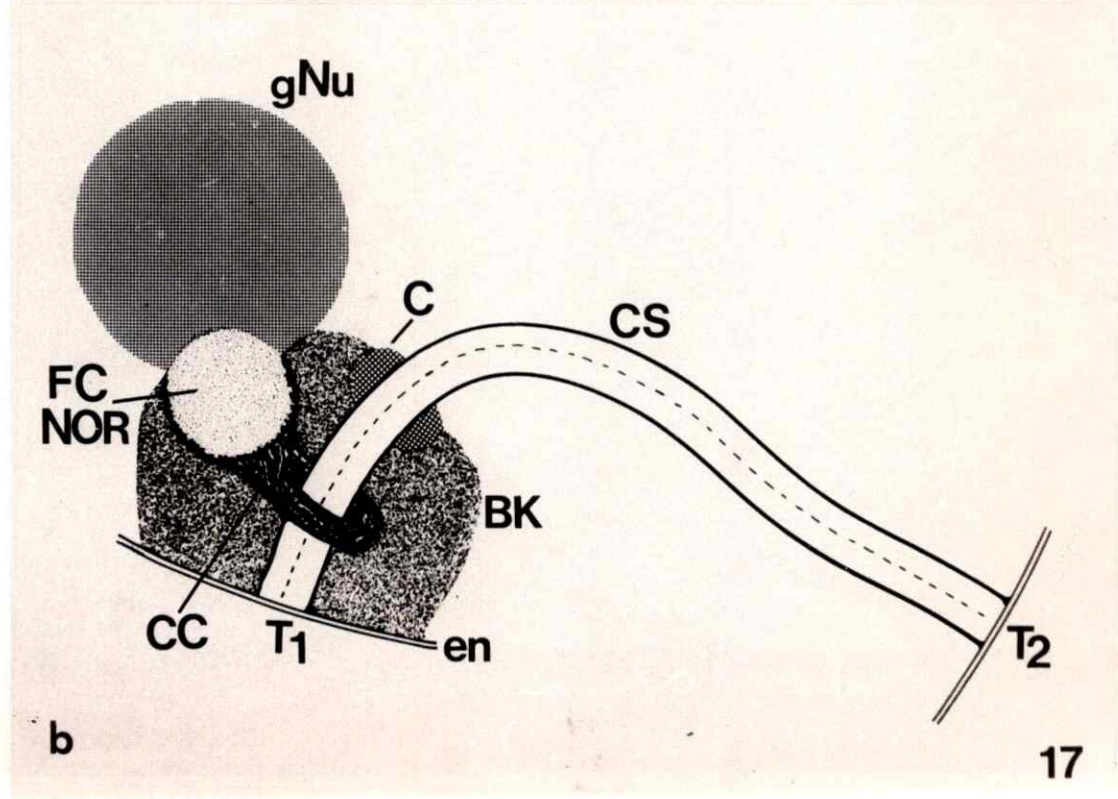
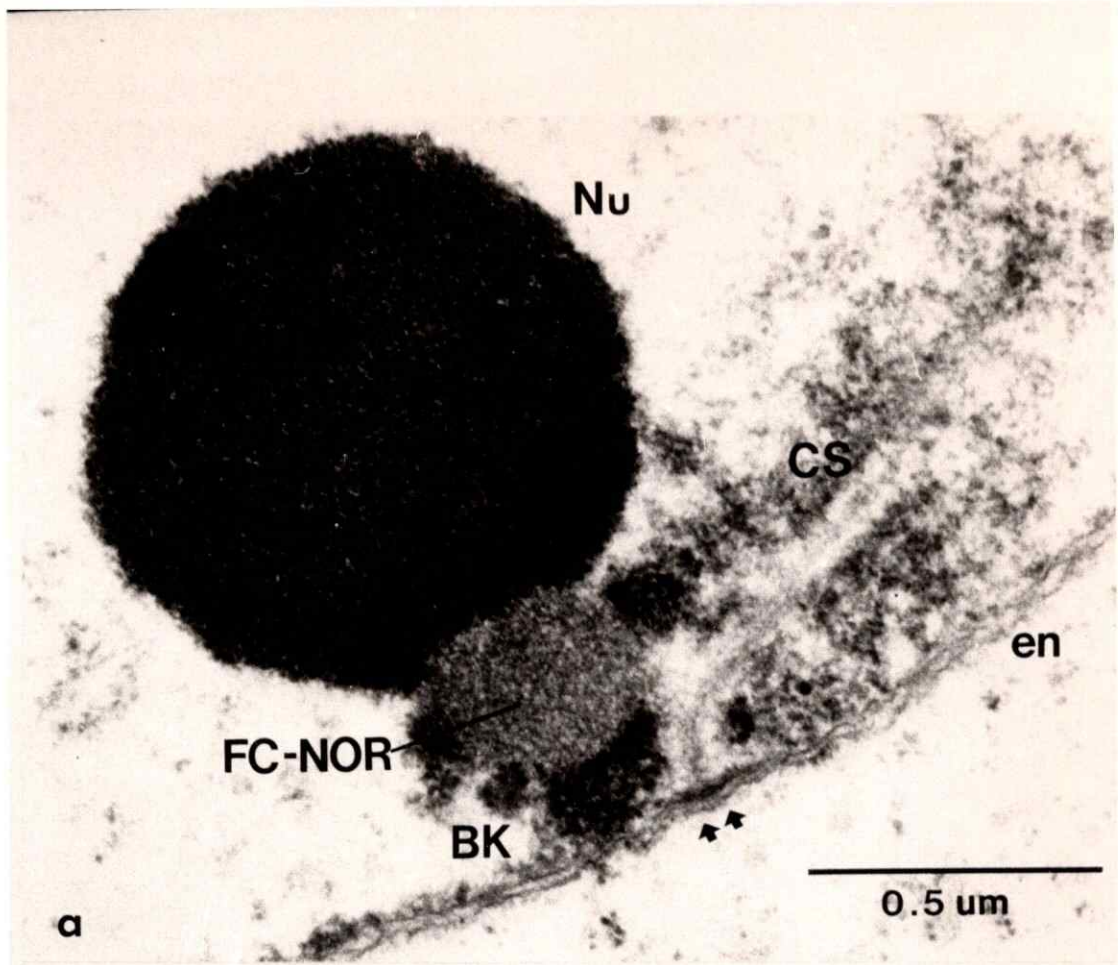
FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del Nucléolo.

BK : Cromatina condensada basal

CS : Complejo Sinaptonémico

CC : Cromatina de Conexión

en : envoltura nuclear



4. ASOCIACIONES DE BIVALENTES EN LOS DOMINIOS NUCLEOLARES

4.1. Características generales de las asociaciones de Bivalentes, observadas en cortes seriados de nucleos

Las secuencias de cortes de Espermatoцитos observados al microscopio de luz, revelan un conjunto de opciones posibles de posición y de relaciones entre los Bivalentes que concurren a formar los Dominios Nucleolares (Fig. 18). El número de Bivalentes Nucleolares comprometido en un determinado Dominio Nucleolar se estima por el número de BKs que se puede distinguir dentro de él. Cuando los BK asociados y adosados a la envoltura nuclear son dos, se disponen uno al lado del otro (Figs. 18b, d y e). Cuando son tres o más, se disponen en forma de rosetas. Estas configuraciones se infieren fácilmente a través de la observación de cortes secuenciales. En los Dominios Nucleolares en que hay más de un BK reunidos, la esfera de material nucleolar es única y con las características que se describieron para los Dominios Nucleolares con un BK (Figs. 18a, b, d, e).

En la periferia del núcleo es frecuente encontrar al Dominio Nucleolar unido o en estrecha contigüidad con el bivalente XY y ambos en contacto con la envoltura nuclear (Figs. 18c y d). En otros casos el Dominio Nucleolar aparece unido directamente al ápice del bivalente XY (Fig. 18e), pudiendo estar comprometidos uno o más BKs. Esta situación implica que pueden ser varios los Bivalentes Nucleolares participantes de esta unión, además de que sus telómeros nucleolares (T_1) no están insertos en la envoltura nuclear.

En la Tabla 3 se describe la localización y asociaciones de Bivalentes Nucleolares encontradas en 10 núcleos de Espermatoцитos en Paquiteno, reconstruídos completos. Todos poseen al menos un nucléolo mayor a $2.5 \mu\text{m}$ de diámetro. Cuatro de ellos tienen además otro nucléolo de un tamaño inferior a $2.0 \mu\text{m}$ de diámetro. Todos los nucléolos grandes son periféricos a excepción de uno. Seis de estos nucléolos están unidos a un solo BK. Los otros cuatro están unidos a más de un BK. En los diez núcleos analizados, dos presentaron asociaciones entre el Dominio Nucleolar y el bivalente XY.

En uno, la asociación ocurrió en la periferia del núcleo, y en el otro, entre el Dominio Nucleolar y el ápice del bivalente XY, alejados de la periferia nuclear.

Las situaciones encontradas son representativas de las opciones de relación de los Bivalentes Nucleolares (Fig. 18). Sin embargo, no es posible predecir con qué frecuencia puedan presentarse cada una de estas asociaciones en diferentes Espermatocitos y en diferentes individuos. Esto se debe a que desconocemos la real extensión de la variabilidad de las asociaciones, así como también, el valor de la ingerencia de los distintos factores involucrados. En todo caso, si tenemos en cuenta los datos reunidos en la Tabla 3 podemos estimar en forma alzada para ese grupo de Espermatocitos de un individuo la presencia de algún tipo de asociación en 4 de cada 10 Espermatocitos.

T A B L A 3

LOCALIZACION DE DOMINIOS NUCLEOLARES Y ASOCIACIONES DE BIVALENTES NUCLEOLARES EN 10 NUCLEOS EN PAQUITENO, TOMADOS AL AZAR DE UN INDIVIDUO Y RECONSTRUIDOS COMPLETOS

| Núcleo | Nucléolos | | Número de "Basal Knobs" Asociados al Nucléolo > | Relación entre Nucléolo y Bivalente XY |
|--------|------------------------|------------------------------|---|--|
| | Número | Localización | | |
| N° 1 | 1 grande* 1 chico** | periférico*** periférico | 2 | Proximidad periferia |
| N° 2 | 1 grande 1 chico | periférico periférico | 1 | Proximidad periferia |
| N° 3 | 1 grande | periférico | 1 | No |
| N° 4 | 1 grande | periférico | 1 | No |
| N° 5 | 1 grande | periférico | 2 | No |
| N° 6 | 1 grande 1 chico | periférico periférico | 3 | No |
| N° 7 | 1 grande | periférico | 2 | Asociación periférica |
| N° 8 | 1 grande | periférico | 1 | No |
| N° 9 | 1 grande | periférico | 1 | No |
| N° 10 | 1 grande 2 chicos | No periférico periféricos | 1 | No basales Asociación No periférica |

* Nucléolo Grande = mayor de 2.5 µm de diámetro

** Nucléolo Chico = menor de 2.0 µm de diámetro

*** Periferia = sector del núcleo junto a la envoltura nuclear cuyo espesor corresponde a aproximadamente 1/3 el radio del núcleo

4.2. Organización y estructura fina de las asociaciones de Bivalentes, observadas en cortes seriados de Dominios Nucleolares

Se analizaron al microscopio electrónico 20 Dominios Nucleolares compuestos por más de un Bivalente (10 de 2 Bivalentes; 6 de 3 Bivalentes y 4 de 4 Bivalentes). El número de Bivalentes se infiere del número de Complejos Sinaptonémicos y de la dimensión de la masa de cromatina originada de los BK asociados.

En los 10 Dominios Nucleolares compuestos por dos Bivalentes Nucleolares, siempre el FC-NOR es uno y queda situado entre la cromatina del BK de cada Bivalente (Figs. 10e, 19, 20 y 21). La inserción del telómero nucleolar (T_1) de cada Bivalente se realiza en forma independiente uno del otro y rodeados ambos de la cromatina del BK correspondiente (Figs. 10e, 19, 20 y 21). El recorrido de los Complejos Sinaptonémicos en las asociaciones de dos Bivalentes Nucleolares es siempre muy semejante. Los telómeros no nucleolares (T_2) están insertos en puntos distantes de la envoltura nuclear,

distancia que está en relación a la longitud de cada Complejo Sinaptonémico. Por exclusión de longitud de los Complejos Sinaptonémicos, las 10 asociaciones de dos Bivalentes estudiadas fueron estimadas en: 6 DG, 3 GG y 1 DD. Cada Complejo Sinaptonémico sigue un arco, de manera tal que los extremos T_1 de dos Bivalentes Nucleolares convergen a un mismo Dominio Nucleolar (Figs. 20 y 21). En estos casos, generalmente uno de los Complejos Sinaptonémicos está claramente unido al FC-NOR a través de la Cromatina de Conexión (Figs. 19 y 21); el segundo Complejo Sinaptonémico puede o no aparecer conectado al FC-NOR mediante la Cromatina de Conexión (Fig. 20).

Cuando son tres los Bivalentes asociados (Figs. 22 y 23), los BK respectivos se unen formando una roseta, situación que se aprecia con mayor facilidad en una serie de cortes cuya orientación sea transversal respecto del nucléolo (Fig. 22). La masa de cromatina de los tres BK se adhiere ampliamente a la envoltura nuclear (Figs. 22a, b, c y 23). En cada BK, se observa el respectivo Complejo Sinaptonémico nucleolar que lo atraviesa y cuyo T_1

está inserto en la envoltura nuclear (Figs. 22a, b, c, d; 23d, h). Entre sí, los arcos que describen los tres Complejos Sinaptonémicos son convergentes hacia el T_1 y divergentes hacia el T_2 , formando una figura semejante a una letra Y (Figs. 22c, d). De los seis Dominios Nucleolares analizados dos fueron GGD; de los restantes sólo se comprobó que los tres Complejos Sinaptonémicos emergieran de la masa de cromatina de los BK. En el ápice de la cromatina de los BK se observa un solo FC-NOR que mide entre 500 y 1000 nm de diámetro, el cual aparece rodeado por Cromatina de Conexión (Figs. 22e, f, g, h y 23e, f, g, h, i) que lo une al menos a uno de los tres Complejos Sinaptonémicos comprometidos en el Dominio Nucleolar. Hacia la superficie distal del FC-NOR, aparece el material nucleolar granular organizado en la esfera compacta típica (Figs. 22 y 23).

Son pocos los Dominios Nucleolares en que hemos detectado claramente a cuatro Bivalentes asociados. En estos casos, hemos observado que los T_1 se insertan en la envoltura nuclear (Fig. 24). Sin embargo, los ejes cromosómicos homólogos no siempre

están apareados formando Complejo Sinaptonémico (Figs. 24c, d). Las distancias entre los T_1 heterólogos pueden resultar inferiores que aquellas entre T_1 homólogos no apareados, situación que a veces ocurre también en las asociaciones de dos o de tres Bivalentes. Situaciones como estas dificultan la identificación de las respectivas inserciones de los Bivalentes participantes, al mismo tiempo que son indicativas de la estrecha proximidad en la que pueden estar telómeros nucleolares heterólogos dentro de la cromatina del Dominio Nucleolar.

En los Dominios Nucleolares de cuatro Bivalentes, generalmente la Cromatina de Conexión une al FC-NOR a dos o tres Complejos Sinaptonémicos o a ejes simples. La disposición de estos Bivalentes entre si no parece seguir un comportamiento regular como en las situaciones anteriores, evaluación que se basa en el análisis de sólo cuatro asociaciones de cuatro Bivalentes (Fig. 24).

En las cuatro series analizadas se comprobó sólo la emergencia de los cuatro Complejos Sinaptonémicos de sus respectivos BK asociados. En uno de

estos casos, más bien parecía la asociación de dos Dominios Nucleolares, cada uno de dos Bivalentes.

Dominios Nucleolares en los cuales participan los 5 Bivalentes Nucleolares no hemos encontrado.

Estas observaciones son concordantes con las realizadas al microscopio de luz respecto de la estrecha asociación que puede existir entre los Bivalentes Nucleolares. En efecto, ellas se corresponden con las asociaciones entre cromómeros nucleolares encontradas en los esparcidos de bivalentes meióticos (Figs. 5d y e) y con las asociaciones de BK observadas en series de cortes de núcleos (Figs. 18b, d y e) (Tabla 3).

Otras asociaciones de Bivalentes frecuentemente observadas son las que ocurren entre uno o más Bivalentes Nucleolares y el bivalente sexual. Se caracterizó a 25 de estas asociaciones, las cuales están presentes en la periferia del núcleo, o alejadas de la envoltura nuclear, como hemos visto en la sección 4.1.

Cuando ocurren en la periferia, los Bivalentes sexual y Nucleolar están contiguos por la inserción de los respectivos telómeros en un área muy próxima de la envoltura nuclear (Figs. 25a, b, c, d). En estos casos quedan además en contacto las cromatinas de uno y otro Bivalente y el nucléolo, (Figs. 25a, b, c, d). El Complejo Sinaptonémico nucleolar desde su inserción en la envoltura nuclear sigue un recorrido, que puede estar alejado, muy próximo, o inmerso en la cromatina del bivalente XY.

En Espermátocitos en Zigoteno, hemos observado asociaciones entre varios Bivalentes Nucleolares y el bivalente XY, también en la periferia del núcleo (Fig. 26). En estos casos, los T_1 de todos los Bivalentes Nucleolares que participan en la asociación están insertos a la envoltura nuclear en un área circundante a la de adhesión de la cromatina XY (Figs. 26a y b). Los nucléolos de forma alargada y compuestos de material fibrinogranular, están unidos por un extremo al FC-NOR del respectivo Complejo Sinaptonémico nucleolar y por el otro, a la cromatina del bivalente XY sobre la cual se

aprecia la presencia de acúmulos de material granular (Figs. 26c, d, e).

Las asociaciones entre Bivalentes Nucleolares y el bivalente XY que ocurren alejadas de la envoltura nuclear, se caracterizan porque los T_1 de los Bivalentes Nucleolares no están unidos a la envoltura nuclear, sino a la superficie de la cromatina XY (Figs. 27a, b, c, d, e, f, g, h). En la Figura N° 28 se puede ver la unión de un Bivalente Nucleolar al ápice de la cromatina XY (una situación semejante a la que se observa en el Espermatocito de la Figura 18e). El Complejo Sinaptonémico del Bivalente Nucleolar y los ejes de los cromosomas sexuales se observan claramente (Fig. 28a). Sin embargo, el extremo T_1 del Complejo Sinaptonémico nucleolar no aparece organizado en la forma típica que tiene cuando está adherido a la envoltura nuclear. Sus extremos quedan libres y se confunden entre las fibras de las respectivas cromatinas en contacto (Figs. 27f, g, h; 28a y b).

En Espermatocitos en profase muy avanzada, la esfera de material nucleolar puede aparecer adheri-

da al ápice de la cromatina XY (Figs. 25e, e', f, f'). En estos casos, la esfera de material granular junto con el cuerpo residual del FC-NOR no están conectados a la cromatina del BK y no tienen una relación apreciable con el Complejo Sinaptonémico nucleolar. La cromatina de los cromosomas sexuales parece sostener esta masa de material nucleolar desprendida de su lugar de origen (Figs. 25e', f').

Por otra parte, en el bivalente XY del Paquitenio medio o tardío hemos observado frecuentemente masas esféricas ahuecadas de material electrondenso semejantes a las estructuras anilladas, descritas por Tres como relacionadas con la síntesis de RNA nucleolar y extranucleolar (Tres, 1975). Estos acúmulos fibrilares, aparecen en los bivalentes sexuales que están o no asociados a Bivalentes Nucleolares (Figs. 10c y d).

FIGURA 18

Asociaciones de Bivalentes en los Dominios Nucleolares. Observaciones al microscopio de luz.

- a) Zona de epitelio seminífero en Estado III - IV. Izquierda, Espermatocito en Zigoteno; Centro, dos Espermatocitos en Paquiteno; Derecha, espermátida de núcleo redondo.

En las figuras b, c, d y e, se muestra la situación nucleolar en Espermatocitos humanos en Paquiteno.

- b) Nucléolo unido a BK adosado a la envoltura nuclear.
- c) Un gran nucléolo y BK asociados por contiguidad al bivalente sexual y adosados a la envoltura nuclear.
- d) Un gran nucléolo y dos BK asociados entre sí y al bivalente sexual. El conjunto está adosado a la envoltura nuclear.
- e) Un nucléolo asociado íntimamente a través del BK al ápice del bivalente sexual y otro nucléolo en contacto con dos BK asociados entre sí y adosados a la envoltura nuclear.

