

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y LETRAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

**ULTRAESTRUCTURA DE LOS ESTADIOS  
PREMEYOTICOS Y MEYOTICOS  
DE LA RATA**

**Rattus norvegicus**

Tesis de Grado presentada para optar al título  
de Licenciado en Biología con especialidad  
en Genética

**POR**

**JUAN FRANCISCO UREÑA CALDERON**

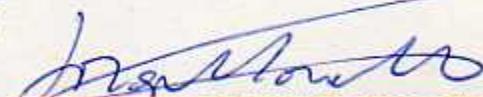
**1971**

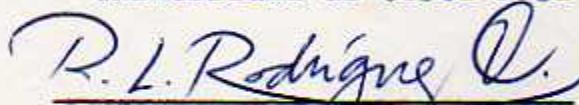
ULTRAESTRUCTURA DE LOS ESTADIOS PREMEYOTICOS Y  
MEYOTICOS DE LA RATA (Rattus norvegicus)

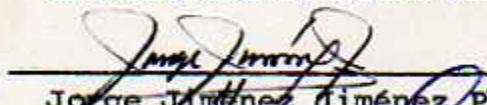
TESIS

Presentada en el  
Departamento de Biología

APROBADA:

  
Director de Investigación  
Jorge Mora Urpi Ph.D.  
Universidad de Costa Rica

  
Tribunal  
Rafael I. Rodríguez C. Ph.D.  
Universidad de Costa Rica

  
Tribunal  
Jorge Jiménez Jiménez Ph.D.  
Universidad de Costa Rica

  
Tribunal  
José Alberto Sáenz R. Lic.  
Universidad de Costa Rica

  
Tribunal  
Luis Alberto Fournier O. Ph.D.  
Universidad de Costa Rica

A MIS PADRES, ESPOSA E HIJA.

## AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar un agradecimiento a las siguientes personas. En forma especial al Dr. Alberto J. Solari, profesor de Citología y Citogenética de la segunda cátedra de Histología, Citología y Embriología de la Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Argentina, por la forma desinteresada y amplia con que me formó en el dominio de las técnicas estándar y especiales de Microscopia Electrónica aplicadas a la Biología. Además, por interesarme en el campo de la "ultraestructura de los cromosomas sexuales de los mamíferos" guiándome en la elaboración de esta investigación y por todas las facilidades que en su laboratorio me fueron dadas para poder realizar mi proyecto de investigación.

Al Dr. Roberto E. Mancini, profesor titular de la segunda cátedra de Histología, Citología y Embriología y director del "Centro de Investigaciones sobre Reproducción" de la Facultad de Medicina de Buenos Aires, por su orientación oportuna y todas las facilidades que su Centro me brindó para el aprendizaje e investigación.

Al Dr. Jorge Mora Urfí, profesor de Genética del Departamento de Biología de la Universidad de Costa Rica,

Director de esta investigación, un profundo agradecimiento por haberme interesado en el campo de la genética, y por la valiosa ayuda que me prestó con su estímulo y consejo oportuno durante la revisión y corrección del manuscrito.

Al profesor Misael Quesada Alpizar, Instructor de Genética, Departamento de Biología, Universidad de Costa Rica, por su ayuda en la preparación de las fotografías del presente trabajo.

A los distinguidos profesores del Departamento de Biología: Rafael L. Rodríguez C., Jorge Jiménez Jiménez, José Alberto Sáenz R., Luis Alberto Fournier O., por las sugerencias, revisión y corrección del manuscrito.

A la Fundación Ford y a la Oficina Sanitaria Panamericana, por la ayuda económica prestada para la realización de este trabajo, a través del "Curso Latinoamericano de Biología de la Reproducción".

Se les dan las gracias a todas aquellas personas que en una u otra forma colaboraron en la realización de esta tesis.

## CONTENIDO

	Página No.
INDICE DE FIGURAS.....	vii-viii-ix-x.
INTRODUCCION.....	1
REVISION DE LITERATURA.....	3
MATERIALES Y METODOS.....	15
Microscopia óptica y técnicas histoquímicas.....	15
Microscopia electrónica .....	16
Reconocimiento de los estados de la meiosis y diferentes tipos de espermatogonios.....	17
RESULTADOS.....	19
Espermatogonio A-0.....	19
Espermatogonio A-1.....	19
Espermatogonio A-2.....	24
Espermatogonio A-3.....	24
Espermatogonio A-4.....	32
Espermatogonio Intermedio .....	35
Espermatogonio B.....	35
Espermatócitos en Preleptonema.....	39
Espermatócitos en Leptonema.....	44
Espermatócitos en Zigonema.....	44
Espermatócitos en Paquinema.....	51
Espermatócitos en Diplonema.....	56
Espermatócitos en Metafase y Anafase .....	61
Cromosomas sexuales en Espermatócitos en Leptonema.....	61
Cromosomas sexuales en Espermatócitos en Zigonema.....	65