▲ : basal knob (BK)

↑ : Nucléolo

XY : bivalente sexual

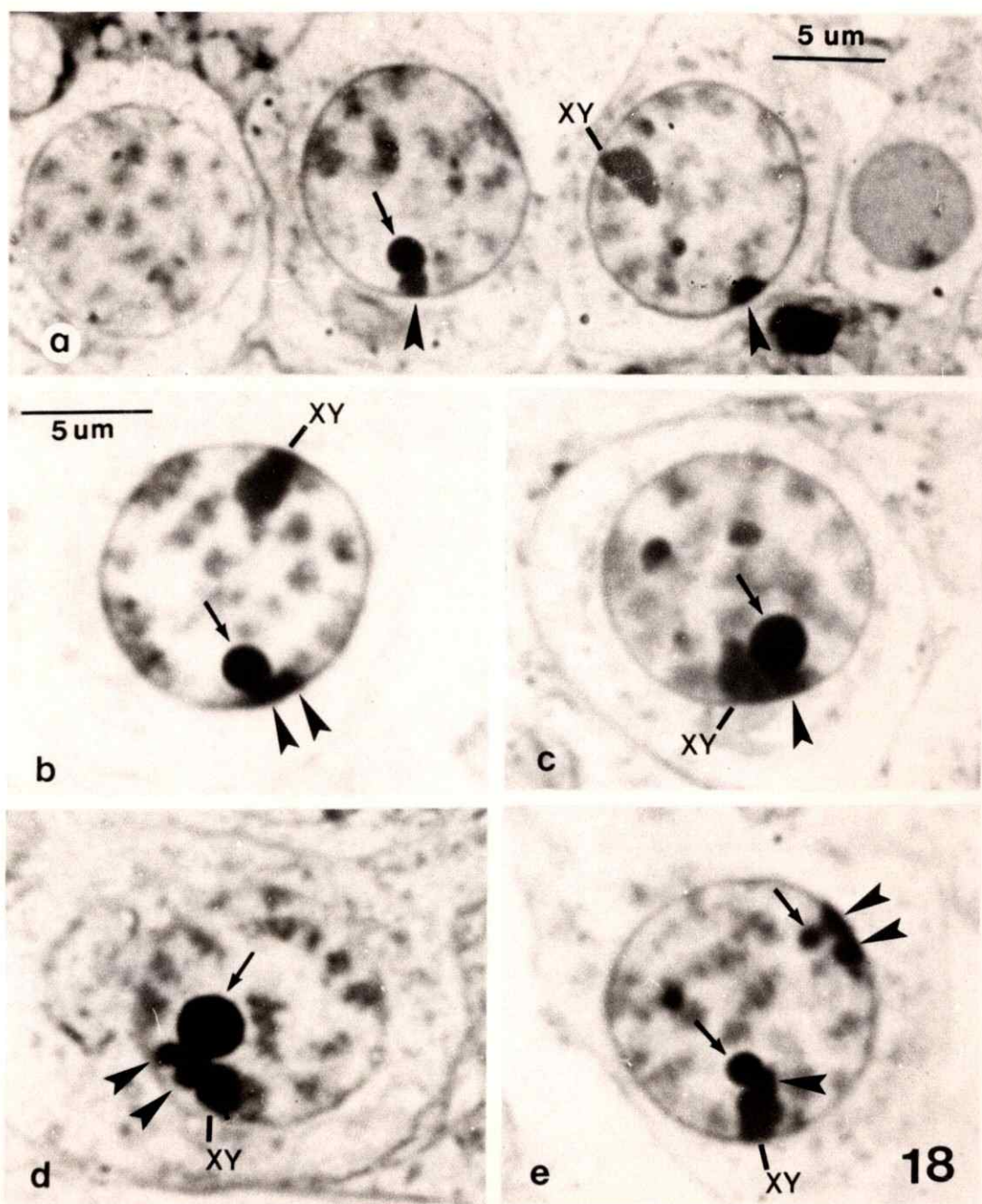


FIGURA 19

Asociación de dos Bivalentes Nucleolares en un Dominio Nucleolar.

a - e) Secuencia parcial de imágenes que ilustran los Complejos Sinaptonémicos de dos Bivalentes Nucleolares, uno G y otro D, asociados en un Dominio Nucleolar.

Nu : nucléolo compuesto principalmente de zona granular.

BK : basal knob o cromatina condensada basal

CS : Complejo Sinaptonémico

C : Centrómero

↑↑ : inserción a la envoltura nuclear del telómero 1 de cada Bivalente.

FC-NOR : Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

f) Esquema representativo de los Complejos Sinaptonémicos participantes en la asociación y su relación con el FC-NOR del Dominio Nucleolar.

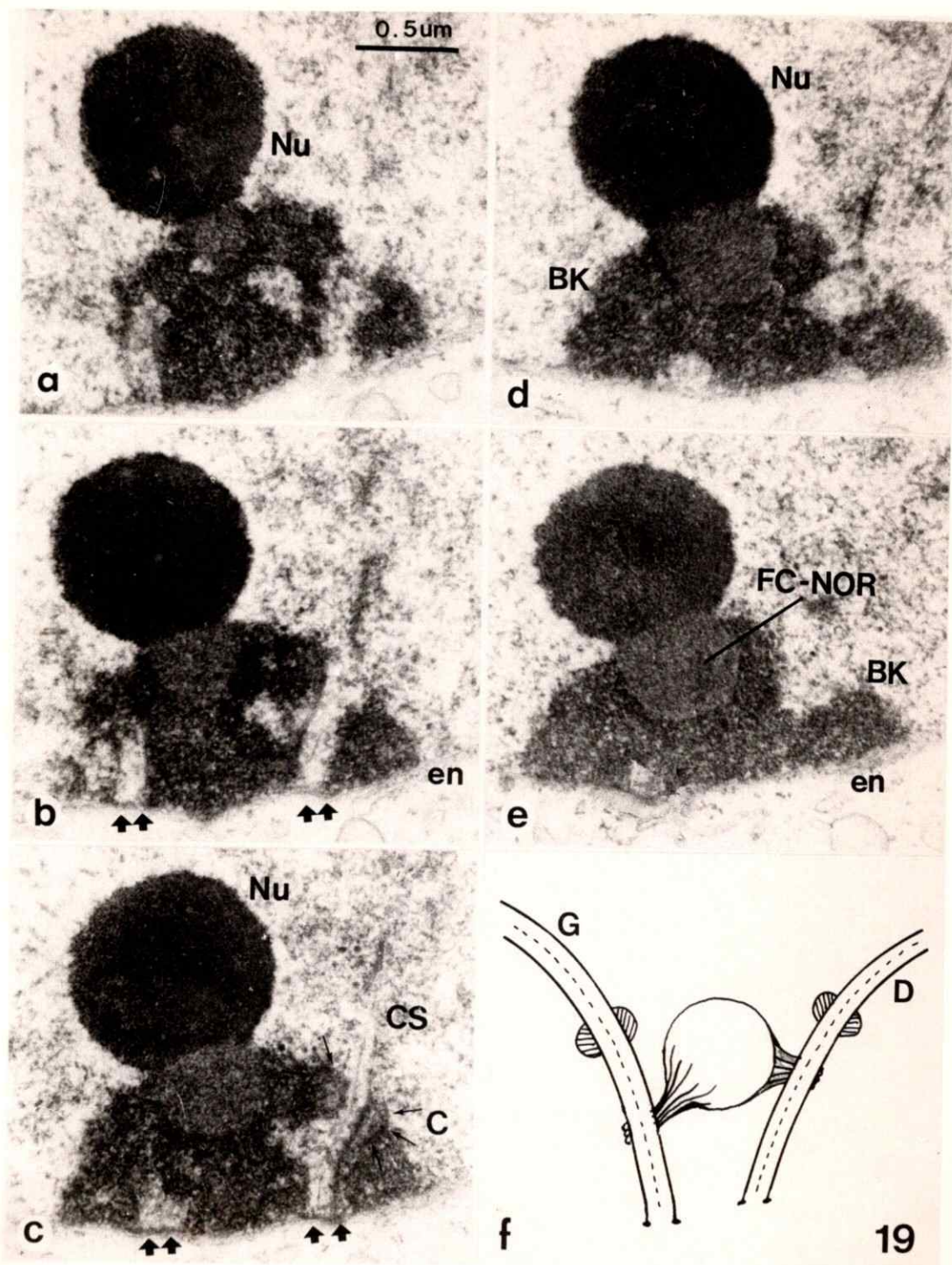


FIGURA 20

Asociación de dos Bivalentes Nucleolares en un Dominio Nucleolar.

a - g) Secuencia parcial de imágenes que ilustran la reunión de dos Complejos Sinaptonémicos, uno correspondiente a un Bivalente D y el otro a un Bivalente G, en un Dominio Nucleolar.

en : envoltura nuclear

BK : basal knob o cromatina condensada basal

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

f-Nu : fibrilar del Nucléolo

▲ : Complejos Sinaptonémicos de los Bivalentes

↑ : poros nucleares

h) Esquema representativo de los Complejos participantes en la asociación y su relación con el FC-NOR del Dominio Nucleolar, en una orientación transversal semejante a la de la serie.

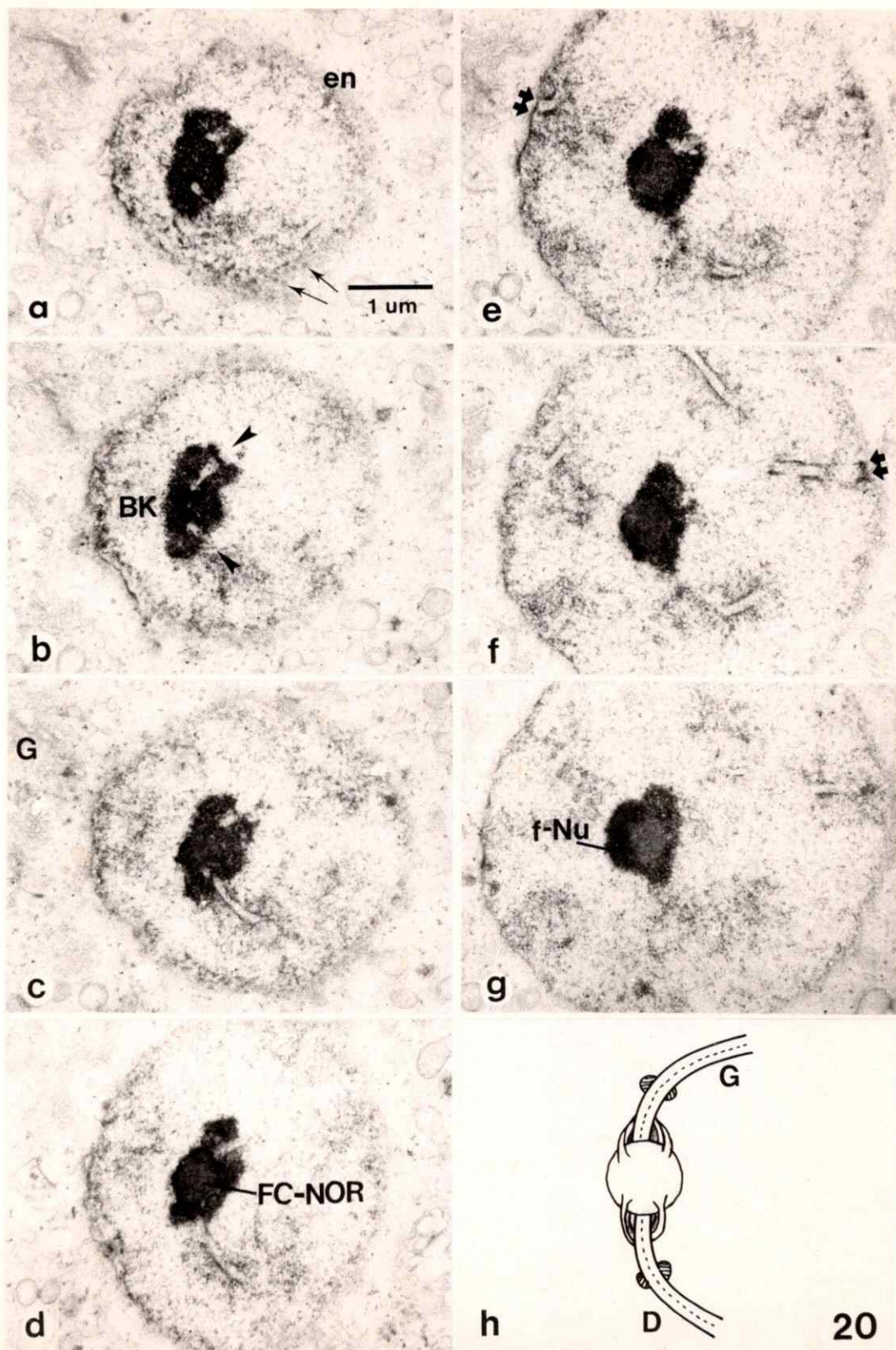


FIGURA 21

Asociación de dos Bivalentes Nucleolares en un Dominio Nucleolar.

a - g) Secuencia parcial de imágenes que ilustran la convergencia de dos Complejos Sinaptonémicos, ambos D, en un Dominio Nucleolar.

en : envoltura nuclear

BK : basal knob o cromatina condensada basal

CS : Complejo Sinaptonémico

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

Nu : Nucléolo compuesto principalmente de zona granular.

▲ : Complejos Sinaptonémicos de los Bivalentes

h) Esquema representativo de los Complejos Sinaptonémicos participantes en la asociación y su relación con el FC-NOR del Dominio Nucleolar.

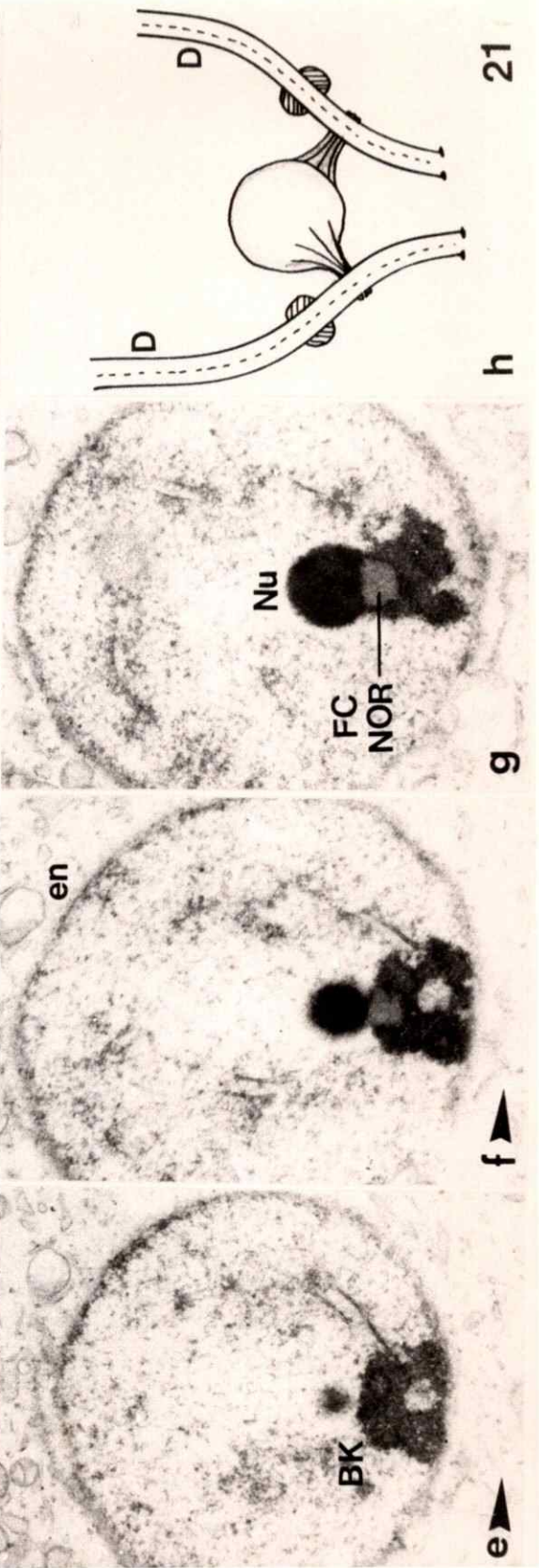
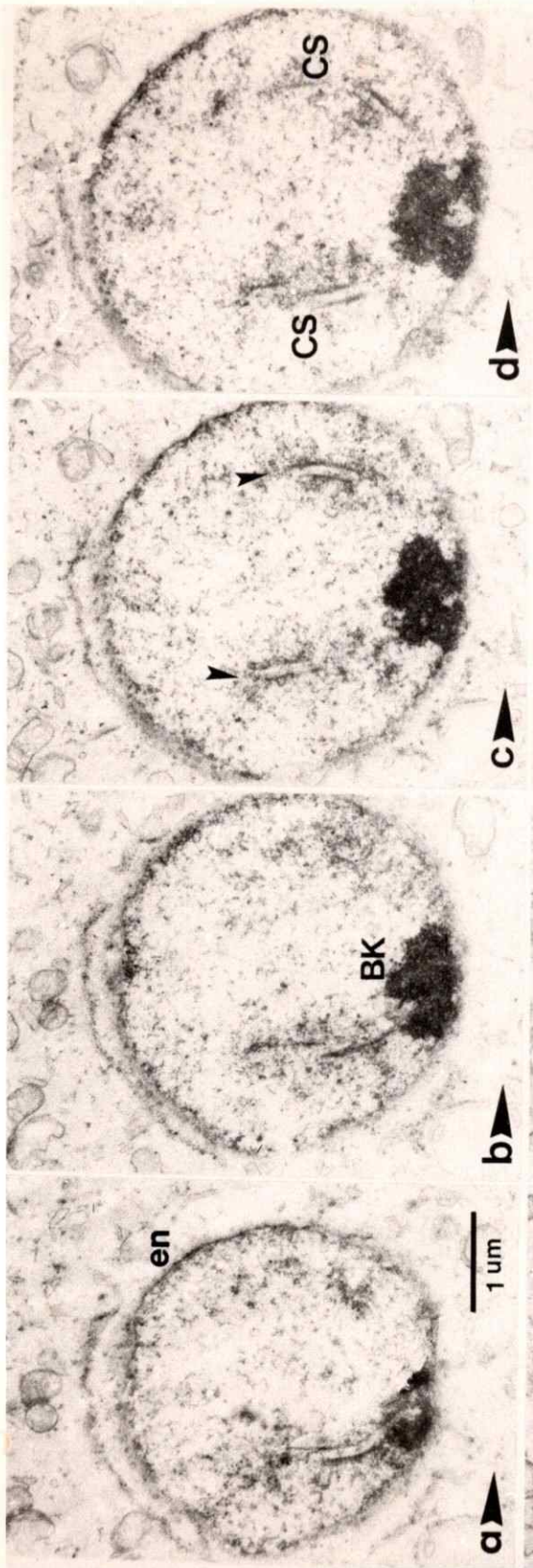


FIGURA 22

Asociación de tres Bivalentes Nucleolares en un Dominio Nucleolar.

a - j) Secuencia ordenada de imágenes de un Dominio Nucleolar desde el casquete del núcleo.

Se observan tres BK reunidos y a través de cada uno de ellos un Complejo Sinaptonémico. Por la longitud de éstos desde la inserción del telómero 1 (a) hasta la inserción del telómero 2 (d, e, h), dos corresponden a Bivalentes G y uno a un Bivalente D. Sobre los tres BK se encuentra el FC-NOR y luego la fibrilar del nucléolo.

en : envoltura nuclear

↑ : poros nucleares

▲ : BK de cada Bivalente asociado

↑↑ : inserción del telómero 2 o no nucleolar

BK : basal knob

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

f-Nu : zona fibrilar del nucléolo

Los Bivalentes comprometidos en este Dominio (GGD), su disposición, así como su relación con el FC-NOR, se corresponden con lo representado en el esquema de tres Bivalentes, de la figura 32.

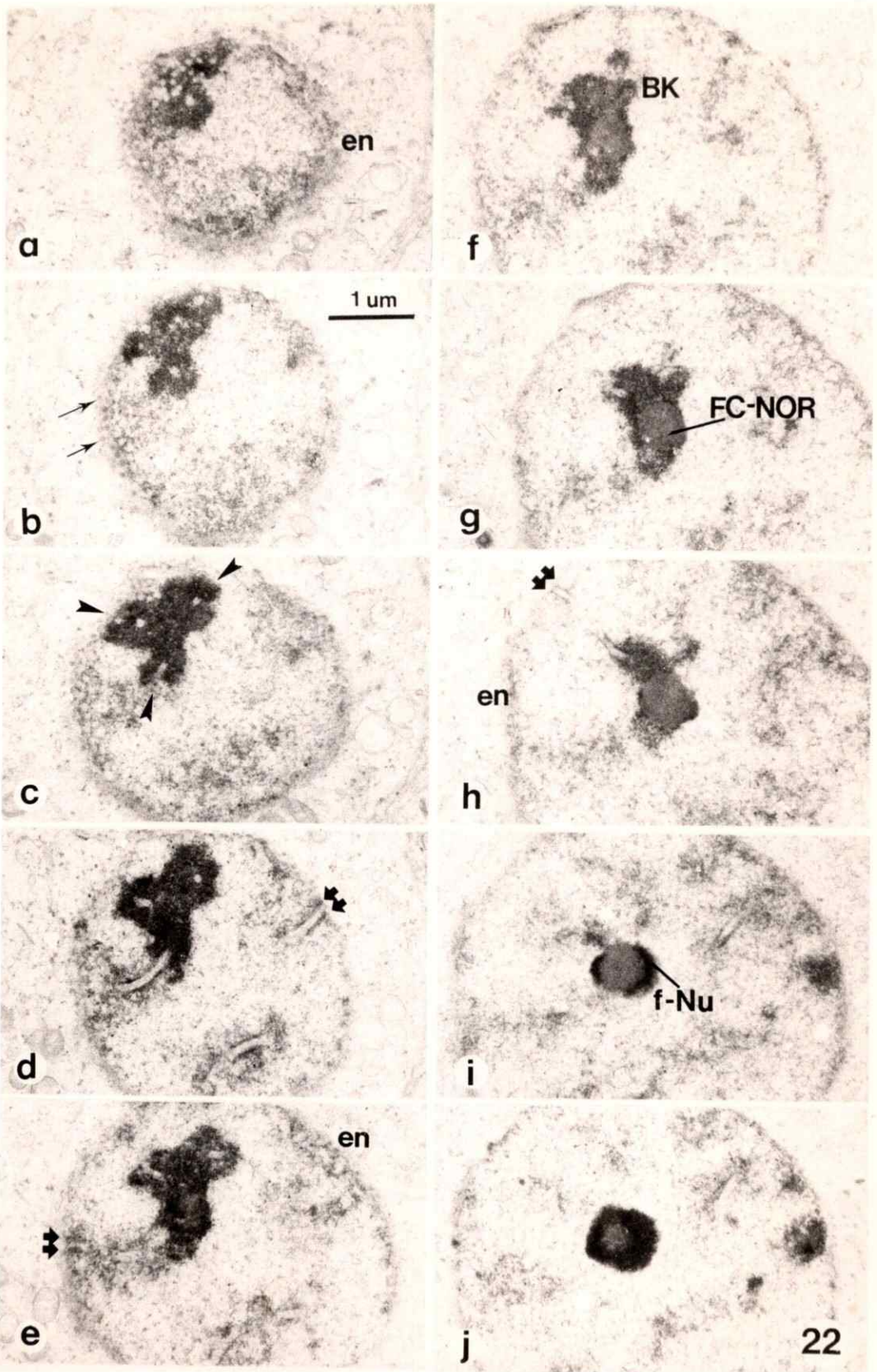


FIGURA 23

Asociación de tres Bivalentes Nucleolares en un Dominio Nucleolar.

a - j) Secuencia ordenada de imágenes de un Dominio Nucleolar. En el se observan las inserciones a la envoltura nuclear de los telómeros 1 de tres Bivalentes Nucleolares (↑↑). El FC-NOR y Nucléolo se encuentra en el centro de los BK que rodean a los Complejos Sinaptonémicos.

en : envoltura nuclear

BK : basal knob, o cromatina condensada basal

CS : Complejo Sinaptonémico

↑↑ : inserción del telómero 1 de un Bivalente

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

Nu : Nucléolo

k) Esquema representativo de los Complejos Sinaptonémicos participantes en la asociación, dos de ellos correspondientes a Bivalentes G y uno a un Bivalente D, y su relación con el FC-NOR del Dominio Nucleolar.

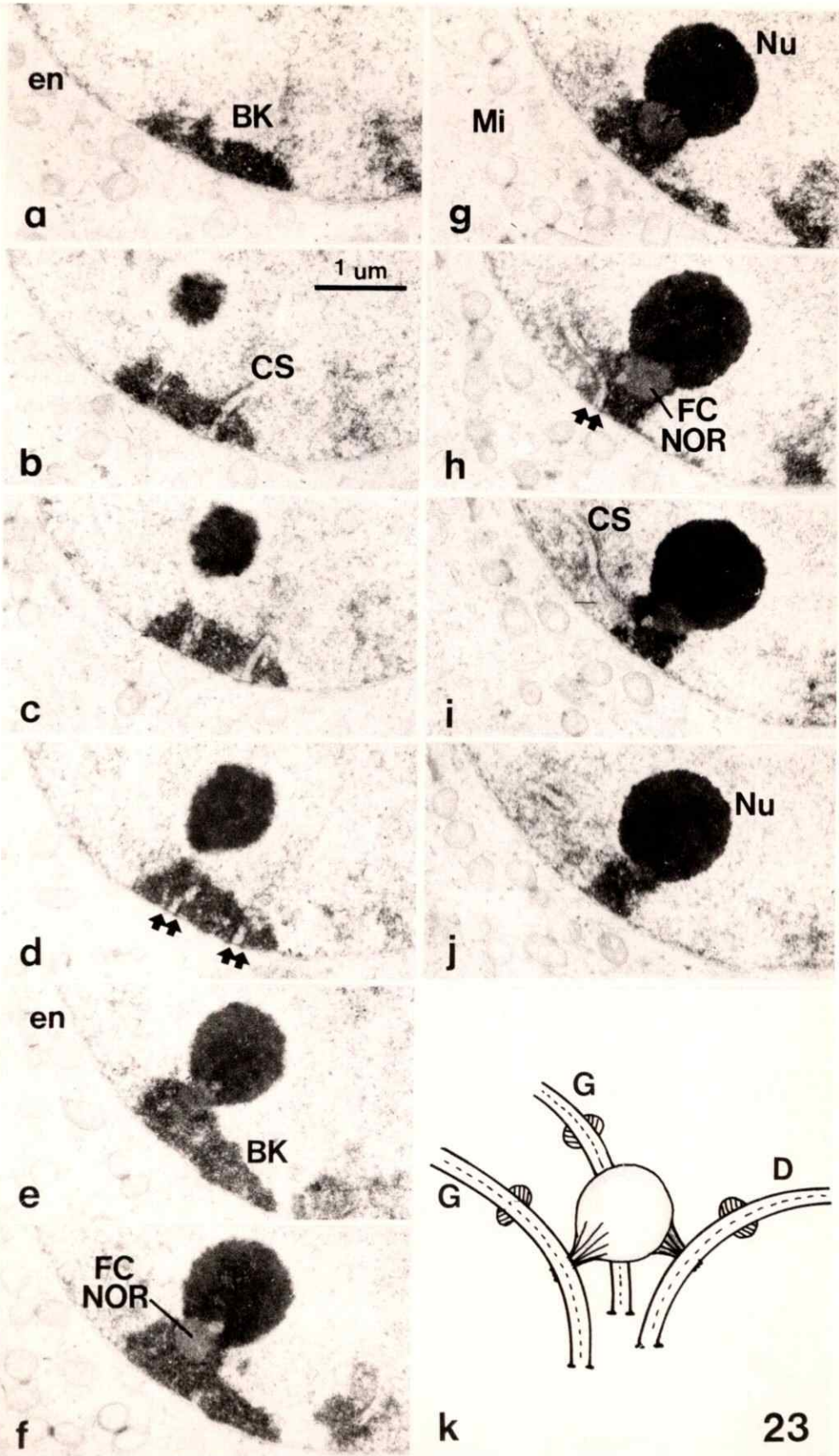


FIGURA 24

Asociación de cuatro Bivalentes Nucleolares en un Dominio Nucleolar.

- a - f) Secuencia ordenada de imágenes de un Dominio Nucleolar al cual concurren los extremos nucleolares de cuatro Bivalentes. En sólo dos Bivalentes se observan claramente los Complejos Sinaptonémicos y las inserciones de los respectivos telómeros 1 en la envoltura nuclear (e). En los otros, los telómeros homólogos no están apareados y se encuentran mezclados entre sí y rodeados por cromatina BK (b, d y g). A todo este conjunto se encuentra conectado un FC-NOR y nucléolo (Nu).
- g) Esquema representativo de los Complejos Sinaptonémicos y telómeros 1 comprometidos en esta asociación, y su disposición en el Dominio Nucleolar.

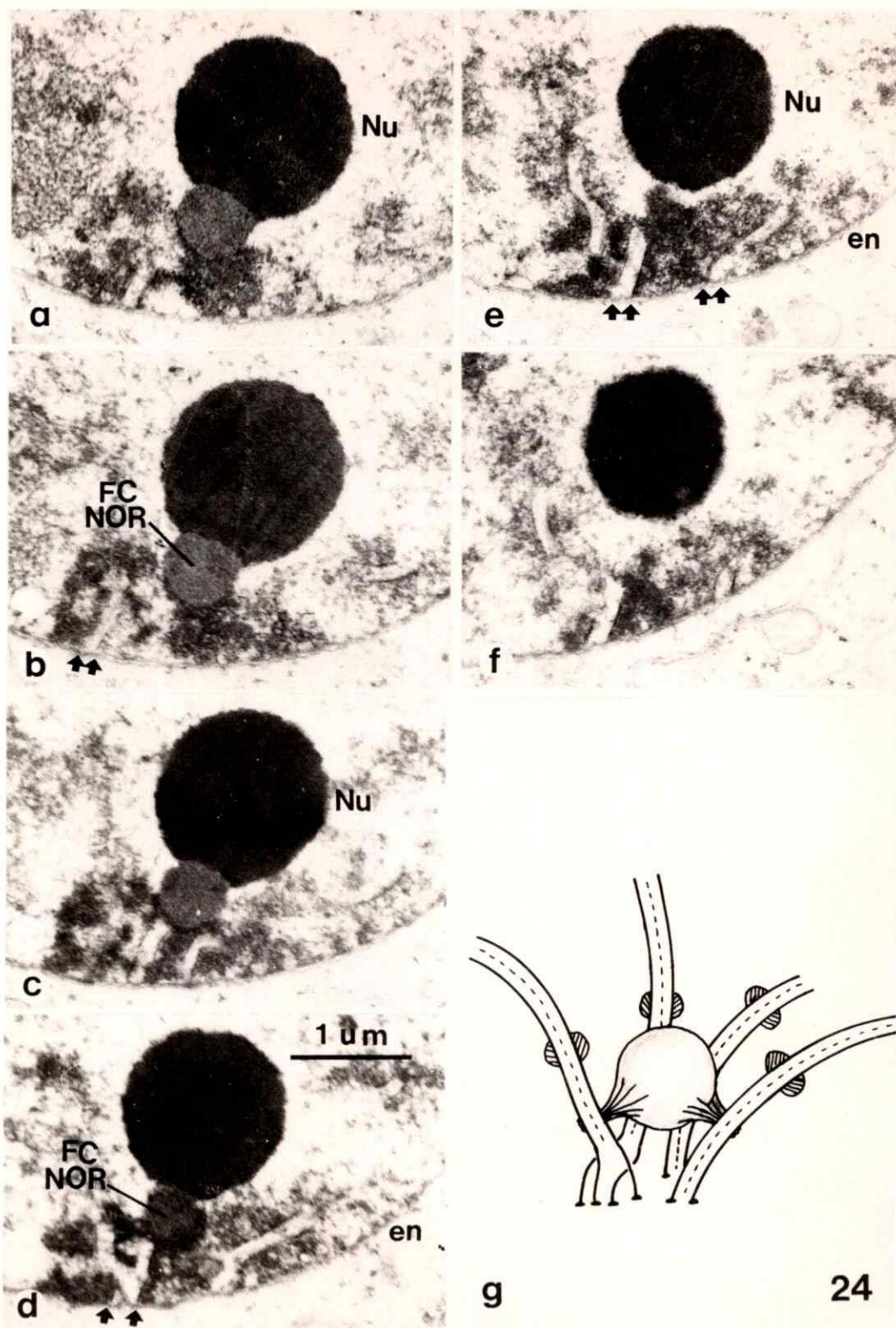


FIGURA 25

Asociación entre el bivalente XY y un Bivalente Nucleolar.

- a - d) En la periferia del núcleo, por contiguidad de las cromatinas del bivalente sexual y nucleolar ampliamente adheridas a la envoltura nuclear.
- e-f') Alejada de la periferia nuclear, por unión de un nucléolo ya desprendido al ápice de la cromatina del bivalente XY.

XY : bivalente sexual

T₁ : telómero 1 o nucleolar

: inserción del T₁

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del Nucléolo.

Nu : nucléolo compuesto principalmente de zona granular.

* : cuerpo proteico (ex FC-NOR)

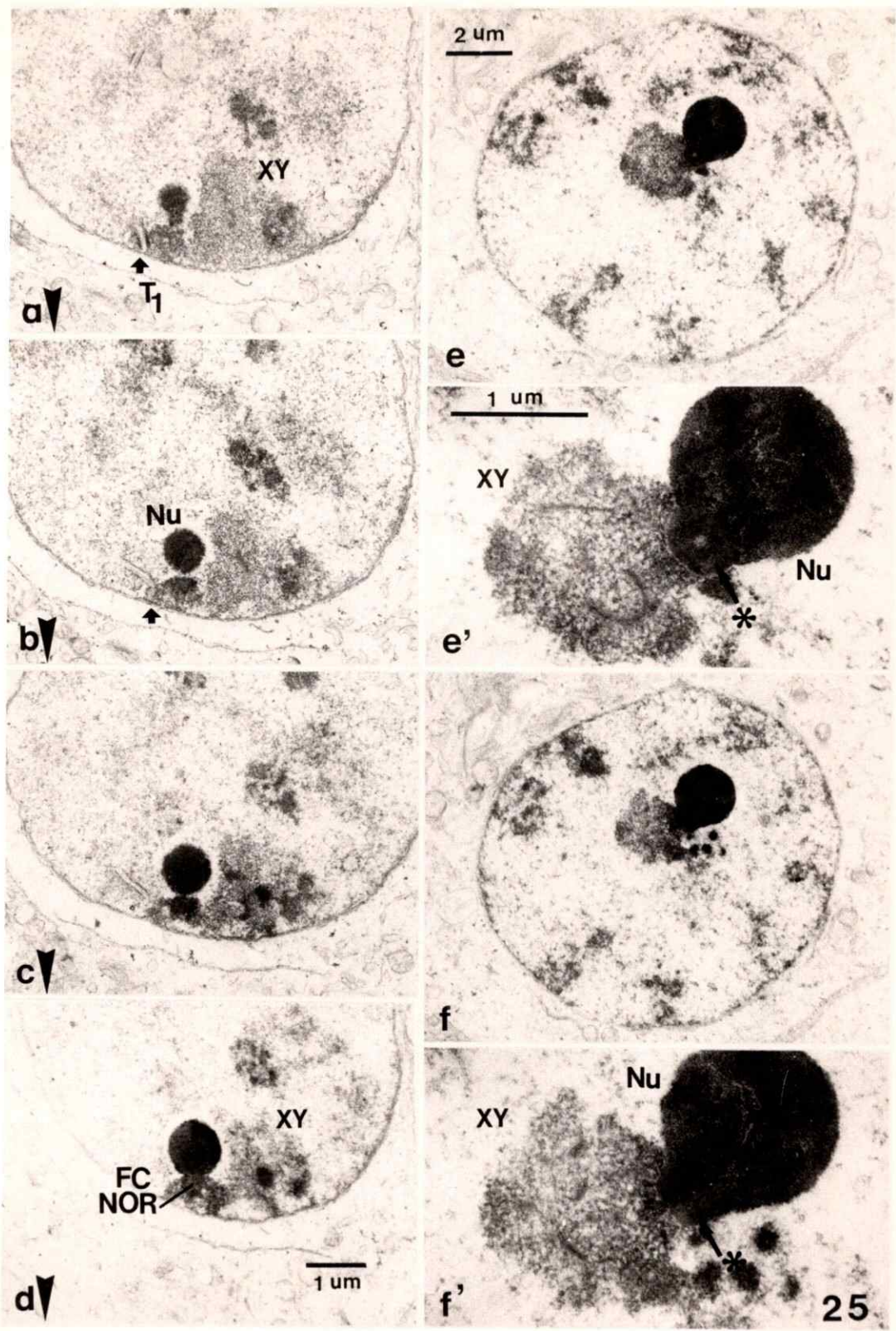


FIGURA 26

Asociación entre el bivalente XY y tres Bivalentes Nucleolares.

a - i) Secuencia ordenada de imágenes en las cuales se observa una estrecha asociación entre la cromatina XY (h) y la zona de granulación de Bivalentes Nucleolares (e) así como también, con la inserción de los telómeros 1 de los correspondientes Bivalentes (a). En el citoplasma circundante a la inserción de los ejes de los cromosomas sexuales (↑) se observa el centríolo y cisternas del aparato de Golgi.

T₁ : inserción a la envoltura nuclear del telómero 1 nucleolar.

XY : bivalente sexual

g-Nu : zona granular del nucléolo

f-Nu : zona fibrilar del nucléolo

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del Nucléolo.

G : cisternas del aparato de Golgi

↑ : inserción de los ejes de los cromosomas sexuales.

CTR : centríolo

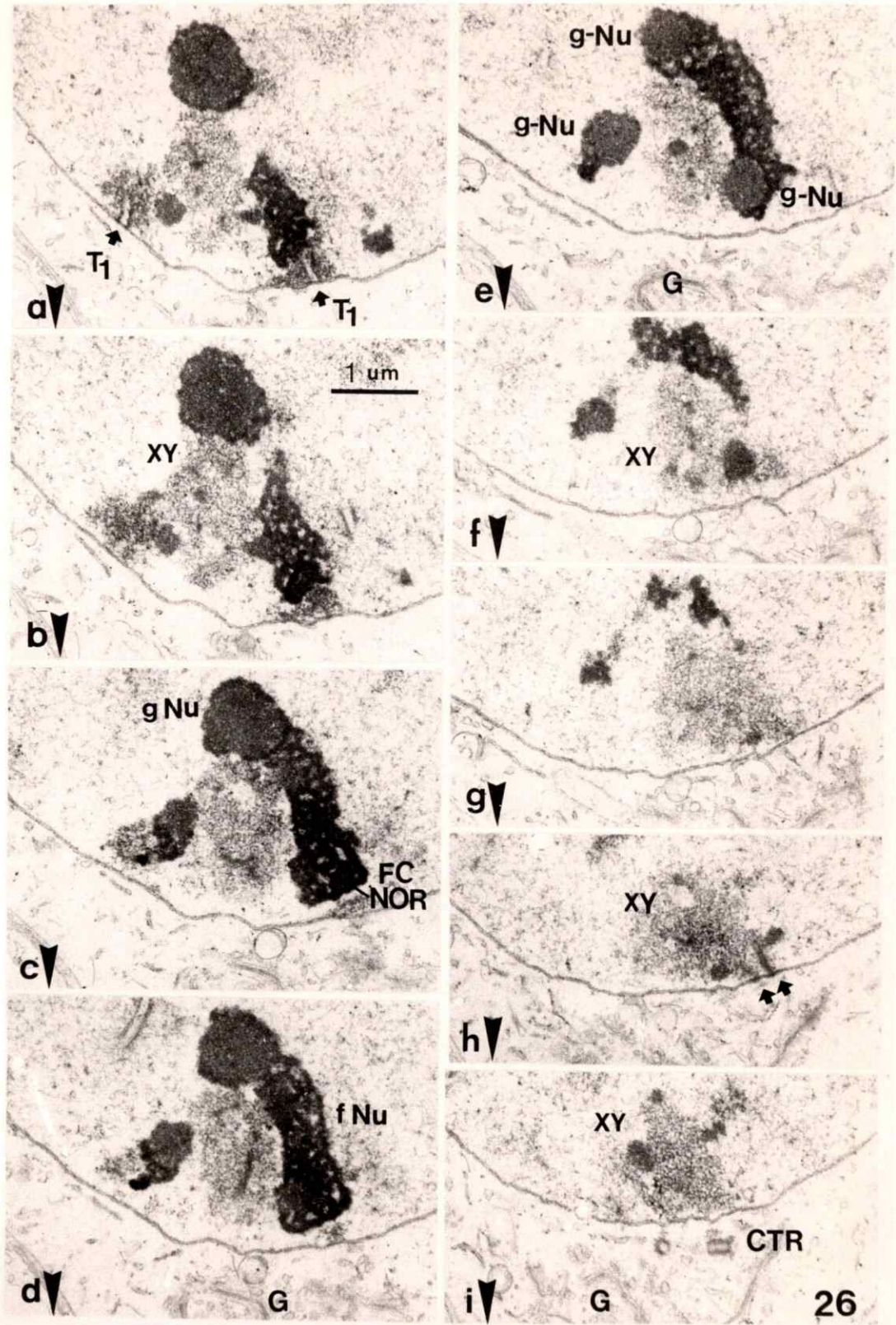


FIGURA 27

Asociación entre el bivalente XY y dos Bivalentes Nucleolares, sin inserción de los telómeros 1 en la envoltura nuclear.

a - f) Secuencia ordenada de imágenes que ilustra la asociación de dos Bivalentes Nucleolares a través de su extremo nucleolar y la sobreposición de los mismos a cromatina del bivalente XY. Se observa la concurrencia de los respectivos Complejos Sinaptonémicos, uno correspondiente a un Bivalente G y el otro a un Bivalente D, y la localización de los BK sobre el bivalente XY. El FC-NOR y nucléolo aparecen claramente unidos a BK que están sobre cromatina XY (d).