Cromosomas sexuales en Espermatóцитos en Paquinema.....	66
Cromosomas sexuales en Espermatóцитos en Diplonema y Diacinesis.....	77
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	79
Espermatogonios.....	79
Espermatóцитos.....	82
Ultraestructura y sinapsis del par X-Y en la rata.....	86
Significado de la presencia de un complejo sinaptonémico en el par X-Y de la rata.....	87
Relación del par X-Y con el nucléolo.....	89
RESUMEN.....	92
REFERENCIAS CITADAS.....	95

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página Nº
1	Espermatogonio A-0..... 20
2	Zona nucleolar del espermatogonio A-0 de la figura #1..... 20
3	Panorámica de una sección transversal de un tubo semi nífero en el estadio VII-VIII del ciclo..... 21
4	Espermatogonio A-0..... 22
5	Zona nucleolar del espermatogonio A-0 de la figura #4... 22
6	Panorámica de una sección transversal de un tubo semi nífero en estadio IX-X del ciclo..... 23
7	Espermatogonio A-1..... 25
8	Nucléolo del espermatogonio A-1 de la figura #7..... 25
9	Espermatogonio A-1..... 26
10	Nucléolo del espermatogonio A-1 de la figura #9..... 26
11	Panorámica de una sección transversal de un tu- bo seminífero en el estadio II-III del ciclo..... 27
12	Panorámica de una sección transversal de un tu- bo seminífero en el estadio II-III del ciclo..... 28
13	Espermatogonio A-2..... 29
14	Nucléolos del espermatogonio A-2 de la figura #13..... 30
15	Panorámica de una sección transversal de un tu- bo seminífero en el estadio X-XI del ciclo..... 31
16	Espermatogonio A-3..... 33
17	Nucléolo del espermatogonio A-3 de la figura #16..... 33
18	Espermatogonio A-4..... 34
19	Nucléolo del espermatogonio A-4 de la figura #18..... 34
20	Espermatogonio intermedio..... 36
21	Espermatogonio B..... 37

22	Panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio V del ciclo.....	38
23	Espermatócitos en preleptonema.....	40
24	Panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio VII del ciclo.....	41
25	Espermatócito en preleptonema.....	42
26	Panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio VIII del ciclo.....	43
27	Espermatócito en leptonema temprano.....	45
28	Espermatócito en leptonema tardío.....	46
29	Espermatócito en leptonema tardío.....	46
30	Panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio IX-X del ciclo.....	47
31	Espermatócitos en zigonema temprano.....	49
32	Espermatócito en zigonema tardío.....	50
33	Espermatócito en paquinema temprano.....	52
34	Complejo sinaptonémico y nódulo basal.....	52
35	Espermatócito en paquinema medio.....	53
36	Espermatócito en paquinema medio.....	54
37	Espermatócito en paquinema medio.....	55
38	Espermatócito en diplonema.....	57
39	Espermatócito en diplonema.....	58
40	Espermatócitos en diplonema.....	59
41	Nucléolo principal de un espermatócito en diplonema.....	60
42	Espermatócito en metafase.....	62

	Página Nº
43	Espermatócito en anafase inicial..... 63
44	Espermatócito en anafase avanzada..... 64
45	Espermatócito en paquinema..... 67
46	Espermatócito en paquinema..... 67
47	Espermatócitos en paquinema..... 67
48	Secciones seriadas a través del par X-Y, en un espermatócito en paquinema temprano..... 69
49	Secciones seriadas a través de la zona homóloga del par X-Y..... 70
50	Espermatócito en paquinema temprano..... 72
51	Espermatócito en paquinema temprano..... 73
52	Panorámica de una sección transversal de un tu- bo seminífero en estadio V del ciclo..... 75
53	Espermatócito en paquinema medio..... 76
54	Espermatócito en paquinema tardío..... 78

## INTRODUCCION

En buena medida la comprensión que se pueda obtener del mecanismo de los fenómenos relacionados con la herencia dependerá del conocimiento sobre el comportamiento de los cromosomas durante la división celular.