- ↑ : inserción a la envoltura nuclear
- CS : Complejo Sinaptonémico
- en : envoltura nuclear
- BK : basal knob o cromatina condensada basal
- XY : bivalente sexual
- FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del Nucléolo.
- Nu : nucléolo compuesto principalmente de zona granular.

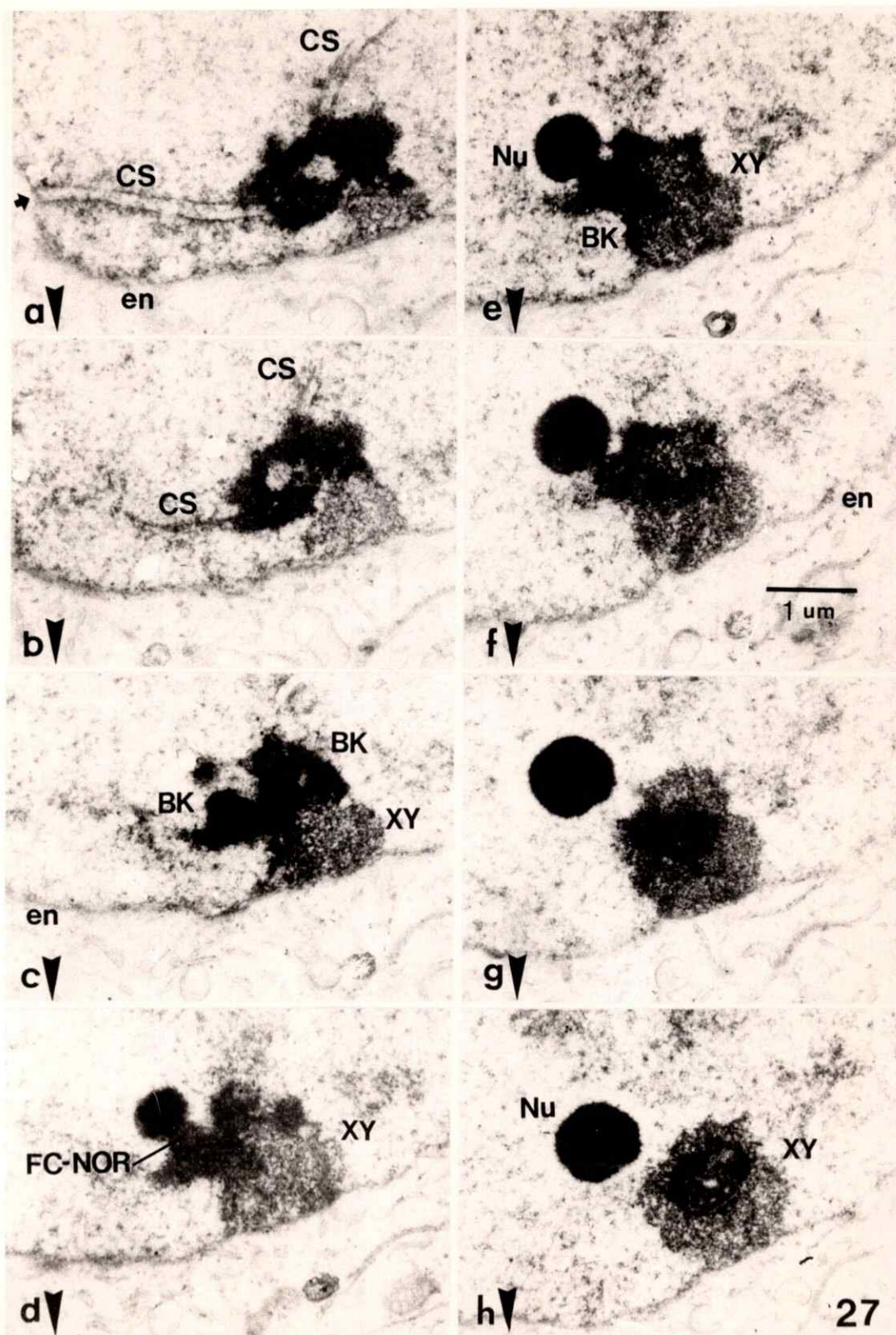


FIGURA 28

Asociación entre bivalente XY y nucléolo.

- a) Extremo nucleolar de un Bivalente G cuya cromatina condensada del BK no está adosada a la envoltura nuclear sino unida al ápice del bivalente sexual (situación semejante a la observada en la Fig. 2e).

El nucléolo está desprendiéndose del BK (▲). No se observa Cromatina de Conexión ni FC-NOR. En reemplazo de este último, se observa un cuerpo vacuolado de carácter protéico (*).

- b) Espermatocito sobre el cual se realizó la serie y en el que se aprecia la localización subcentral del nucléolo, del extremo nucleolar de un Bivalente Nucleolar y del extremo del bivalente sexual.

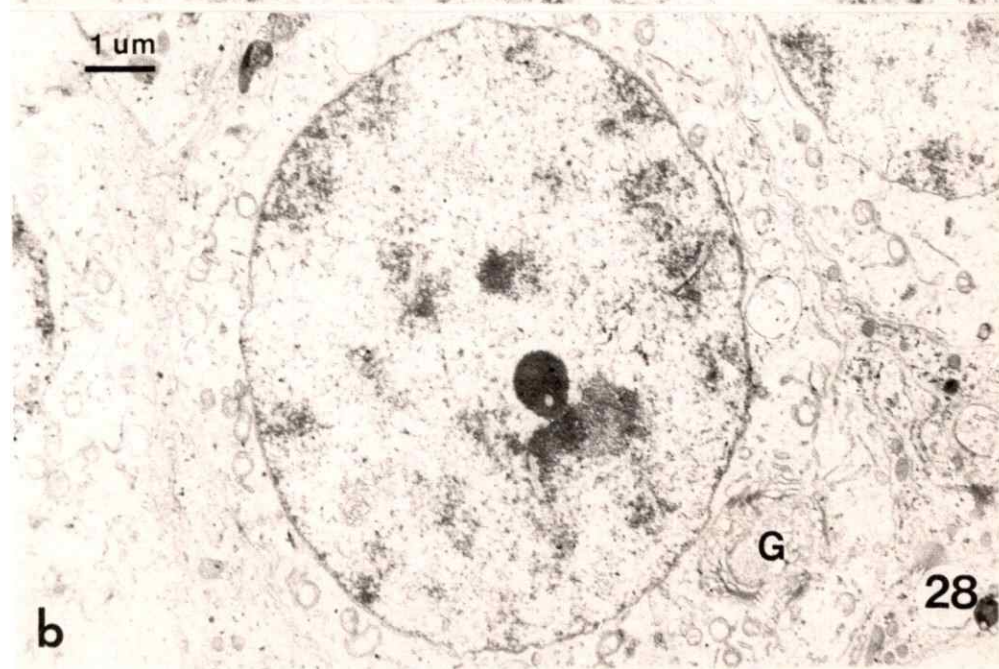
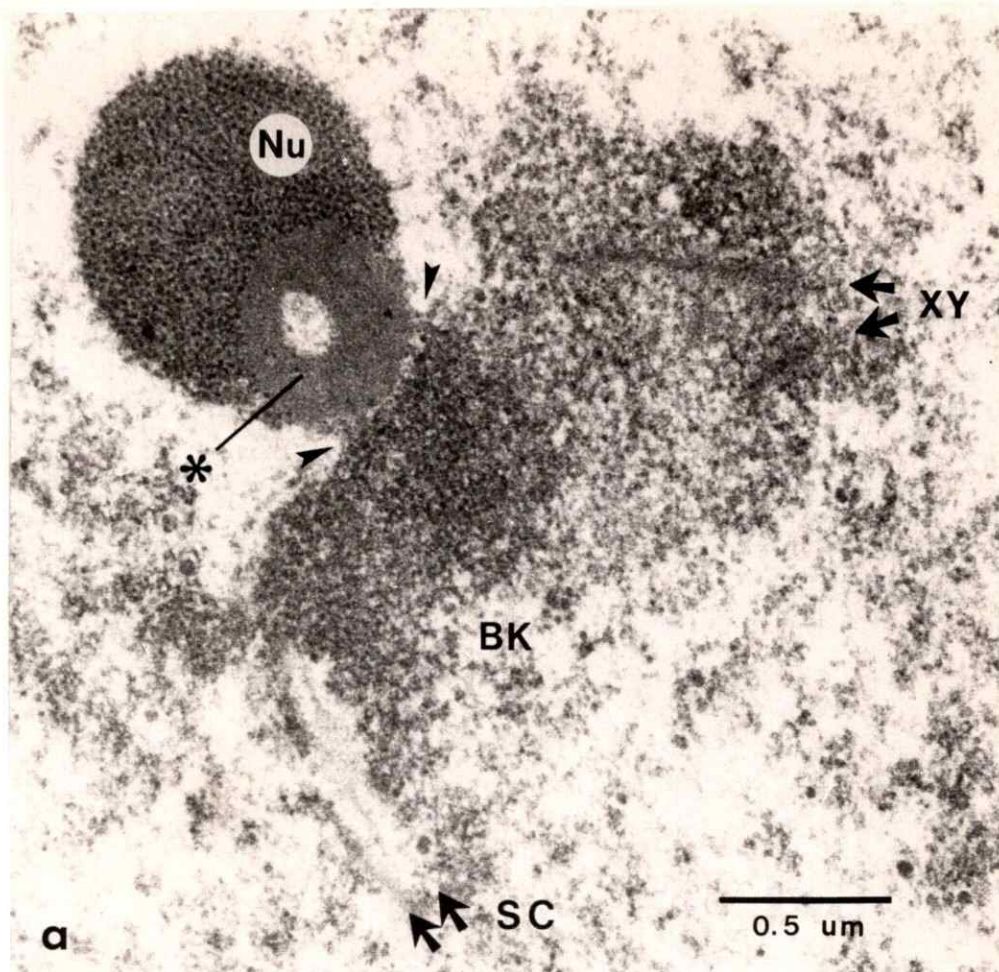
Nu : nucléolo compuesto principalmente de zona granular

XY : ejes de los cromosomas sexuales

BK : basal knob o cromatina condensada basal

SC : Complejo Sinaptonémico

G : Aparato de Golgi



D I S C U S I O N

El trabajo desarrollado en esta tesis revela la utilidad de enfrentar el estudio de la organización de los bivalentes con procedimientos conservadores de la estructura y organización del núcleo. La posibilidad de establecer la posición de entidades macromoleculares dentro del núcleo, colegir sus relaciones, reconocer su morfogénesis y los cambios que se producen durante la diferenciación celular, permiten una vez realizados dichos estudios plantearse en forma precisa hipótesis de trabajo y experimentos de mayor resolución para los fenómenos fisiológicos involucrados.

Uno de los principales problemas que se debió enfrentar en este trabajo fue el del diagnóstico inequívoco de la fase meiótica de los Espermatoцитos humanos. Heller y Clermont (1964) propusieron una clasificación de estados del epitelio germinal humano sobre la base de material observado al microscopio de luz. Dicha clasificación ha sido útil para reconocer las combinaciones celulares que acompañan al Espermatoцитo en Paquiteno. Las observaciones realizadas en cortes semifinos y seriados concuerdan totalmente con las

realizadas por Heller y Clermont en cuanto a la organización tisular del epitelio germinal y a la diferenciación de las células que lo componen. Estas preparaciones nos han permitido, sin embargo, una mejor resolución en la observación de la microanatomía del núcleo de las células germinales y en especial de los Espermatoцитos. Por ello, hemos podido estudiar con mayor detalle la disposición espacial dentro del núcleo de determinados Dominios cromosómicos y de los Bivalentes.

La cantidad de información obtenida a través de este trabajo nos obliga a sistematizar su discusión y comparación con la existente en la literatura, de la misma forma como se ha venido haciendo en el desarrollo de esta tesis. Sólo se discutirá en detalle aquellos puntos que nos parecen más relevantes a las dos motivaciones centrales que este trabajo ha tenido: la primera acerca de la organización y relaciones de los Bivalentes Nucleolares en el Núcleo del Espermatoцитo, y la segunda, de los posibles mecanismos derivados de la estructura y organización de los Bivalentes Nucleolares que aparecerían involucrados en el origen de aberraciones cromosómicas.

De acuerdo a este criterio discutiremos: 1° la organización de los Bivalentes Nucleolares con especial referencia al brazo corto. 2° La microanatomía y relaciones de los Dominios Nucleolares y nucléolos del Espermatocito; 3° Las asociaciones de Bivalentes Nucleolares y sus eventuales consecuencias.

1. LOS BIVALENTES NUCLEOLARES HUMANOS

Nuestras observaciones en esparcidos de núcleos de Espermatocitos en Paquitenos, concuerdan plenamente con las realizadas por Ferguson-Smith (1964) y Hungerford (1971a y b) en cuanto a la presencia en dichos núcleos de 5 bivalentes que se relacionan con el nucléolo por medio del "cromómero nucleolar". A través del "cromómero nucleolar" los Bivalentes respectivos aparecen frecuentemente asociados a pesar de la fuerte disrupción nuclear producida.

Las observaciones realizadas en cortes seriados semifinos, demuestran que los "cromómeros nucleolares" y sus nucléolos dependientes se encuentran generalmente en la periferia del núcleo de los Espermatocitos,

unidos directamente a la cara interna de la envoltura nuclear. Su organización general es equivalente a la descrita por Solari y Tres (1970) al microscopio electrónico, en la cual denominó como "basal knob" (BK) a la cromatina que relaciona el nucléolo con la envoltura nuclear.

Nuestras observaciones al microscopio electrónico demuestran que el BK no es una entidad homogénea como aparentemente lo consideraron Ferguson-Smith y Hungerford. En efecto, el BK es una entidad que aparece compuesta por sectores que difieren en la posición y agregación de la cromatina que los compone. La cromatina se distribuye en estratos diferentes desde la envoltura nuclear hacia el interior del núcleo. Esta estructura del BK es constante y similar en los distintos Bivalentes D o G estudiados. La heterogeneidad longitudinal que se constituye a lo largo del Complejo Sinaptonémico no es observable en forma simple al microscopio de luz debido principalmente al alto grado de condensación de la cromatina del BK. Sin embargo, a través de procedimientos especiales como el de la plata amoniacal (Goodpasture and Bloom, 1975), la técnica de Bernhard (1969) y series de cortes finos para microscopia electrónica te

ñidos según Reynolds (1963), ha sido posible poner en evidencia dicha heterogeneidad y establecer la disposición secuencial de los componentes del BK.

Numerosos autores (Hungerford, 1971a y b; Comings, 1978; Luciani et al., 1975; Fang and Jagiello, 1983, entre otros) han realizado mapas de cromómeros de bivalentes humanos y de otras especies de mamíferos, y han intentado establecer alguna correspondencia entre las secuencias cromoméricas y las bandas G de los cromosomas mitóticos. Estos estudios han demostrado que el patrón cromomérico de los bivalentes es concordante con el patrón de bandas G de los cromosomas mitóticos. Comings (1978) ha propuesto al mismo tiempo, que el bandeo G que se logra en los cromosomas somáticos a través de la extracción selectiva de determinadas proteínas, es equivalente al patrón natural de plegamiento de la fibra cromosómica presente en las secuencias cromoméricas de los bivalentes.

Si por otra parte tenemos en cuenta que el BK, como lo revelan los estudios de microscopía electrónica (Holm y Rasmussen, 1977a y b; Rasmussen y Holm, 1978; Solari, 1980; Berríos y Fernández-Donoso, 1981;

Berrios, 1983; Stahl et al., 1983), se extiende desde la envoltura nuclear donde el Bivalente está inserto, hasta el centrómero respectivo, constatamos que el BK involucra a la totalidad del brazo corto de los Bivalentes Nucleolares humanos. Luego, debería ser posible establecer una correlación entre la estratificación de la cromatina del BK observada por nosotros, con el patrón de bandas G descrito para los brazos cortos de los cromosomas nucleolares mitóticos. En este trabajo se han encontrado evidencias que nos permiten establecer, en este nivel de análisis, tal correlación (Fig. 29).

En primer lugar, en los 24 bivalentes D y G analizados (11D y 13G), los BK de cada uno fueron similares en tamaño y organización general. De la misma manera, es notable observar que la longitud y organización de los brazos cortos de los 5 pares de cromosomas nucleolares, es también similar. Así también son semejantes en su dimensión y volumen aparente los "cromómeros nucleolares" que hemos observado en los esparcidos de Espermatocitos, como también aquellos evaluados de las fotografías publicadas por Hungerford (1971a). En segundo lugar, la estratificación de la cromatina y su secuencia desde la envoltura nuclear hasta la cúspide del

BK, se corresponde con la secuencia y extensión relativa de las bandas G de los cromosomas mitóticos D o G. En efecto, la secuencia telómero uno (inserto en la envoltura nuclear) y cromatina condensada periférica, Cromatina de Conexión-FC-NOR-Nucléolo, cromatina pericentromérica y centrómero, se corresponden respectivamente con la banda p13 que abarca aproximadamente el Telómero 1 y la cromatina sat, la banda p12 que define fundamentalmente la constricción secundaria, y la banda p11 que abarca principalmente la cromatina pericentromérica del brazo corto, limitando con el centrómero (ISCN, 1978) (Fig. 29). En tercer lugar, existe una clara correspondencia de posición entre entidades como la constricción secundaria, zona de hibridación "in situ" con (^3H)rRNA 18S y 28S y región AgAs-NOR positiva de los cromosomas metafásicos (Henderson et al., 1972 y 1973; Miller et al., 1976, 1977 respectivamente), con la zona del extremo de los Bivalentes que se tiñe con la plata amoniacal, la región que hibrida "in situ" con (^3H)rRNA 18S y 28S (Stahl et al., 1983) y el complejo estructural Cromatina de Conexión-FC-NOR-Nucléolo en los Bivalentes Nucleolares (Fig. 29). Todos estos experimentos y observaciones señalan que la posición del NOR es en uno de los extremos de los cromosomas y Bivalentes Nucleolares, y en

ese extremo dicha posición es equidistante entre el telómero 1 y el centrómero.

Estas observaciones contribuyen además a confirmar que la cromatina de los Bivalentes tiene su propia forma de organización pero que conserva ciertos patrones estructurales básicos que también están presentes en la organización de los cromosomas mitóticos (Comings, 1978; Fernández-Donoso, 1980, 1981, 1982a y b).

Por otra parte, se descubre que en la profase meiótica están comprometidos en la organización del nucléolo todos los sectores de cromatina que componen el brazo corto del Bivalente Nucleolar. Un hallazgo semejante aunque en otro contexto experimental ha sido realizado por Tres (1975), quien ha correlacionado la extinción de la función nucleolar con la progresiva condensación del BK. Creemos que estos cambios estructurales que comprometen a la totalidad del brazo corto de los Bivalentes Nucleolares y que enmascaran su heterogeneidad natural, se pueden interpretar como una facultatividad que involucra a toda la cromatina del brazo corto. La cromatina vecina al NOR participaría de este fenómeno, dándole soporte estructural a los cistrones ri-

bosomales y contribuyendo a regular su transcripción.