Por medio de la meiosis la continuidad genética queda asegurada. La distribución al azar de los cromosomas, junto con la ruptura de grupos de ligamiento producidos por el entrecruzamiento genético de cromosomas de origen paterno y materno, introduce variabilidad en la población. El significado biológico de la meiosis y de la reproducción sexual en general no es únicamente la formación de nuevos individuos con un número característico de cromosomas, sino que es un medio extraordinariamente efectivo de dotar a las generaciones que siguen, de nuevas combinaciones de genes que introducen variabilidad en la población, dando oportunidad para que la acción de la selección natural sea más efectiva.

Los estadios premeióticos y meióticos de la rata han sido estudiados en los últimos 70 años por varios investigadores a nivel de microscopía óptica, al igual que el comportamiento del par X-Y durante la profase I de la meiosis. Como las observaciones obtenidas no han sido corroboradas por la microscopía electrónica, la idea de la presente investiga -

ción es contribuir al conocimiento de la meiosis de la rata (Rattus norvegicus albus) haciendo una descripción de la ultraestructura de los espermatogonios y espermatócitos en este mamífero, para establecer mejor su morfología, así como dilucidar el comportamiento de los cromosomas sexuales X-Y, relacionado con la formación de complejos sinaptonémicos durante la profase I de la meiosis.

## REVISION DE LITERATURA

La meiosis en la rata ha sido estudiada por muchos investigadores a nivel de microscopia óptica en los últimos 60 años. Regaud (1909) hizo un estudio sobre la estructura de los tubos seminíferos y sobre la espermatogénesis de los mamíferos describiendo varios tipos de espermatogonios, espermatócitos y espermátidas de rata. Este autor hizo una descripción de la onda espermatogénica de la rata dándole un enfoque dinámico al arreglo de las asociaciones celulares a lo largo del tubo seminífero, descripciones que se basaron en las observaciones hechas en cortes de material incluido en parafina.

Allen (1918) describió tres grupos principales de células sobre la membrana basal de los tubos seminíferos de la rata albina: células de tipo A, células de tipo B y células de Sertoli. Las células de tipo A las describe como espermatogonios, los cuales por división dan las células de tipo B o espermatócitos. Este autor fue el primero en apuntar que los heterocromosomas formaban un único cuerpo de forma redondeada en los espermatócitos de la rata, cuerpo que había recibido diferentes nombres desde 1898 en que fue descrito por primera vez por Lenhossek (1898).

Minouchi (1928), en un trabajo sobre la espermatogéne-

sis de la rata albina, describe cuatro grupos de células sobre la membrana basal del tubo seminífero: Espermatogonios tempranos, espermatogonios tardíos, espermátidas y células de Sertoli. Los espermatogonios tempranos son descritos como los espermatogonios A de Allen (1918). En este trabajo establece como diploide el de 42 cromosomas para la rata albina difiriendo con Allen (1918), quien había informado como número diploide el de 37 cromosomas.

En cuanto al comportamiento de los autosomas durante la meiosis, Minouchi describe para la rata albina un apareamiento "lado con lado" para los homólogos a partir del estado de zigonema, contando 21 bivalentes en diferentes metafases. Con respecto a los heterocromosomas, indica que en la rata albina y otros animales los heterocromosomas (X-Y) están localizados en la periferia del núcleo, y que en el caso de la rata, el complejo heterocromosómico está compuesto por dos elementos, uno largo y curvo que es el cromosoma X y uno corto que es el cromosoma Y. Para este par de cromosomas describe un apareamiento "término-terminal". El cuerpo formado por los dos cromosomas sexuales lo llamó "heterokariosoma".

Koller y Darlington (1934) en un trabajo sobre las propiedades genéticas y mecánicas de los cromosomas sexuales de

la rata, aportan una serie de datos sobre los fenómenos de entrecruzamiento y quiasmas durante la meiosis, y hacen hincapié en el comportamiento de los cromosomas sexuales de la rata macho.

Con respecto a los autosomas, estos varían mucho en el grado de condensación en el estadio de paquiteno y en el diplonema están asociados por quiasmas que varían en número según la longitud de los cromosomas, tanto que en la anafase I, permanecen asociados mayor tiempo los cromosomas largos que los cortos.