Nuestras observaciones, tanto al microscopio de luz como al microscopio electrónico, demuestran que el o los nucléolos dependientes de uno o varios BK están generalmente situados en la periferia del núcleo del Espermatozocito. Esta situación obviamente deriva de la conexión estructural característica de los nucléolos en la profase meiótica con el NOR de el o los Bivalentes que le dan origen. Esta relación fue postulada por nosotros (Fernández-Donoso et al., 1979) y demostrada en varias especies de mamíferos euteria y metateria (Berríos y col., 1980; Fernández-Donoso, 1982a y b). En la especie humana, al estar el BK con el NOR situado en el Bivalente en una posición próxima al T_1 y a su vez éste inserto en la envoltura nuclear, la posición del BK y nucléolo dependiente tenderán a ser siempre periféricas. Como veremos más adelante en esta misma discusión, las variaciones encontradas en la posición del nucléolo o del BK no afectan a la racional propuesta, sino más bien son excepciones que confirman la regla.

En Espermatozocitos en profase meiótica temprana los nucléolos también son periféricos debido a que

ocurren las mismas relaciones recién discutidas. En algunos casos las fibrillas o gránulos de RNP dan cuenta de algunas extensiones nucleolares que se alejan de la periferia del núcleo. En todos ellos, sin embargo, existe una clara relación del material nucleolar con algún FC-NOR situado en la periferia del núcleo.

En otras células de la línea germinal como las espermatogonias pálidas y oscuras encontramos que los nucléolos de ambos tipos celulares son también periféricos, y el FC-NOR respectivo se sitúa estrechamente unido a la envoltura nuclear. Esta característica de los nucléolos espermatogoniales ha sido también recientemente comunicada por Stahl et al. (1983). Aunque en las espermatogonias no conocemos la posición de los cromosomas nucleolares, la constancia en la localización de los FC-NOR y sus nucléolos dependientes nos revela que en estas células también existiría un patrón de posición de los cromosomas nucleolares en la periferia del espacio nuclear. Este fenómeno podría corresponder al desarrollo de un alineamiento progresivo de los cromosomas (Fernández-Donoso, 1980), que se iniciaría por medio de una relación constante de los telómeros con la envoltura nuclear y que culminaría con el apareamiento homólogo en

la profase meiótica. Observaciones de este tipo han sido también realizadas en células premeióticas del maíz (Maguire, 1983).

De la evaluación de estas observaciones surge con claridad que en las células germinales humanas existe una estructura nucleolar propia de cada tipo celular y que la posición periférica del nucléolo derivaría de la unión de los cromosomas nucleolares a la envoltura nuclear.

Estas evidencias muestran también claramente la participación de determinados dominios cromosómicos en la organización de territorios nucleares específicos. Pareciera que ésta es una afirmación trivial. Sin embargo, no lo es si se tiene en cuenta el hecho de que directa o indirectamente la organización cromosómica heredada de otras generaciones celulares es la que reitera cada vez en los núcleos descendientes su organización y arquitectura. Este fenómeno es muy importante tenerlo en cuenta para entender el ámbito real y la frecuencia con que las relaciones intercromosómicas o interbivalentes se producen.

2. EL DOMINIO NUCLEOLAR Y EL NUCLEOLO

En esta tesis, hemos denominado "Dominio Nucleolar" al conjunto de elementos cromatínicos y no cromatínicos que configuran en el núcleo el territorio o compartimento nucleolar (Figs. 31a y b). Esta definición operacional, es también válida para los cromosomas. La concepción de Dominio Nucleolar considera necesariamente tres componentes fundamentales: a) las estructuras cromosómicas involucradas como los cistrones ribosomales y las cromatinas vecinas al NOR, b) el material nucleolar como las fibrillas y los gránulos de RNP que son producto de la actividad transcritiva del NOR y que se agregan en el espacio nuclear de variadas maneras y c) las proteínas funcionales y estructurales propias de la síntesis y organización nucleolares (ver también Puvion-Dutilleul, 1983).

El estudio de la microanatomía de los Dominios Nucleolares del Espermatozocito humano en Paquiteno, nos revela que ellos están constituidos básicamente por los siguientes elementos: una gran esfera de material nucleolar compuesta principalmente de gránulos ribonucleoprotéicos y por uno o varios BK asociados, cada uno

atravesado por el segmento de Complejo Sinaptonémico correspondiente al brazo corto de los Bivalentes Nucleolares involucrados (Fig. 31). Toda esta entidad configura una unidad territorial que está extensamente asentada sobre la envoltura nuclear y obviamente localizada en la periferia del núcleo.

El material nucleolar (o nucléolo de acuerdo a Granboulan and Granboulan, 1965; Wolfe, 1981) está compuesto fundamentalmente por gránulos de RNP al mismo tiempo que muestra un avanzado estado de segregación. Este fenómeno es propio de una escasa o nula síntesis nucleolar o de nucléolos en involución (Bush and Smetana, 1970). Tal observación es concordante con lo que se ha inferido de experimentos de incorporación de uridina tritiada, en los cuales se ha visto que la actividad transcritiva nucleolar disminuye hacia el Paquiteno medio y tardío en el Espermatozoido humano (Tres, 1975). Asimismo, son coincidentes también con los experimentos de Tres (1975), y con las observaciones de Puvion-Dutilleul (1983), nuestras observaciones en la profase del Espermatozoido respecto de la variación de la composición y distribución de los elementos constituyentes del material nucleolar (Fibrillas y gránulos) (Fig. 30).

En los Dominios Nucleolares estudiados en las distintas etapas de la meiosis, los nucléolos pequeños y jóvenes del Leptoteno y Zigoteno aparecen constituidos principalmente por material fibrilar. A medida que la profase avanza y el nucléolo crece, hay un gran aumento del material fibrilar y aparecen también gránulos en el extremo distal al FC-NOR (Fig. 30). Posteriormente, aumenta la granular a expensas de la fibrilar que comienza a desaparecer. Finalmente se constituye la esfera de gránulos típica del Paquiteno medio y tardío (Fig. 30).

Otro hecho importante a considerar de nuestras observaciones, es la progresiva disminución hacia el Paquiteno del número de nucléolos presentes en el núcleo. En efecto, de 3 a 5 nucléolos presentes en los estados iniciales de la profase, éstos se reducen a uno o dos en los estados tardíos (Tabla 2). Hofgartner et al. (1979) llegaron a conclusiones semejantes al evaluar la actividad nucleolar de los Espermatocitos humanos mediante el uso de la técnica de la plata amoniaca (Goodpasture and Bloom, 1975). Ellos observaron que la reacción de plata cuantificada por número de áreas discretas y por área total de plata sobre los núcleos de los Espermatocitos, eran inferiores en los núcleos en

Paquiteno que en los de etapas más tempranas de la profase. Nuestros recuentos de nucléolos presentes en núcleos en Paquiteno (Tabla 2) muestran un valor promedio de 1,6 nucléolos por núcleo lo que es también coincidente con lo encontrado para el mismo estado por Hofgartner et al. (1979).

Las observaciones realizadas y los antecedentes citados, constituyen un conjunto coherente de evidencias que señalan que hacia el Paquiteno la actividad de síntesis ribosomal total por núcleo y por Bivalente disminuye, y que el número de Bivalentes que independientemente realizan síntesis de RNA ribosomal también disminuye. El esclarecimiento de este fenómeno se facilita debido a la sincronización que existe entre la funcionalidad nucleolar y el desarrollo de la profase meiótica.

Hemos visto que los Dominios Nucleolares de los Espermatoцитos humanos están constituidos también por uno o varios BK asociados entre sí, y que estos corresponden al brazo corto de los Bivalentes Nucleolares involucrados en un particular Dominio Nucleolar.

Próximo al ápice de el o de los BK asociados destaca una estructura única de forma esférica, de tamaño variable según el número de Bivalentes Nucleolares participantes, que es el Centro Fibrilar (Recher et al., 1969) (Figs. 29, 30). Al Centro Fibrilar lo hemos denominado con las siglas FC-NOR. A través de esta estructura es que el material nucleolar, especialmente fibrillas nucleolares, se conectan con el BK. A su vez el FC-NOR, aparece conectado a los laterales del Complejo Sinaptonémico de el o los Bivalentes participantes por medio de la Cromatina de Conexión. Este contacto con el Complejo Sinaptonémico se produce entre 0.3 a 0.4 μm de la inserción del telómero 1 a la envoltura nuclear, medida que es constante en los 24 Bivalentes Nucleolares estudiados (Figs. 31a y b).

Sobre la base de la integración de nuestras observaciones en los meiocitos de la especie humana y en los de otras nueve especies de mamíferos euteria y metateria, además de la información presente en la literatura, proponemos que: Cromatina de Conexión-FC-NOR-material nucleolar constituyen la unidad estructural y funcional del NOR. Nuestra discusión respecto a este punto estará destinada a hacer notar la coherencia de nuestros

resultados con esta proposición.

En todas las especies estudiadas el FC-NOR aparece unido al Complejo Sinaptonémico por medio de conexiones de cromatina con una condensación y longitud variables, y en un punto del Complejo que es el equivalente a la posición de la constricción secundaria de los cromosomas mitóticos respectivos. La relación del FC-NOR con las cromatinas vecinas a él es también variable y depende de las características de condensación que ellas presentan así como de las asociaciones con sectores de otros bivalentes. Todos estos elementos configuran en las distintas especies, diferentes formas de organización de el o los Dominios Nucleolares respectivos (Fernández-Donoso y Wettstein, 1976; Fernández-Donoso et al., 1979; Berríos y col., 1980; Berríos y Fernández-Donoso, 1981; Fernández-Donoso, 1982a y b). Asimismo, las zonas fibrilares del material nucleolar aparecen rodeando aproximadamente los tres cuartos de la superficie de los FC-NOR, y por fuera de ellas, organizados en trabéculas o en acúmulos variables, se encuentran los gránulos nucleolares.

Estas observaciones concuerdan, respecto de la organización general del nucléolo de los meiocitos, con las realizadas en meiocitos de varias especies animales y vegetales (Gillies, 1973; Esponda and Giménez-Martín, 1975; Jordan and Luck, 1976; Jordan et al., 1982; Giménez-Martín et al., 1977; Knibiehler et al., 1977; Solari, 1980; Mirre et al., 1980; Stahl et al., 1983).

Por otra parte, sobre la base de las variaciones estructurales de la zona fibrilar del nucléolo y su relación con el FC-NOR, en la profase de los meiocitos de varias especies (Fernández-Donoso et al., 1979; Fernández-Donoso, 1980) y de acuerdo a la cinética de incorporación de marca después de pulsos variables de uridina tritiada (Goessens and Lepoint, 1979), se ha sugerido que el FC-NOR y la zona fibrilar del nucléolo constituirían una unidad funcional. Esta última proposición ha sido reforzada al integrarse la información procedente de los trabajos de Miller y Beatty (1969) con imágenes de microscopía electrónica tradicional (Franke et al., 1978) de nucléolos. Recientemente Francine Puvion (1983), por medio de técnicas que utilizan por una parte el esparcido de material nucleolar y por otra la

conservación de la integridad nuclear, ha logrado demostrar que las fibrillas de la zona fibrilar del nucléolo (precursor 45 S) permanecen unidas al DNA ribosomal integrando ambas dicha zona fibrilar. Existen además suficientes datos en la literatura (Wolfe, 1981) que demostrarían que la zona granular del nucléolo estaría compuesta por gránulos correspondientes exclusivamente a la fracción 32S (5.8S y 28S), habiéndose producido el pasaje al citoplasma de la fracción 18S (Puvion-Dutilleul, 1983).

La secuencia Cromatina de Conexión-FC-NOR-fibrilar del nucléolo, entendida como unidad estructural y funcional, tiene un fuerte apoyo en la literatura y en nuestras propias observaciones. Ello significa interpretar al NOR de los bivalentes meióticos como una entidad compuesta por cistrones ribosomales que se extienden en "loops" desde el Complejo Sinaptonémico hasta la zona fibrilar del nucléolo, pasando a través del FC-NOR. Dichos "loops" se irían expandiendo a medida que se desarrolla la actividad transcripcional nucleolar y posteriormente, una vez cesada tal transcripción, éstos se recogerían condensándose hacia el Complejo Sinaptonémico (Fig. 30).

El FC-NOR es una esfera compuesta por finas fibrillas de 7 nm de espesor, cuyo tamaño es variable según el estado funcional del nucléolo (Figs. 30 y 31). El FC-NOR aparece también como una estructura muy afín a la plata en solución amoniacal (Goodpasture and Bloom, 1975; Goessens and Lepoint, 1979). Lischwe et al. (1981) (ver también Schwaszacher et al., 1978; Hubbel et al., 1979), han demostrado que la reacción positiva a la plata amoniacal de los FC-NOR se debería a la presencia de las proteínas funcionales del nucléolo B23 y C23. Estos, y una serie de otros antecedentes en la literatura (Henderson, 1973; Miller et al., 1976 en la especie humana; Scheer et al., 1982 y 1984), demuestran claramente que los sectores cromosómicos (constricciones secundarias) y nucleares que hibridan "in situ" con los (^3H)rRNA 18S y 28S dan positiva la reacción de la plata amoniacal. Este conjunto de evidencias demuestra también que de alguna manera proteínas funcionales del FC-NOR quedan atrapadas en la constricción secundaria de los cromosomas en fase divisional, ya que es posible detectar en ellos la misma reacción que tiene el FC-NOR en la interfase.

Este fenómeno no ocurre en la primera ni en la segunda división meióticas (Hofgartner et al., 1979), aunque una cierta reacción AgAS-NOR positiva vuelve a aparecer en las espermátidas tempranas coincidiendo con la presencia de nucléolos. No existe en la literatura una buena explicación para la desaparición de la reacción AgAS-NOR positiva en los cromosomas nucleolares de las divisiones meióticas I y II.

Sobre la base de dos hechos observados por nosotros en Paquitenos tardíos, tanto de la especie humana como en tres especies de roedores (Observaciones no publicadas), creemos haber encontrado la razón por la cual tal fenómeno ocurre. En primer lugar, hacia el final del Paquitenos la masa de material nucleolar con el FC-NOR (para nosotros ahora solamente cuerpo proteico) se desprende del BK, perdiéndose el contacto con la cromatina de conexión, la cual a su vez ya no es posible distinguir en la masa del BK que está fuertemente condensada. En esta fase meiótica, la esfera desprendida aparece adherida a cualquier otro sector de cromatina dentro del núcleo (Fig. 30). En segundo lugar, mientras el desprendimiento del material ocurre, la fina trama fibrilar del FC-NOR va perdiendo su textura típica

con la aparición de vacuolas en su interior (Fig. 30).

A nuestro juicio, estos hechos señalarían la culminación de la retracción de los cistrones ribosomales a través del FC-NOR y hacia el Complejo Sinaptonémico, los que agregándose con proteínas cromosómicas irían a integrar el BK. Si esto fuera así, las proteínas funcionales constituyentes del FC-NOR que dan la reacción AgAS-NOR positiva se perderían, desapareciendo tal reacción de las constricciones secundarias de los cromosomas nucleolares en las divisiones meióticas I y II (Fig. 30).

Esta proposición pareciera además estar avallada por las características descritas para el FC-NOR recientemente publicadas por Jordan et al. (1982). Jordan estima que los $2/3$ del FC-NOR serían proteínas y el tercio restante estaría formado por cromatina que contiene los cistrones ribosomales.

Por otra parte, resultados presentados en este trabajo muestran una particular reacción positiva con la técnica de Benrhard (1969) de extensas zonas de la superficie de contacto entre el FC-NOR y la Cromatina de

Conexión, poco antes que el desprendimiento del nucléolo ocurra. No tenemos claro lo que tal estructura es o representa. Sin embargo, dada su particular distribución, estructura y características citoquímicas, creemos que constituyen ribonucleoproteínas que participarían como frontera de separación entre el material nucleolar y los cistrones ribosomales en retracción.

En los 24 Bivalentes de Espermátocitos, en Paquiteno analizados siempre está presente un solo FC-NOR de un tamaño relativamente constante (750 nm de diámetro promedio). Dicho FC-NOR aparece conectado a ambos elementos laterales del Complejo Sinaptonémico por medio de la Cromatina de Conexión. Esto implica que en el FC-NOR y eventualmente en la zona fibrilar del único nucléolo se asocian íntimamente cistrones ribosomales de ambos cromosomas homólogos que componen el Bivalente. Sumado a lo anterior, suponemos que la progresiva expansión de los cistrones ribosomales desde el Complejo Sinaptonémico, así como también su posterior retorno al BK, configuran una situación en la cual podrían surgir trabazones intercromosómicas que alterarían la disyunción de este par de cromosomas homólogos en la división meiótica I. Si a esto agregamos que cada miembro del par homólogo es

tá duplicado y por lo tanto formado por dos cromátidas, podría suceder que en las mismas circunstancias se generen trabazones entre cromátidas hermanas que desencadenarían disyunciones anormales en la división meiótica II.

En ambos casos, la disyunción en las divisiones meióticas I y II podría verse alterada también por la participación de trabazones cromosómicas en las que participaran las cromatinas vecinas al NOR.

Si bien a este nivel podemos definir qué elementos y en qué circunstancias podrían desencadenar una no disyunción, necesariamente debemos tener en cuenta que el apareamiento, "colaboración nucleolar" y segregación constituyen una cadena fenomenológica normal para los cromosomas nucleolares.

No podemos excluir la posibilidad, aunque para ella no haya mucho fundamento, que en cada Bivalente funcione el NOR de un solo miembro del par homólogo y el otro permanezca reprimido. Si así fuera, una condición necesaria para la aparición de no disyunciones debidas al NOR en la división meiótica I debería ser la desrepresión del NOR no funcional. En todo caso, si el fun-

cionamiento fuera impar no podría éste excluirse como mecanismo de origen de no disyunciones en la división meiótica II.

De alguna manera el genoma involucrado debe estar protegido contra la producción de errores como los señalados, lo que no excluye que a pesar de todo, tales errores puedan surgir.

3. ASOCIACIONES DE LOS BIVALENTES NUCLEOLARES

En el desarrollo de este trabajo se encontró una gran variedad de asociaciones entre Bivalentes Nucleolares, las que comprometían al nucléolo, o al FC-NOR o a los otros componentes del BK, todas ellas con mayor o menor compromiso de los Complejos Sinaptonémicos de los Bivalentes involucrados.

Dichas asociaciones interbivalentes ocurren indistintamente entre Bivalentes D, o Bivalentes G, o entre Bivalentes D y G, en proporciones que discutiremos más adelante. Se observaron también asociaciones de Bivalentes Nucleolares con el bivalente XY, en las cuales

se distingue un distinto grado de compromiso de los respectivos constituyentes. Por lo anterior, y como lo adelantara en trabajos presentados a la Sociedad de Biología (Berríos y col., 1980; Berríos, 1983), los hechos reunidos en este trabajo configuran un complejo panorama de asociaciones entre Bivalentes que es difícil de evaluar y discutir sin una sistematización previa.

En esta parte de la discusión se procurará caracterizar la frecuencia con que el fenómeno de las asociaciones ocurre, después se discutirán los tipos de asociaciones de acuerdo a los elementos que en ellas participan, para finalmente evaluar las asociaciones (Dominios Nucleolares) como entidades potencialmente inductoras de no disyunciones o de translocaciones robertsonianas.

En todo caso, es necesario señalar que las observaciones realizadas al microscopio de luz en esparcidos de Espermatocitos, son concordantes con las de Hungerford (1971a y b) respecto de las asociaciones entre Bivalentes Nucleolares. Son también concordantes las observaciones al microscopio electrónico con las de Mirre et al. (1980) y con las de Stahl et al. (1983) res

pecto de las asociaciones de Bivalentes Nucleolares en meiocitos humanos.

3.1. Caracterización de la frecuencia de las Asociaciones

Sobre la base de los datos resumidos en las Tablas 2 y 3, además de una apreciación general de observaciones directas al microscopio, hemos estimado que en 4 de cada 10 Espermatocitos los Bivalentes Nucleolares se involucran en algún tipo de asociación. Esta cifra es superior a la señalada por Stahl et al. (1983), quienes concluyen que dichas asociaciones ocurrirían en uno de cada 5 Espermatocitos. La discrepancia podría deberse a varios factores. Entre ellos podríamos considerar la notable variabilidad individual descrita para las asociaciones entre cromosomas nucleolares (ver también Tabla 2), el tamaño de la muestra utilizada por estos autores que es mucho más pequeña que la estudiada en esta tesis, y a que ellos no tomaron en cuenta las asociaciones entre Bivalentes Nucleolares y el bivalente sexual.