Asimismo en los cromosomas sexuales estos autores describen un apareamiento del par X-Y a través de toda la longitud del cromosoma Y, indicando que existe un segmento de apareamiento y un segmento libre en el cromosoma X, formando quiasmas a ambos lados del centrómero el cual está incluido en la zona de apareamiento. Estas afirmaciones fueron refutadas por Ureña y Solari (1970) basados en observaciones hechas a nivel de microscopia electrónica. Posiblemente los autores confundieron un par de autosomas con el par sexual X-Y.

Tjio y Levan (1956) en un estudio sobre el comportamiento del par X-Y en la meiosis de la rata macho, hicieron

varias observaciones importantes sobre la evolución de los cromosomas sexuales como "vesícula sexual" durante la profase meiótica. Describieron los cromosomas sexuales como totalmente heteropicnóticos durante la meiosis e incluidos en una vesícula parecida a un nucléolo. Estos autores observaron un apareamiento de tipo término-terminal en el par sexual sin formación visible de quiasmas. Ohno, Kaplan y Kinoshita (1956, 1957a, 1957b, 1959) en una serie de trabajos sobre la morfología y comportamiento de los cromosomas durante la meiosis de la rata macho, hicieron un estudio de los autosomas en los diferentes estadios de la profase I, con base en la posición del centrómero y la longitud de los brazos. Los resultados obtenidos fueron comparados con las observaciones de los cromosomas de la rata macho en la profase espermatogonial. Estos autores demostraron que los pares de autosomas dos y siete son los organizadores de los nucléolos. El sitio de organización son las constricciones secundarias subterminales, que se caracterizan por la presencia de bloques de heterocromatina adicional. Regiones heterocromáticas fueron reconocidas en 20 pares de autosomas. Con respecto al comportamiento del par de cromosomas sexuales en los espermatocitos, los describieron como totalmente heteropicnóticos y embebidos en una vesícula rica en ARN y asociados al nucléolo y membrana nuclear.

En el estadio de paquiteno los cromosomas X-Y son positivamente heteropicnóticos, pero en diacinesis la vesícula desaparece y los cromosomas X-Y quedan asociados bajo la forma denominada término-terminal sin formación de guías - mas.

Eberle (1964) en un estudio comparativo de los cromosomas sexuales en diferentes especies durante la meiosis, describe una vesícula sexual típica en la rata y otras especies formada por el par X-Y durante la profase meiótica y señala a su vez que es rica en ARN. Para este investigador la heteropicnosis de los cromosomas sexuales y el apareamiento término-terminal durante la espermatogénesis confiere ventajas de supervivencia a la especie, al permitir la segregación de los cromosomas X-Y sin intercambiar material genético debido a que las posibilidades de apareamiento entre ellos son remotas.

Leblond y Clermont (1952) hicieron un estudio sobre los modos de asociación de los diferentes tipos de células del epitelio seminífero durante la espermatogénesis de la rata. Observaron que entre dos apariciones sucesivas de la misma asociación celular, se producían una serie de cambios en una área del epitelio seminífero.

Estos autores describieron 19 asociaciones celulares, tomando como variable principal el estado de desarrollo de la espermatida, la cual avanza a través de estados bien definidos que han dado base para hablar de un "ciclo del epitelio seminifero" dividido en 14 periodos.

En la descripción de los componentes del epitelio seminifero y con referencia a los espermatogonios estos autores indican que a partir de ellos por mitosis se originan los espermátocitos. Cada división mitótica de un espermatogonio origina un espermátocito y un nuevo espermatogonio. Las mitosis de los espermatogonios de tipo B en el estadio VI del ciclo dan origen a los espermátocitos jóvenes, los cuales por lo tanto son visibles en el estadio VII del ciclo.

La aparición de filamentos en el núcleo indica que estos han entrado al estadio de leptoteno (IX del ciclo). Los cromosomas se aparean en el estadio XIII del ciclo indicando el inicio del zigonema y luego a partir del estadio XIV, se inicia un largo paquinema que va hasta el estadio XII en que aparece el diplonema. En el XIII se llega a la diacinesis.

En el estadio XIV aparecen las metafases, que dan ori-

gen a espermátocitos secundarios que se dividen para dar origen a las espermátidas. La aparición de estas últimas marcan el inicio del estadio I del ciclo.