Por otra parte, teniendo en cuenta los trabajos de Cooke (1972) y de Mattei et al. (1976) entre otros, estamos convencidos que no es posible predecir la frecuencia con que se pueden presentar las asociaciones en distintos Espermatocitos. Esto se debe a que no se sabe la real extensión de la variabilidad de este fenómeno. Sin embargo, se le reconoce una gran variabilidad individual (Cooke, 1972; Mattei et al., 1976), un cierto grado de concentración familiar (Henderson et al., 1973), y diferente grado de participación de los cromosomas D o G (Cohen and Shaw, 1967), todos estudios realizados en cromosomas metafásicos somáticos. A estos datos debemos agregar la posibilidad de variaciones en el grado y número de asociaciones derivadas de interacciones estructurales y funcionales en el transcurso de la profase meiótica.

De acuerdo a los datos publicados en la literatura (Mattei et al., 1976; Davidson et al., 1981), la frecuencia de asociaciones entre cromosomas nucleolares encontrada en placas metafásicas somáticas es del orden de un 15%. Esta estimación debe ser usada con cautela, ya que ha sido hecha en

cromosomas que han terminalizado su función nucleolar por lo que cabe esperar que muchas asociaciones hayan desaparecido en forma natural. A ésto debemos agregar la desaparición artificial de asociaciones provocada por el tratamiento hipotónico. Una clara muestra de esta disrupción técnica, ha sido señalada por Henderson et al. (1973), quienes demostraron la presencia de conexiones que hibridan con (^3H)rRNA 18S y 28S entre cromosomas nucleolares que se encontraban muy distantes en las placas metafásicas analizadas. En cambio en los meiocitos, los Bivalentes Nucleolares están en una fase plenamente funcional. En ellos las eventuales asociaciones pueden ser cuantificadas, como lo han sido en esta tesis, en los núcleos enteros sin disrupción hipotónica y con un alto grado de conservación de la estructura y posición de los Dominios Nucleolares. Por estas razones cabe esperar que la frecuencia de asociaciones entre Bivalentes Nucleolares sea mucho mayor que la encontrada en las placas metafásicas somáticas. Además, tal como lo hemos visto en la primera parte de la discusión, al estar los cromosomas nucleolares homólogos apareados y entrelazados por el NOR, crean desde ya una condi-

ción fundamentalmente distinta a la que se produce en los núcleos somáticos.

A pesar de las dificultades para establecer la frecuencia de ocurrencia para las asociaciones nucleolares, el trabajo realizado en esta tesis avala la presunción de que las asociaciones entre los Bivalentes Nucleolares ocurren en una frecuencia del orden del 40% y no inferior a la del 20% de los Espermatocitos, independientemente del tipo de asociación de que se trate.

3.2. Tipos de Asociaciones de acuerdo a los elementos que en ellas participan

Las asociaciones de Bivalentes encontradas en los Dominios Nucleolares configurados por más de un Bivalente, han sido ordenadas según el número de Bivalentes participantes, el tipo de Bivalente D o G involucrados, y si intervienen en tales Dominios bivalentes no nucleolares.

Los resultados de este trabajo reúnen las observaciones y análisis de 20 Dominios Nucleolares

en los que participan más de un Bivalente. De éstos, diez fueron de dos Bivalentes, seis de 3 Bivalentes y cuatro de 4 Bivalentes.

De ellos, se analizó los tipos de Bivalentes participantes solamente en los de dos Bivalentes y se encontró la proporción de 6 Dominios Nucleolares compuestos por un Bivalente D y un G, 3 compuestos por dos Bivalentes G y uno compuesto por dos Bivalentes D.

La organización y estructura de un Bivalente D o G es básicamente similar: sus brazos cortos son de longitud semejante y la estratificación de la cromatina desde el telómero 1 hasta el centrómero es igual. Difieren entre sí, por la longitud total del Complejo que en los Bivalentes G aparece de 3,5 a 4,5 μm de longitud y en los Bivalentes D de 7,5 a 9,5 μm . El reconocimiento de ambos tipos de Bivalentes se hizo obviamente por exclusión de longitudes de los Complejos Sinaptonémicos (Figs. 31a y b).

Las cifras respecto del número y tipo de Bivalentes involucrados en las asociaciones estudia-

das, no sirven para el establecimiento de las respectivas frecuencias del fenómeno debido al sesgo de la muestra. Tampoco existe en la literatura información al respecto. Sin embargo ellas son gruesamente concordantes con algunas de las cifras respecto del número de cromosomas y tipos de cromosomas mitóticos involucrados en asociaciones (Mattei et al., 1976; Davidson et al., 1981).

Se caracterizó además 25 asociaciones de uno, dos o tres Bivalentes, con los bivalentes sexuales, de los cuales sólo una parte ha sido ilustrada en esta tesis. El carácter de estas asociaciones y su particular organización obliga a separarlas de las anteriores para su discusión.

3.3. Las Asociaciones como entidades potencialmente inductoras de no disyunciones o de translocaciones robertsonianas

Cuando dos o más de dos Bivalentes D o G se asocian entre sí en un particular Dominio Nucleolar, se establece un conjunto de relaciones que están esquematizadas en la Figura 31b y en la Figura

32. Ambos esquemas resumen la información al respecto obtenida en esta tesis y al mismo tiempo ilustran, en dos planos, la complejidad de las interacciones estructurales que se producen.

Para la adecuada interpretación de los fenómenos que estas figuras ilustran, es importante tener en cuenta que en los Dominios Nucleolares se han reunido sectores de cromatina homóloga y no homóloga, los cuales han venido interactuando en la activa síntesis de rRNA que se ha producido en etapas más tempranas de la meiosis. Antes que el Dominio Nucleolar hubiese alcanzado la organización que estos esquemas ilustran, las diferentes cromatinas de los BK asociados (especialmente el rDNA de los FC-NOR y fibrilares del nucléolo) se encontraban ampliamente descondensadas y entremezcladas. Posteriormente, junto con la progresiva condensación de los BK y la segregación nucleolar, se habría producido la retracción de los respectivos NOR de los Bivalentes a través del único FC-NOR presente (Fig. 30). En el seno de esta compleja interacción podrían ocurrir trabazones de los cistrones ribosomales, tales como las que han encontrado Hen-

derson et al. (1972 y 1973) en cromosomas mitóticos.

Nuestras observaciones muestran además que en cualquier momento del estado funcional de los Dominios Nucleolares, quedan enfrentados en forma reiterada sectores cromosómicos específicos, tales como los centrómeros, cromatinas pericentroméricas, constricciones secundarias, cromatinas sat y telómeros 1. Estos son los sectores cromosómicos que aparecen involucrados, en forma simétrica o asimétrica, en los reordenamientos Robertsonianos de los cromosomas nucleolares humanos (Fig. 34).

Por otra parte, si cada Bivalente corresponde en realidad a cuatro cromátidas, las asociaciones de dos, tres y cuatro Bivalentes corresponderían a asociaciones de 8, 12 y 16 cromosomas respectivamente. Obviamente, al existir en las respectivas asociaciones un solo FC-NOR y un solo nucléolo terminal, ese FC-NOR reuniría a los cistrones ribosomales del conjunto de cromosomas asociados y el nucléolo adyacente sería el producto de la actividad conjunta de dichos Bivalentes. La probabilidad de

que allí se produzca trabazones e intercambios ectópicos entre las cromatinas involucradas debería ser muy alta, así como también la producción de reordenamientos o de eventuales complicaciones en la disyunción.

Cuando uno o más Bivalentes Nucleolares asociados o no entre sí, se asocian a su vez a la superficie de la vesícula sexual (Fig. 33), no se observa Complejo Sinaptonémico en los respectivos BK. Este hallazgo nos parece de la mayor importancia. Pareciera que para que se forme el Complejo Sinaptonémico en el brazo corto, es necesario que el telómero 1 esté unido a la envoltura nuclear. Si ésto no ocurre, como en la situación que estamos comentando, o como cuando el BK de un Bivalente Nucleolar se sobrepone a otro BK, los ejes quedan libres en la masa de cromatina entrando en contactos heterólogos e interactuando con sectores semejantes de otros Bivalentes (Fig. 33). Este fenómeno debería traer consigo una desorganización en la posición de las cromatinas atadas a los respectivos ejes, situación que creemos podría favorecer la inestabilidad estructural del Dominio Nu-

cleolar respectivo. En estos Dominios Nucleolares se organizan también un único FC-NOR y un único nucléolo, por lo que las consideraciones anteriores para asociaciones corrientes son también válidas para estos casos. La posición libre de los ejes en los BK de esta manera asociados podría contribuir al enfrentamiento de cromatinas heterólogas en una disposición espacial diferente a las ya discutidas, situaciones que podrían dar cuenta de algunos de los reordenamientos de tipo asimétrico. No creemos que puedan producirse interacciones de esta naturaleza entre los ejes de los Bivalentes Nucleolares y los ejes del bivalente XY. Estos últimos permanecen siempre rodeados por la espesa capa de cromatina condensada que les es propia.

No se pueden excluir, sin embargo, interacciones de naturaleza funcional, las que estarían avaladas por la presencia en el seno de la vesícula sexual de material ribonucleoproteico (EDTA positivo) en particulares momentos del desarrollo de la profase meiótica.

Si analizamos los reordenamientos de cromosomas nucleolares humanos conocidos, vemos que entre ellos los más frecuentes son las translocaciones en las que se han conservado los brazos largos de los cromosomas D y G (t DqGq), como también sectores variables de los brazos cortos de los mismos cromosomas (Niebuhr, 1972; Hsu et al., 1975; Mattei et al., 1979; Mikkelsen et al., 1980; Pincheira et al., 1984). Una clasificación de estos reordenamientos se ilustra en la Figura 34. Ellos corresponden a cromosomas monocéntricos sin NOR, monocéntricos con NOR, dicéntricos sin NOR, dicéntricos con NOR, dicéntricos con NOR y sat, etc. (Fig. 34). La evaluación de tales reordenamientos respecto de qué sectores cromosómicos aparecen directamente comprometidos, nos demuestra que son los mismos que en distintos tipos de enfrentamiento participan en la organización del Dominio Nucleolar. Si consideramos que para que los reordenamientos surjan es necesario que los cromosomas y los sectores cromosómicos estén en contacto, (Fernández-Donoso, 1982a y b), los Dominios Nucleolares meióticos descritos y comentados en este trabajo constituyen el ámbito

en el cual dichos fenómenos ocurrirían con una alta probabilidad.

No obstante, la efectiva ocurrencia de reordenamientos entre cromosomas nucleolares en asociación dependerá de la capacidad de las cromatinas en contacto para formar heteroduplex de intercambio viables entre cromosomas no homólogos (Fernández-Donoso, 1982b).

La ocurrencia de este fenómeno aparecería avalada por dos descubrimientos importantes: el primero se refiere a los DNA satélites I, II, III y IV del hombre, los cuales se ubican en el brazo corto de todos los cromosomas nucleolares (Gosden et al., 1975); y el segundo que demuestra que existe homogeneidad en los espaciadores de transcripción de los cistrones ribosomales humanos (Arnheim et al., 1980; Seuánez, 1983). Ambos fenómenos han sido considerados como una de las consecuencias de las asociaciones con intercambio (crossing-overs heterólogos), no conducentes a reordenamientos entre los cromosomas nucleolares humanos (Arnheim et al., 1980). Creemos que estos intercambios debe-

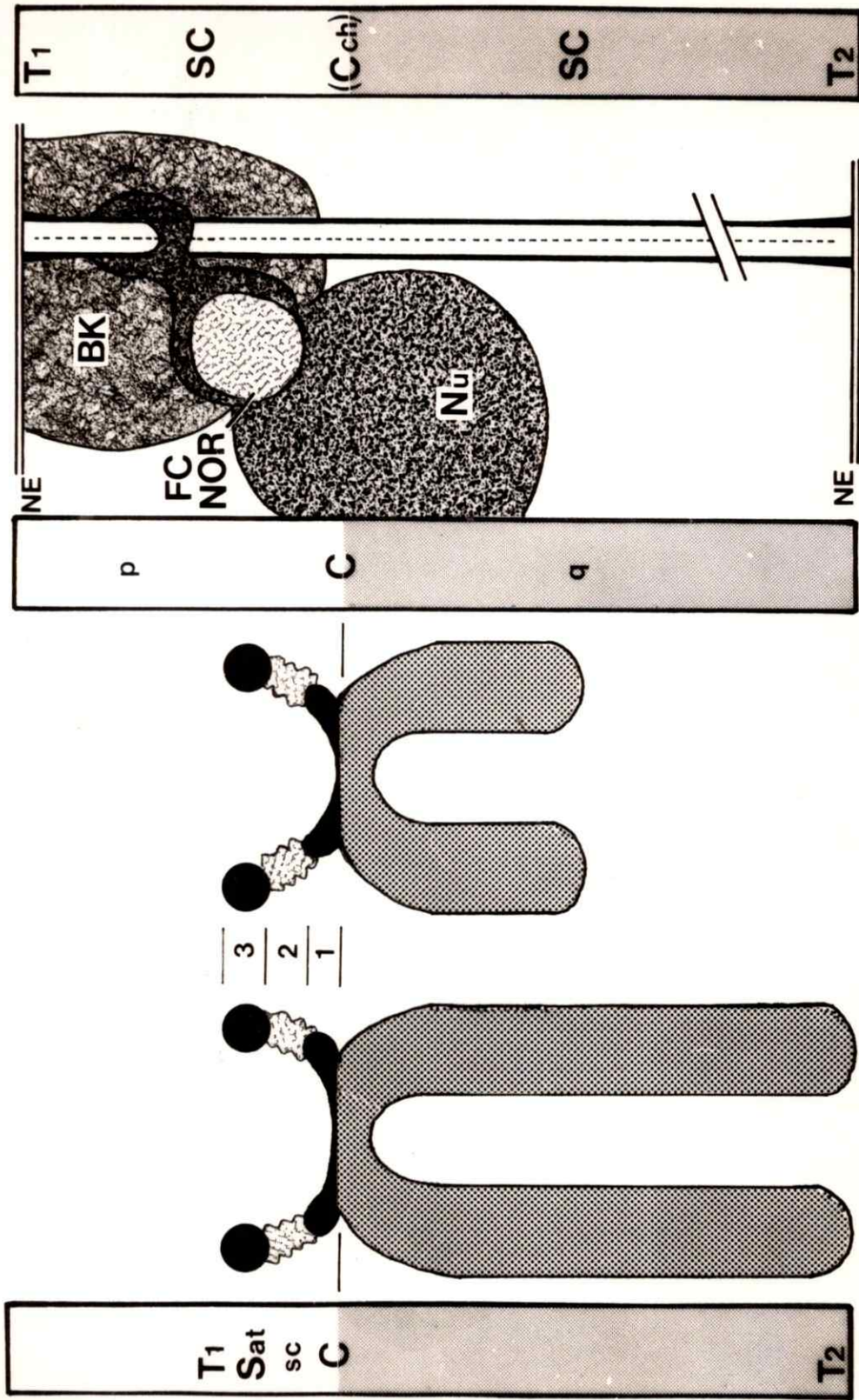
rían ocurrir en los Dominios Nucleolares. Otras consecuencias de las asociaciones serían necesariamente los reordenamientos robertsonianos, los que además de comprometer a la cromatina involucrarían a los ejes cromosómicos. La ocurrencia de reordenamientos cromosómicos estructurales creemos estarían estrechamente relacionados con situaciones como aquellas en las cuales los ejes cromosómicos homólogos no se encuentran apareados sino libres, y muy próximos entre sí los ejes de cromosomas heterólogos.

FIGURA 29

Esquema que ilustra la relación encontrada entre el Dominio Nucleolar de un Bivalente meiótico D o G y el brazo corto de un cromosoma metafásico mitótico D o G.

El Dominio Nucleolar corresponde al sector blanco de las columnas. El sector gris de cada columna señala el brazo largo de un cromosoma o Bivalente D o G.

- p : brazo corto del cromosoma
- q : brazo largo del cromosoma
- T₁ : telómero 1 o nucleolar
- T₂ : telómero 2 o distal
- Sat : cromatina satélite correspondiente a la banda p13 de un cromosoma humano D o G.
- sc : constricción secundaria (banda p12)
- C : Centrómero (banda p11)
- NE : envoltura nuclear
- BK : basal knob
- FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del Nucléolo.
- Nu : nucléolo compuesto principalmente de zona granular
- (Cch) : Cromatina centromérica presuntiva
- SC : Complejo Sinaptonémico



29

FIGURA 30

Esquema que ilustra un modelo integrado de los cambios en la organización del nucléolo y Dominio Nucleolar durante las etapas de la profase meiótica, observados en esta tesis.

Zigoteno: Las cromatinas NOR de ambos cromosomas homólogos ya apareados se reúnen en un FC-NOR y a través de él emergen en asas. De estas asas y del producto de su transcripción se compone la zona fibrilar del nucléolo, ahora incipiente (f-Nu).

Paquiteno temprano: Las cromatinas NOR se encuentran ampliamente descondensadas y activas en su transcripción con lo cual aumenta la extensión de la zona fibrilar del Nu. Parte de la zona fibrilar madura a zona granular de nucléolo (g-Nu).

Paquiteno medio: Las cromatinas NOR se recogen, el FC-NOR aumenta de tamaño y las fibrillas se han transformado en gránulos, los cuales aparecen agregados en una esfera (g-Nu).

Paquiteno tardío: La cromatina de los cromosomas homólogos aún apareados se encuentra muy condensada y sin evidenciar el sitio de localización de la cromatina NOR. La esfera de gránulos se ha desprendido y la acompaña un cuerpo vacuolado de carácter proteico (*).

Fig. 30.

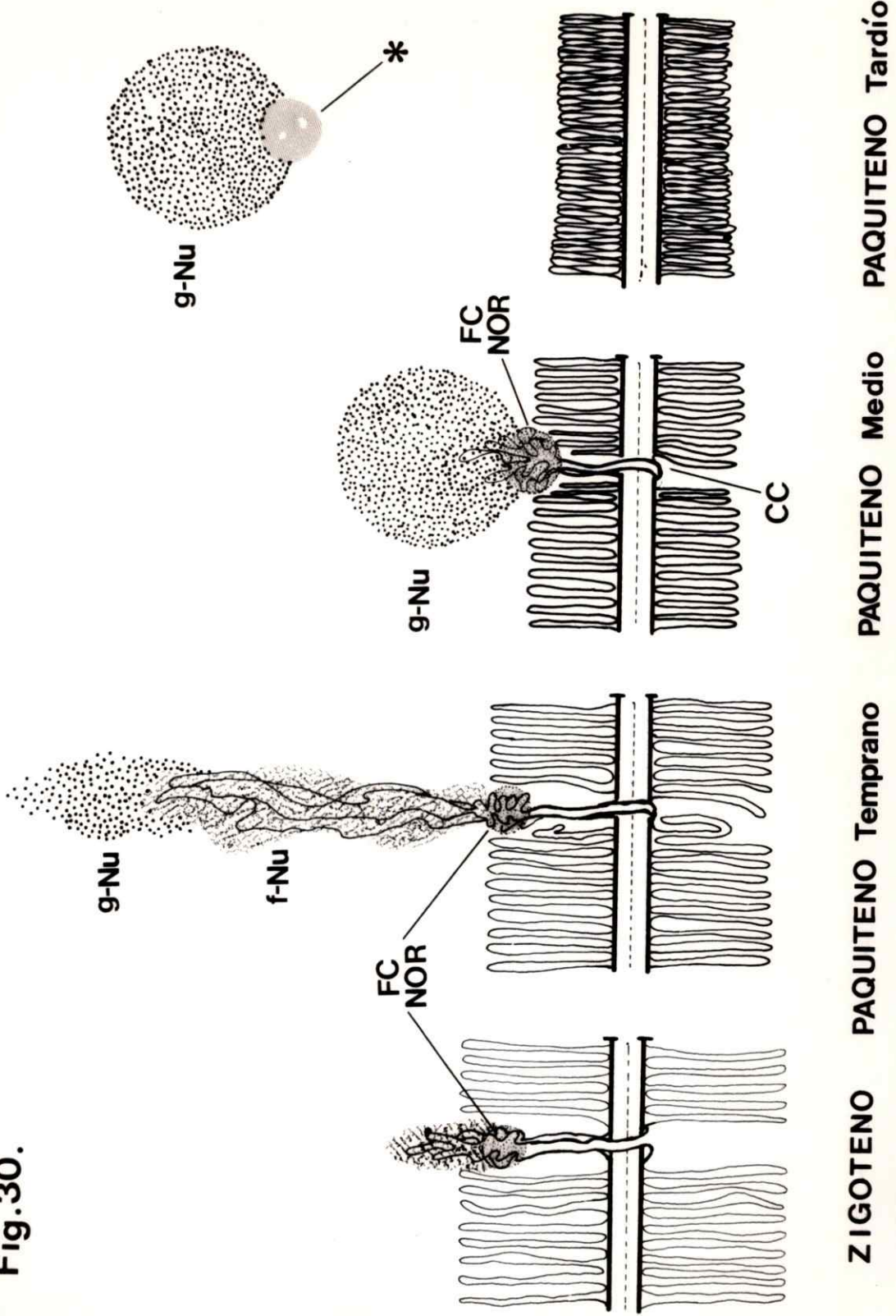


FIGURA 31

Bivalentes Nucleolares y Dominios Nucleolares.

Esquemas de Dominios Nucleolares simples o compuestos en los que se representan las estructuras que los componen y sus relaciones.

- a) Dominio Nucleolar de un Bivalente D o G
- b) Dominio Nucleolar de dos Bivalentes D Y G

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

CC : Cromatina de Conexión

BK : basal knob o cromatina condensada basal

Nu : nucléolo

T₁ : telómero 1 o nucleolar

T₂ : telómero 2 o no nucleolar

en : envoltura nuclear

Fig 31

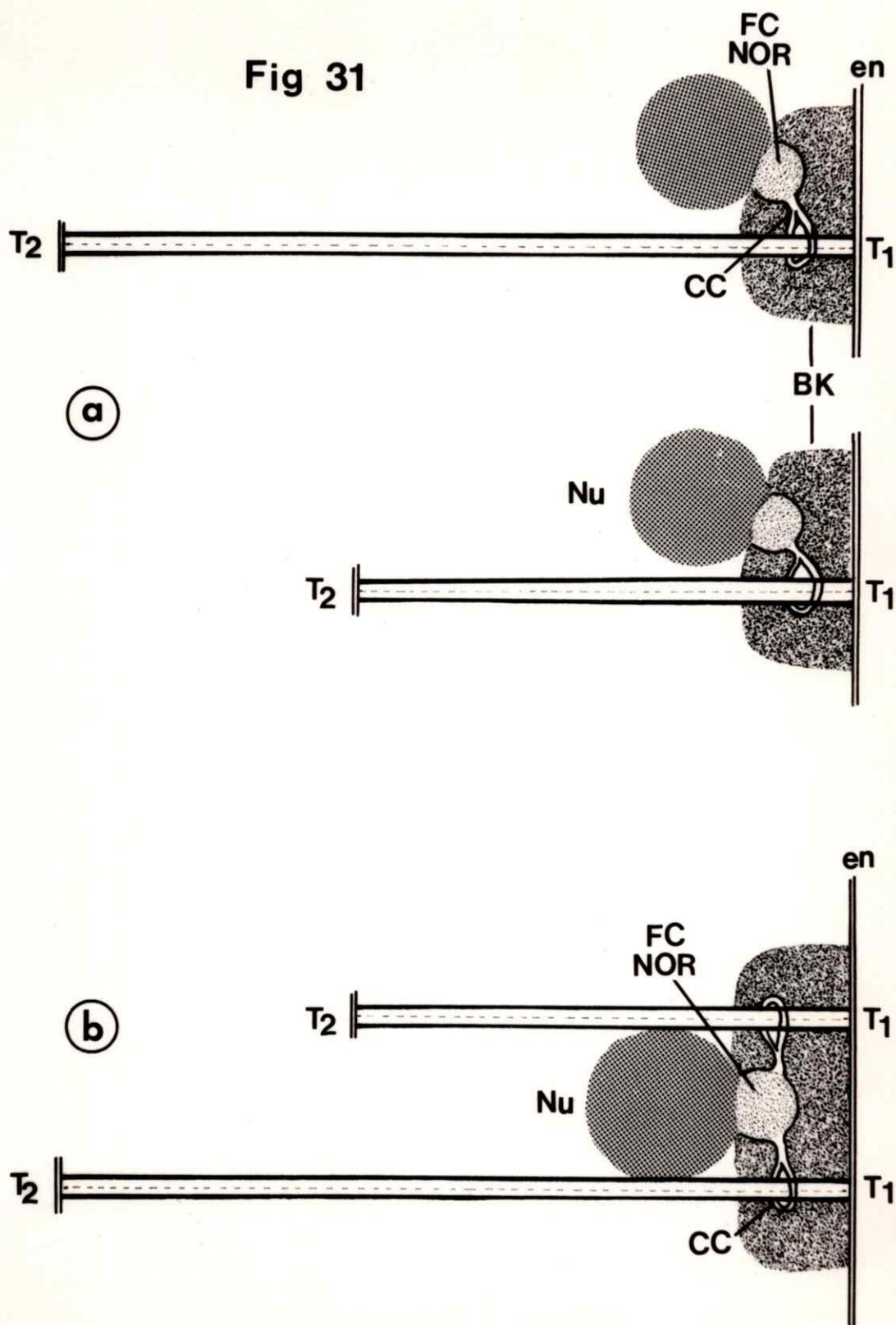


FIGURA 32

Dominios Nucleolares y asociaciones de Bivalentes.

Esquemas de Dominios Nucleolares en los cuales se encuentran asociados dos, tres y hasta cuatro Bivalentes Nucleolares. En cada Dominio, se ilustra la disposición de los Complejos Sinaptonémicos de los Bivalentes Nucleolares D o G. También se ilustran las relaciones entre las otras estructuras que componen el Dominio Nucleolar, tales como FC-NOR, Cromatina de Conexión, BK y Centrómero.

La asociación de tres Bivalentes corresponde a la serie de la Figura 22.

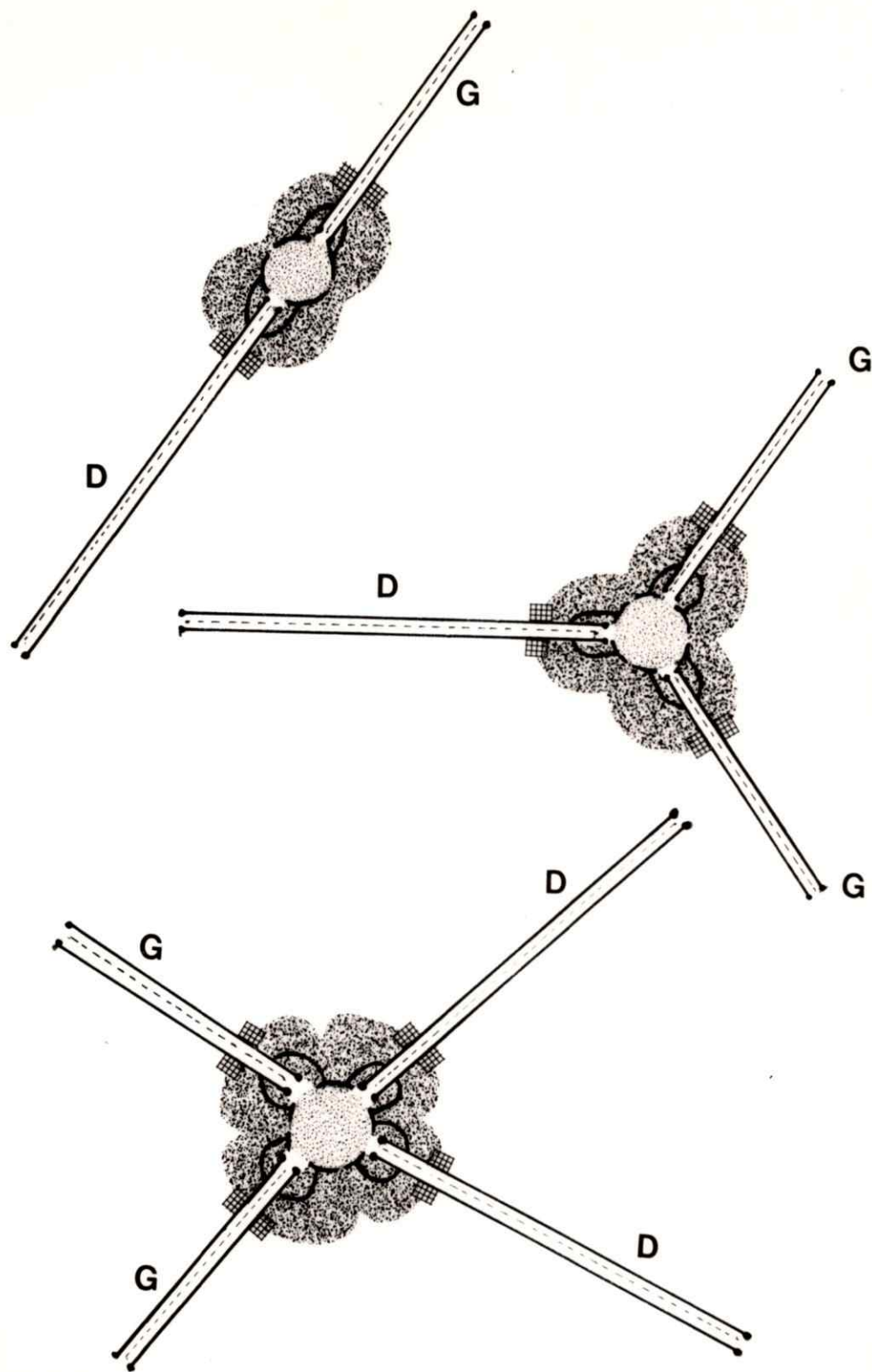


Fig 32

FIGURA 33

Telómeros 1 de los Bivalentes Nucleolares.

a) En un Dominio Nucleolar compuesto de dos Bivalentes Nucleolares estrechamente unidos por sus telómeros 1 no apareados.

b y c) En Dominios Nucleolares simples o compuestos situados sobre el ápice del bivalente XY, en los cuales no se forma Complejo Sinaptonémico.

↑ : inserción a la envoltura nuclear de un telómero 1 simple.

↑↑ : inserción a la envoltura nuclear de un telómero 2 de un Complejo Sinaptonémico.

Nu : nucléolo compuesto principalmente de zona granular.

BK : basal knob o cromatina condensada basal

FC-NOR: Centro fibrilar de la Región Organizadora del nucléolo.

XY : bivalente sexual

en : envoltura nuclear

Fig 33

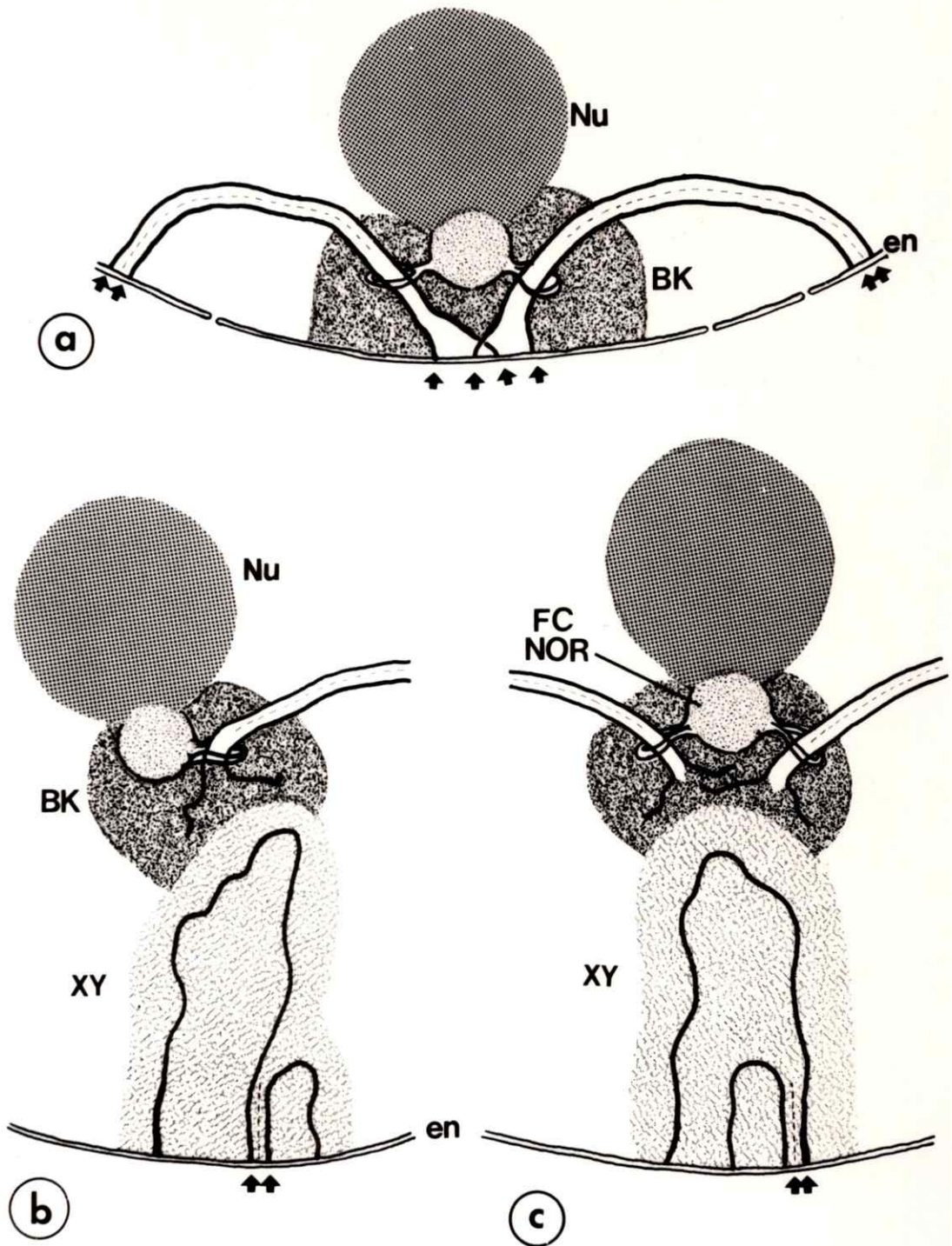


FIGURA 34

Reordenamientos entre cromosomas nucleolares D y G del tipo translocaciones robertsonianas.

Se ilustra un cromosoma nucleolar D y otro G (a) en los que se ha indicado el centrómero (▣) y el NOR (○). Los cromosomas t (Dq Gq) producto de translocaciones se representan en 7 posibles formas de acuerdo al compromiso de los centrómeros y los NOR respectivos. Se agrega además los fragmentos cromosómicos o pequeños cromosomas que resultarían en cada oportunidad.

Para cada caso se indica a continuación el cromosoma resultante y la simetría del reordenamiento.

| <u>Cromosoma</u> | <u>reordenamiento</u> |
|-------------------------|-----------------------|
| b) Monocéntrico | asimétrico |
| c) Monocéntrico + NOR | asimétrico |
| d) Dicéntrico | simétrico |
| e) Dicéntrico + 1 NOR | asimétrico |
| f) Monocéntrico + 2 NOR | asimétrico |
| g) Dicéntrico + 2 NOR | simétrico |
| h) Dicéntrico + 2 NOR | simétrico |

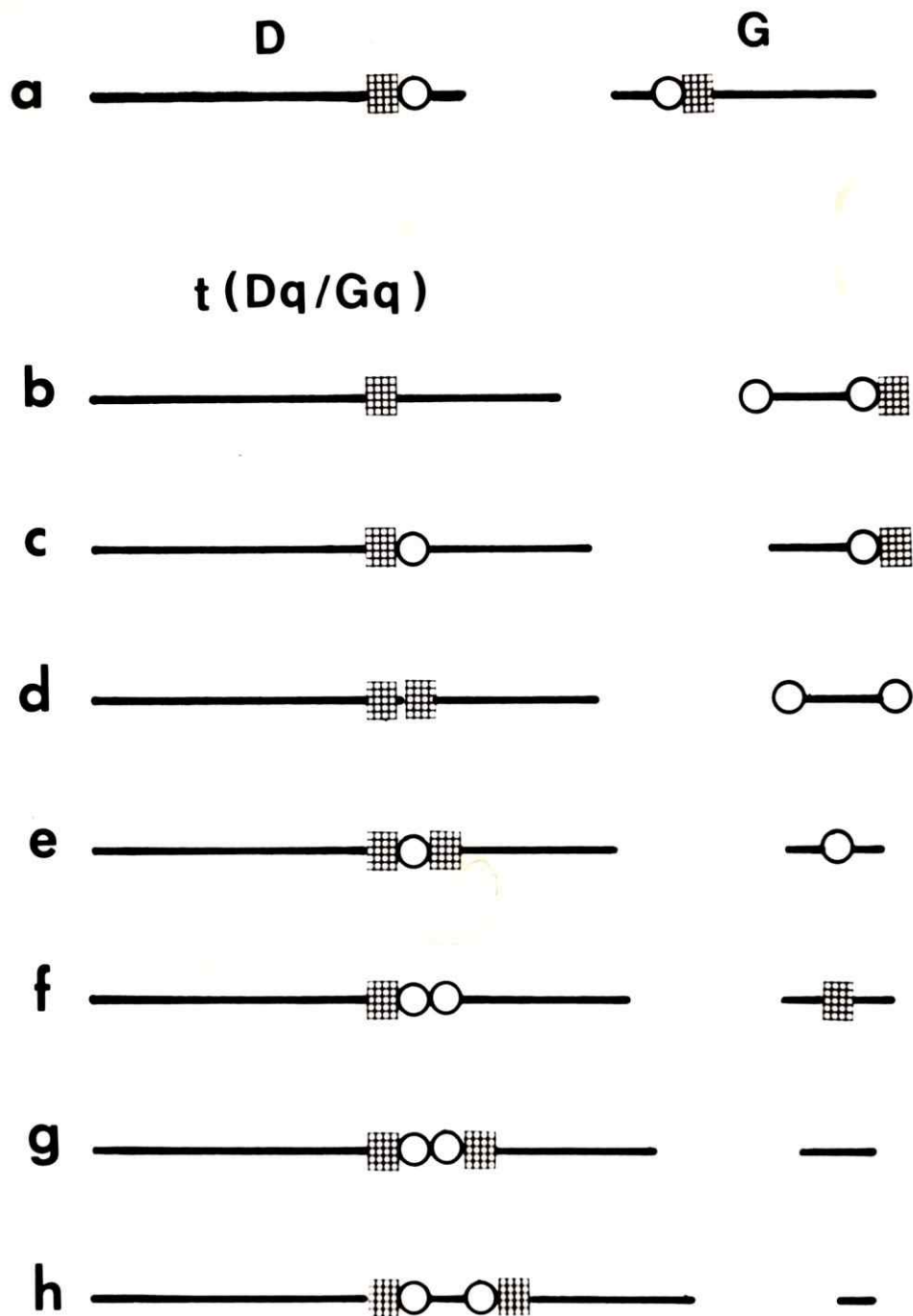


Fig 34

C O N C L U S I O N E S

A. ORGANIZACION DEL BIVALENTE

1. La estructura y organización del "cromómero nucleolar" se corresponde completamente con la de los elementos componentes de los brazos cortos de los cromosomas nucleolares.
2. La posición del "cromómero nucleolar" sobre el Complejo Sinaptonémico es próxima al telómero 1. Ello determina que éste y sus dependencias tengan una posición periférica en el núcleo del Espermatozocito.
3. Los brazos cortos de uno o más Bivalentes Nucleolares determinan en el núcleo del Espermatozocito los Dominios Nucleolares simples o compuestos respectivamente.

B. LOS DOMINIOS NUCLEOLARES Y LOS NUCLEOLOS

1. Dentro del Dominio Nucleolar, simple o compuesto, se puede reconocer claramente la presencia del NOR como

una unidad funcional compuesta por la Cromatina de Conexión (CC), el Centro Fibrilar del NOR (FC-NOR) y la Fibrilar del nucléolo.

2. Durante la profase meiótica la organización y estructura de los componentes del NOR y nucléolo varían y dicha variación se correlaciona con la funcionalidad y regulación nucleolares.
3. En el Dominio Nucleolar el FC-NOR ocupa una posición espacial determinada por la posición del organizador nucleolar en el Bivalente. En Dominios Nucleolares compuestos se conserva esta relación y el FC-NOR único es equidistante de los Bivalentes en asociación.