Roosen-Runge (1962) en un trabajo sobre el proceso de la espermatogénesis en mamíferos, con relación a la rata describe lo siguiente: Los espermátogonios son de tipo A, intermedios y de tipo B y ofrecen la misma apariencia general que en el ratón. Los de tipo A se transforman en intermedios y estos en espermátogonios de tipo B que tienen un núcleo redondo y considerablemente más pequeño que los de tipo A. La diferenciación de los espermátogonios se inicia con una serie de mitosis sincrónicas, produciéndose importantes cambios que preparan a las células para entrar en la meiosis. Las nuevas generaciones de células inician su diferenciación a intervalos definidos, lo que ha hecho posible analizarlas con gran detalle en secciones de tubos seminíferos.

En relación con los espermátocitos primarios, éstos aumentan de tamaño hasta un poco antes de la metafase I. Este aumento de volumen se produce después de la última división mitótica espermátogonial.

Los núcleos de los espermátocitos primarios sufren una

serie de cambios. El ARN, glicógeno, y la actividad enzimática aumentan significativamente durante la meiosis temprana.

Clermont (1967) en un trabajo sobre la diferenciación y evolución de las células sexuales masculinas y sobre la cinética de la espermatogénesis de los mamíferos, hace una descripción de las células que componen el epitelio seminífero, del ciclo del epitelio seminífero y de la onda espermatogénica. Con respecto al ciclo del epitelio seminífero, describe grupos de células que forman asociaciones de configuración constante. En la rata, una generación de espermatócitos preleptoténicos está asociada con una generación de espermatócitos en paquinema y dos generaciones de espermátidas, una en el estadio VII y otra en el estadio XIX. La constancia de las asociaciones celulares indica que las divisiones de los espermatogonios se llevan a cabo a intervalos rigurosamente constantes, formando así asociaciones celulares típicas. Cada una corresponde a un estadio del ciclo del epitelio seminífero, definiendo el ciclo como una serie completa de asociaciones celulares.

Con respecto a los espermatogonios, Clermont (1967) menciona los dos grupos principales de espermatogonios, (A y B), pero con la particularidad de que describe un espermatogonio

bajo el nombre de intermedio y menciona varios tipos de espermatogonios A. Las divisiones mitóticas de los espermatogonios originan los espermatócitos que entrarán en meiosis.

En relación con la manera de renovarse los espermatogonios en la rata, este autor ofrece un esquema basado en observaciones citológicas, topográficas y cuantitativas. Los espermatogonios A-0 son los de reserva y se observan desde el estadio I hasta el estadio XIV. Los espermatogonios A-1 se dividen en el estadio IX del ciclo dando origen a los espermatogonios A-2. Estos a su vez se dividen en el estadio XII originando los A-3 y éstos últimos, en el estadio XIV del ciclo, se dividen para formar los intermedios, que a su vez, por división originan los espermatogonios B y las divisiones de estas últimas células dan origen a los espermatócitos primarios.

Clermont y Bustos-Obregón (1968) re-examinaron la renovación de los espermatogonios en la rata, basados en observaciones a nivel de microscopía óptica en tubos seminíferos aislados y disecados. Los espermatogonios fueron estudiados a lo largo de dichos tubos y obtuvieron mejor información sobre su arreglo topográfico y morfología. Ellos describen cinco tipos de espermatogonios A (A-0,

A-1, A-2, A-3, A-4), además de los espermatogonios intermedios y los de tipo B.

Los espermatogonios A-0 se observan en todos los estadios del ciclo (I-XIV). Se caracterizan por tener un núcleo ovoide con un pequeño nucléolo y pequeños acúmulos de cromatina bien teñidos, distribuidos en una cromatina granular. Estos espermatogonios se encuentran en menor cantidad que los espermatogonios A-1. Por su poca actividad proliferativa se reconocen los espermatogonios A-0 como una célula de reserva. Es posible que bajo ciertas circunstancias se dividan y renueven la población celular. Este tipo de espermatogonio A-0 no muestra modificaciones morfológicas a lo largo de todo el ciclo.

Los espermatogonios A-1 se observan desde el estadio II hasta el VIII del ciclo del epitelio seminífero. El núcleo del espermatogonio A-1 se caracteriza por tener una forma redonda, su cromatina es granular fina, y se tinte ligeramente. Uno o más nucléolos hemisféricos se encuentran unidos a la membrana nuclear; estas células son más abundantes a las A-0. Los núcleos se dividen en el estadio IX, para producir los espermatogonios A-2. Estos se observan del estadio X al XII. Tienen un núcleo grande, ovoide que contiene masas globulares de cromatina profundamente teñidas;

estas masas se encuentran libres dentro del núcleo o unidas a la membrana nuclear. El resto de la cromatina es finamente granular y se tiñe muy poco. En el estadio XII del ciclo, los espermatogonios A-2 se dividen para originar los A-3 que se observan en el estadio XIII.