C. LAS ASOCIACIONES DE LOS BIVALENTES NUCLEOLARES

1. En el 40% de los Espermatoцитos los Bivalentes Nucleolares humanos D o G aparecen asociados entre sí en distintas combinaciones.
2. En el Dominio Nucleolar del Paquiteno, los Bivalentes Nucleolares D y G aparecen asociados en número

de 2, 3 y 4, conservándose en todos los casos la organización general del Dominio Nucleolar y un FC-NOR y Nucléolo.

3. En los Dominios Nucleolares compuestos se reúnen estrechamente las cromatinas que componen los brazos cortos de los Bivalentes D y G en asociación.
4. El NOR de Dominios Nucleolares simples o compuestos sería el principal inductor o contribuyente a los fenómenos de disyunción anormal y de intercambio de cistrones ribosomales entre cromosomas nucleolares homólogos y no homólogos.
5. La estrecha y reiterada asociación de los ejes cromosómicos especialmente aquellos no apareados, y de las cromatinas que componen los brazos cortos de los Bivalentes D y G, entre ellas especialmente el NOR, serían los principales contribuyentes a la ocurrencia de translocaciones entre cromosomas nucleolares.

B I B L I O G R A F I A

- Arnheim, N., Krystal, M., Schmickel, R., Wilson, G., Ryder, O., Zimmer, E., (1980). Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (12): 7323 - 7727.
- Baker, T.G., (1983). A quantitative and Cytological study of Germ Cells in human ovaries. Proc. Roy. Soc. B. 158: 417 - 433.
- Bernhard, W., (1969). A new staining procedure for electron microscopical cytology. J. Ultras. Res. 27: 250 - 265.
- Berríos, M.S., Pincheira, J. y Fernández-Donoso, R., (1980). Factores que determinan la posición del nucléolo en los espermatoцитos. Arch. Biol. Med. Exper. 13 (1): 138, (Resumen).
- Berríos, M.S. y Fernández-Donoso, R., (1981). Nucléolo y bivalentes nucleolares del espermatoцитo humano en Paquiteno. Arch. Biol. Med. Exper. 14 (1): 44, (Resumen).

Berríos, S., (1981-1982). Organización del Nucléolo y de los Bivalentes Nucleolares del Espermatocito Humano durante la profase de la meiosis. Proyecto de tesis, 44 pp. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Berríos, S., (1983). Número, Tamaño y Posición de los Nucléolos del Espermatocito Humano en Paquiteno. Arch. Biol. Med. Exper. 16 (2): 213, (Resumen).

Berthelsen, J., Fogh, M. and Skakback, N., (1980). Electron Microscopical Analysis of Meiotic Chromosomes from Human Spermatocytes during and after treatment with steroid Hormones. Carlsberg. Res. Commun. 45: 9 - 23.

Bobrow, M. and Heritage, J., (1980). Nonrandom Segregation of Nucleolar organizing chromosomes at mitosis?. Nature. 288: 79 - 81.

Bordjadze, V.K. and Prokofieva-Belgovskaya, A., (1971). Pachytene analysis of human acrocentric chromosomes. Cytogenetics. 10: 38 - 49.

Bush, H. and Smetana, K., (1970). The nucleolus. Academic Press, New York.

Clermont, Y., (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.* 112: 35 - 51.

Cohen, M. and Shaw, M., (1967). The association of acrocentric chromosomes in 1000 normal human male metaphase cells. *Ann. Hum. Genet.* 31: 129 - 137.

Comings, D.E., (1978). Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 12: 25 - 46.

Cooke, P., (1972). Patterns of secondary association between the acrocentric autosomes of man. *Chromosoma.* 36: 221-240.

Chandley, A.C., (1979). Chromosomal basis of human infertility. *British Medical Bulletin.* 35 (2): 181 - 186.

Chemes, H.E., Fawcett, D. and Dym, M., (1978). Unusual Features of the Nuclear Envelope in Human Spermatogenic Cells. *The anatomical Records.* 129 (4): 493 - 511.

- Davidson, E.V., Roberts, D.F. and Callow, M.H., (1981).
Satellite Association in Down's Syndrome. Hum. Genet.
56: 309 - 313.
- Del Mazo, J., Pérez Castillo, A. and Abrisqueta, J.A.,
(1983). Trisomy 21: Origin of non - disjunction. Human
Genetics. 62 (4): 316 - 320.
- Denton, T.E., Howell, W.M. and Barret, J.V., (1976). Human
nucleolar organizer chromosomes: satellite associa-
tions. Chromosoma. 55: 81 - 89.
- Dym, M. and Fawcett, D., (1971). Further Observations on
the numbers of Spermatogonia, Spermatocytes and Sperma-
tids connected by intercellular Bridges in the Mamma-
lian testis. Biology of Reproduction. 4: 195 - 215.
- Esponda, P. and Stockert, J.C., (1971). Localization of RNA
in the Synaptinemal Complex. J. Ultrastructure Research.
35: 411 - 417.
- Esponda, P. and Giménez-Martín, G., (1975). Nucleolar Orga-
nizer Ultrastructure in *Allium Cepa*. Chromosoma (Berl).
52: 73 - 87.

- Evans, H.J., (1967). The nucleolus, virus infection, and trisomy in man. *Nature*. 214: 361 - 363.
- Fang, J.S. and Georgiana, J., (1983). Complete Chromomere Map of Mid/Late Pachytene Human Oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 35: 879 - 888.
- Fawcett, D.W., Ita, S. and Slautterback, D., (1959). The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. *J. Biophys. Cytol.* 5: 453 - 460.
- Fawcett, D., Eddy, E. and Phillips, D., (1970). Observations on the fine structure and relationships of the chroma-toid body in Mammalian Spermatogenesis. *Biology of Re-production.* 2: 129 - 153.
- Fawcett, D.W. and Chemes, H., (1979). Changes in distribu-tion of nuclear pores during differentiation of the male cells. *Tissue and Cell.* 11 (1): 147 - 162.
- Ferguson-Smith, M. and Handmaker, S., (1961). Observations the satellited human Chromosomes. *The Lancet.* I: 638 - 640.

- Ferguson-Smith, M. and Handmaker, H., (1963). The association of satellited chromosomes with specific chromosomal regions in cultured human somatic cells. *Amm. Hum. Genet.* 27: 143 - 156.
- Ferguson-Smith, M.A., (1964). The sites of nucleolus formation in human pachytene chromosomes. *Cytogenetics.* 2: 124 - 134.
- Fernández-Donoso, R. y Wettstein, R., (1976). Caracterización de marcadores e identificación cromosómica en la profase meiótica de *Marmosa elegans* (Didelphidae Marsupialia). *Rev. Micr. Elect.* 3 (1): 52 - 53.
- Fernández-Donoso, R., Berríos, S. and Pincheira, J., (1979). Position of the nucleolus within the nuclei of pachytene spermatocytes of *Dromiciops australis* and *Marmosa elegans* (Didelphoidea Marsupialia). *Experientia.* 35: 1021 - 1023.
- Fernández-Donoso, R., (1980). Organización del núcleo: cromosomas nucleolares. *Actas IV Congr. Latinoam. Genética.* 2: 133 - 138.

- Fernández-Donoso, R. and Berríos, S., (1980). Ultrastructure of the sex Chromosomes and Nucleolus in Early Spermatids of *Marmosa elegans* and *Dromiciops australis* (Didelphoidea - Marsupialia). Arch. Biol. Med. Exp. 13: 351 - 360.
- Fernández-Donoso, R., (1981). Asociaciones cromosómicas en el núcleo de los meiocitos y reordenamientos cromosómicos. Arch. Biol. Med. Exper. 14 (1): 12 - 13.
- Fernández-Donoso, R., (1982a). La Arquitectura del Núcleo y los reordenamientos cromosómicos en los mamíferos. Museo Nacional de Historia Natural., Publicación Ocasional. 38: 165 - 195.
- Fernández-Donoso, R., (1982b). Asociaciones cromosómicas en el Núcleo de los meiocitos y reordenamientos cromosómicos. Actas V Congr. Latinoam. Genética. pp. 105 - 114.
- Franke, W.W., Scheer, V., Trendelenburg, M., Zentgraf, H. and Spring, H., (1978). Morphology of transcriptionally active chromatin. Cold. Spring. Harbor. Symposia on Quantitative Biology. Vol. XLII. Chromatin. pp. 755 - 772.

- Gillies, C.B., (1973). Ultrastructural analysis of maize pachytene karyotype by the dimensional reconstruction of the synaptonemal complexes. *Chromosoma*. 43: 145 - 176.
- Giménez-Martín, G., de la Torre, C., López-Sáez, J.F. and Esponda, P., (1977). Plant nucleolus: structure and Physiology. *Cytobiologie*. 14: 421 - 462.
- Giraud, F., Mattei, J.F. et Mattei, M.G., (1975). Etude chromosomique chez les parents d'enfants trisomiques 21: chromosomes Marqueur, remaniements, cassures et aneuploidies. *Lyon Med*. 233: 241 - 251.
- Goessens, G., (1974). Etude autoradiographique au microscope électronique des nucléoles de cellules tumorales d'Ehrlich. Mise en évidence d'ADN au niveau des Centre fibrillaires. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 279: 991 - 993.
- Goessens, G. and Lepoint, A., (1979). The nucleolus-organizing regions (NOR'S): Recent data and hypothesis. *Biol. Cellulaire*. 35: 211 - 220.

- Goodpasture, C. and Bloom, S., (1975). Visualization of nucleolar organizer regions in Mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*. 53: 37 - 50.
- Gosden, J.R., Mitchell, A.R., Buckland, R.A., Clayton, R.P., Evans, H.J., (1975). The location of four human satellite DNA on human chromosomes. *Exp. Cell Res.* 92: 148 - 158.
- Granboulan, N. et Granboulan, Ph., (1965). Cytochimie ultrastructurale du nucléole II Etude des sites de synthèse du RNA dans le nucléole et le noyau. *Exp. Cell. Res.* 38: 604 - 619.
- Hamerton, J.L., Comming, N., Ray, M. and Smith, S., (1975). A Cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I Incidence of chromosome abnormalities. *Clinical Genetics*. 8: 223 - 243.
- Hassold, T., Chen, N., Funkhouser, J., Jooss, T., Manuel, B., Matsuura, A., Matsuyama, C., Wilson, J., Yamane, J.A. and Jacobs, P.A., (1980). A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann. Hum. Genet. (Lond)*. 44: 151 - 178.

- Hayat, M.A., (1975). Positive staining for Electron Microscopy. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Heller, C. and Clermont, Y., (1964). Kinetics of the germinal epithelium in man. Rec. Progr. Ham. Res. 20: 545 - 575.
- Henderson, A.S., Warbutton, D. and Atwood, K.C., (1972). Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. Proc. Nat. Acad. Sci. 69 (11): 3393 - 3398.
- Henderson, A.S., Warburton, D. and Arwood, K.C., (1973). Ribosomal DNA connectives between human acrocentric chromosomes. Nature. 245 (5420): 95 - 97.
- Hofgartner, F.J., Schmid, M., Krome, W., Zenzes, M. and Engel, W., (1979). Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver stainings. Chromosoma. 71: 197 - 216.
- Holm, P.B. and Rasmussen, S.W., (1977a). Human Meiosis I. The human pachytene karyotype analyzed by three dimensional reconstruction of the synaptonemal complex. Carlsberg. Res. Commun. 42: 283 - 323.

- Holm, P.B. and Rasmussen, S.W., (1977b). Human Meiosis III. Electron microscopical analysis of chromosomes in human spermatocytes. *Chromosomes Today*. 6: 83 - 93.
- Hsu, T.C., Spirito, S. and Pardue, M.L., (1975). Distribution of 18 + 28S Ribosomal Genes in mammalian genomes. *Chromosoma*. 53: 25 - 36.
- Hubbell, H., Rothblum, L. and Hsu, T.C., (1979). Identification of a silver binding protein associated with the cytological silver staining of actively transcribing nucleolar regions. *Cell. Biol. Int. Reports*. 3 (7): 615 - 622.
- Hungerford, D.A., (1971a). Chromosome structure and function in man I Pachytene mapping in the male, improved methods and general discussion of initial results. *Cytogenetics*. 10: 23 - 32.
- Hungerford, D.A., La Badie, G. and Balaban, G. (1971b). Chromosome structure and function in man. II Provisional maps of the two smallest autosomes (chromosomes 21 and 22) at pachytene in the male. *Cytogenetics*. 10: 33 - 37.

ISCN., (1978). An International System for human Cytogenetic Nomenclature. Birth Defects: Original Article Series, Vol. XIV, N° 8 (The National Foundation, New York 1978) also in Cytogenetics and Cell Genetics. 21 (6): 309 - 404.

Jordan, E.G. and Luck, B.T., (1976). The nucleolus and the synaptonemal complex in *Endymion non scriptus* (L). J. Cell. Sci. 22: 75 - 86.

Jordan, E.G., Bennett, M.D. and Smith, J.B. (1982). Nucleolar Organizers and Fibrillar Centres in *Triticum aestivum* L. cv Chinese Spring.

Kierszenbaun, A.L. and Tres, L., (1974). Nucleolar and perichromosomal RNA synthesis during meiotic prophase in the mouse testes. J. Cell. Biol. 60: 39 - 53.

Knibiehler, B., Navarro, A., Mirre, C. and Stahl, A. (1977). Localization of ribosomal cistrons in the quail oocyte during meiotic prophase I. Experimental Cell Research. 110: 153 - 157.

- Krimer, D.B. and Esponda, P., (1979). Nucleolar fibrillar centers in mouse spermatid nucleoli. *Eur. J. Cell. Biol.* 20: 156 - 158.
- Lischwe, M., Richards, R., Bush, R. and Bush, H., (1981). Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions. *Exp. Cell. Res.* 136: 101 - 109.
- Luciani, J.M., Morazzani, M-R. and Stahl, A., (1975). Identification of Pachytene Bivalents in Human Male Meiosis using G-Banding Technique. *Chromosoma. (Berl)*. 52: 275 - 282.
- Maguire, M.P., (1983). Chromosome Behavior at Premeiotic mitosis in maize. *J. Hered.* 74 (2): 93 - 99.
- Mattei, J.F., Ayme, S., Mattei, M.G., Gouvernet, J. and Giraud, F., (1976). Quantitative and qualitative study of Acrocentric Associations in 109 Normal Subjects. *Hum. Genet.* 34: 185 - 194.
- Mattei, J.F., Mattei, M.G., Ayme, S. and Giraud, F., (1979). Origin of the extra chromosome in trisomy 21. *Hum. Genet.* 46: 107 - 110.

- Mauléon, P., (1968). Cinétique de l'ovogénèse chez les Mammifères. En: La Physiologie de la Reproduction Chez les Mammifères. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. pp. 125 - 150.
- Mikkelsen, M., Basti, A. and Poulsen, H., (1980). Nucleolus organizer regions in translocations involving acrocentric chromosomes. *Cytogenet. Cell. Genet.* 26: 14 - 21.
- Miller, O.L. and Beatty, B., (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science.* 164: 955 - 957.
- Miller, O.J., Miller, D., Dev., V., Tantravahi, R. and Croce, C., (1976). Expression of human and suppression of mouse nucleolar organizer activity in mouse human somatic cell hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 (12): 4531 - 4535.
- Miller, D.A., Tantravahi, R., Dev, V.G. and Miller, O.J., (1977). Frequency of satellite association of human chromosomes is correlated with amount of Ag-staining of the nucleolus organizer region. *Am. J. Hum. Genet.* 20: 490 - 502.

- Mirre, B., Hartung, M. and Stahl, A., (1980). Association of ribosomal genes in the fibrillar center of the nucleolus: A factor influencing translocation and nondisjunction in the human meiotic ovocyte. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77 (10): 6017 - 6021.
- Moens, P.B., (1969). The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in *Locusta migratoria* spermatocytes. *Chromosoma.* 28: 1 - 25.
- Moens, P.B., (1978). Ultrastructural studies of chiasma distribution. *Ann. Rev. Genet.* 12: 433 - 450.
- Monesi, V., (1965). Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse. RNA and protein. *Exp. Cell. Res.* 39: 197.
- Monesi, V., Geremia, R., D'Agostino, A. and Boitani, C., (1978). Biochemistry of male germ cell differentiation in mammals: RNA synthesis in meiotic and post meiotic cells. *Current Topics in developmental biology* (Moscona, A.A. and Monroy, A. Eds.). Academic Res. New York. pp. 11.

- Moses, M.J., (1968). Synaptonemal complex. Ann. Review of Genetics. 2: 363 - 412.
- Niebur, E., (1972). Dicentric and Monocentric Robertsonian Translocations in Man. Humangenetik. 16: 217 - 226.
- Oakberg, E.F., (1968). ³H. Uridine labeling of mouse oocytes. En: La Physiologie de la Reproduction Chez les Mammiferes. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. pp. 171 - 182.
- Ohno, S., Trujillo, J., Kaplan, W. and Kinosito, R., (1961). Nucleolus-organizers in the causation of chromosomal anomalies in man. The Lancet II. 123 - 126.
- Pincheira, J., Fernández-Donoso, R. and Santos, M., (1984). Down's syndrome with 46,XY t(14; 21)/47,XY + 21 Mosaicism "Persistent" satellite association as a possible cause of nondisjunction and translocation events. Human Genetics. (Trabajo aceptado para publicar).
- Puvion-Dutilleul, F., (1983). Morphology of transcription at Cellular and Molecular Levels. International Review of Cytology. 84: 57 - 101.

- Rasmussen, S.W. and Holm, P.B., (1978). Human Meiosis II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlsberg Res. Commun.* 43: 275 - 327.
- Rasmussen, S.W. and Holm, P.B., (1980). Mechanics of meiosis. *Hereditas.* 93: 187 - 216.
- Recher, L., Whitescarver, J. and Briggs, L., (1969). The fine structure of a nucleolar constituent. *J. Ultrastructure Research.* 29: 1 - 14.
- Reynolds, E.S., (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 17: 208 - 213.
- Scheer, V. and Zentgraf, H., (1982). Morphology of Nucleolar chromatin in electron Microscopic Spread Preparations. En: *The cell Nucleus. Vol. II, rDNA PtB.* Editado por Bush, H. y Rothblum, L. Academic Press (New York). pp. 143 - 177.
- Scheer, V. and Rose, K.M., (1984). Localization of transcribed rRNA Genes in interphase cells and detection of RNA polymerase I Bound to mitotic chromosomes by light and electron microscopic immunocytochemistry. Resumen, (Comunicación personal).

- Schwaszacher, H.G., Mikelsaar, A. and Schnedl, W., (1978).
The nature of the Ag-staining of the nucleolus organizer regions. *Cytogenet. and Cell Genetics*. 20: 24-39.
- Seuáñez, H., (1983). *The Phylogeny of human Chromosomes*.
Springer-Verlag. Berlín Heidelberg. New York. 189 pp.
- Solari, A.J. and Tres, L.L., (1967). The ultrastructure of
the Human Sex visicle. *Chromosoma (Berl)*. 22: 16 - 31.
- Solari, A.J. and Tres, L., (1970). The three - dimensional
reconstruction of the XY chromosomal pair in human
spermatocytes. *J. Cell. Biol.* 45: 43 - 53.
- Solari, A.J., (1980). Synaptonemal complexes and associated
structures in microspread human spermatocytes. *Chromo-
soma*. 81: 315 - 337.
- Solari, A.J., (1982). Recombination Bars in Human Synapto-
nemal complexes spread with sodium dodecyl sulphate.
Actas V Congr. Latinoam. Genética. 115 - 123.

- Sotelo, J. and Wettstein, R., (1966). Fine structure of meiotic chromosomes. Comparative study of nine species of insects. *Chromosoma*. 20: 234 - 250.
- Stahl, A., Luciani, J.M., Hartung, M., Devictor, M., Bergé-Lefranc, J.L. and Guichaoua, M., (1983). Structural basis for Robertsonian translocations in man: Association of ribosomal genes in the nucleolar fibrillar center in meiotic spermatocytes and oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 5946 - 5950.
- Tres, L., (1975). Nucleolar RNA synthesis of meiotic prophase spermatocytes in the human testes. *Chromosoma*. 53: 141 - 151.
- Wettstein, R. and Sotelo, J.R., (1967). Electron microscopic serial reconstruction of the spermatocytes I Nucleo at Pachytene. *J. Microsc.* 6: 557 - 576.
- Westergaard, M. and von Wettstein, D., (1972). The synaptonemal complex. *Annual Review of Genetics*. 6: 71 - 109.

Wolfe, S., (1981). Nuclear Structure and function in RNA transcription. Capítulo XII, en: Biology of the Cell. Segunda Edición. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California, U.S.A.