Los espermatogonios A-3 tienen las mismas características nucleares que los A-2. La cromatina es fina y granular, se tiñe poco, también poseen masas globulares de cromatina profundamente teñidas. Estos espermatogonios A-3 se dividen en el estadio XIV-I, para producir los espermatogonios A-4.

Los espermatogonios A-4 poseen un núcleo mediano y lobulado, con granulaciones de cromatina que se tiñen profundamente. Se dividen en el estadio I y originan dos tipos de espermatogonios llamados intermedios y espermatogonios A-1. Lo más característico del espermatogonio A-4 es una constricción de la membrana nuclear que le da al núcleo una apariencia lobulada.

Los espermatogonios intermedios son originados por los A-4 en el estadio I del ciclo y se observan del estadio I al IV. Estos espermatogonios se caracterizan por tener un núcleo ovoide con grupos densos de cromatina, muchos de

ellos unidos a la membrana nuclear o bien libres en el interior. En el estadio IV del ciclo, los espermatogonios intermedios se dividen para originar los espermatogonios de tipo B.

Los espermatogonios B están presentes en los estadios V-VI del ciclo, se caracterizan por tener un núcleo esférico con grandes acúmulos de cromatina unidos a la membrana nuclear y en el interior del núcleo. Los espermatogonios B se dividen en el estadio VI del ciclo y producen los preleptonemas, también llamados "en reposo".

Ureña y Solari (1970) hicieron un estudio sobre la ultraestructura e histoquímica del par X-Y de la rata durante la profase I de la meiosis. Demostraron la evidencia de una sinapsis parcial entre los cromosomas sexuales de este mamífero.

## MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se emplearon ratas albinas adultas (Rattus norvegicus albus).

### Microscopia óptica y métodos histoquímicos.

Se utilizó el método de extendido y secado al aire de células, descrito por Solari (1964) para las observaciones morfológicas e histoquímicas de espermatogonios y espermátocitos aislados, y que consiste en la disociación de pequeñas piezas de testículo colocadas en una solución salina fría (isotónica) por repetidas aspiraciones con una jeringa de 1 ml. sin aguja. La suspensión se centrifuga a 800 g por 3 minutos y el precipitado se fija con Carnoy 3:1 (etanol-ácido acético) durante 20 minutos. Se hace una segunda centrifugación para resuspender el precipitado en fijador fresco; se toman unas gotas que se extienden sobre un portaobjetos y se secan rápidamente con aire caliente.

Para las observaciones histoquímicas sobre el contenido de ácidos nucleicos del par X-Y, se usaron dos técnicas de tinción: a) la técnica de "Verde Metil-Pironina" (Pearse, 1960); b) la técnica de Basofilia (Amano, 1962) con azul de Toluidina a pH 4.4.

Secciones de tejido de 0.94  $\mu$  de espesor embebidas en maraglas, fueron cortadas con el micrótono "Porter-Blum",

colocadas en portaobjetos y teñidas con azul policromo. Estas preparaciones fueron utilizadas para observaciones ópticas y para el control de las secciones usadas en el microscopio electrónico.

#### Microscopia electrónica.

Pequeñas piezas de testículo se cortaron cuidadosamente con una navajilla. Luego fueron fijadas en glutaraldehído al 2,5% en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M y pH 6.9 por dos horas en un refrigerador. Después de lavado en solución amortiguadora de fosfatos por 24 horas se hace una segunda fijación con fijador de Palade durante una hora. Las piezas se embebieron en maraglas y se cortaron en secciones de color plateado (500 Å) para la observación detallada con microscopia electrónica.

Para la reconstrucción tridimensional del par X-Y (paquinema temprano) se tomaron microfotografías de secciones seriadas de 0,32  $\mu$  de espesor a una magnificación fija montadas sobre una grilla de un agujero (1x2 mm. LKB Produkter) de acuerdo con la técnica de S'jöstrand (1967). Las microfotografías fueron copiadas con tinta china en láminas de celuloide 0,5 mm de espesor. Las láminas se colocaron de tal manera que la separación entre ellas correspondiera

al espesor de la sección de acuerdo a la magnificación de la fotografía. El modelo que resultó de la superposición de las láminas fue fotografiado con la copiadora Reprovit II (E. Leitz, Wetzlar) con película Panatomic X.

Las secciones fueron teñidas con acetato de uranilo (saturado en metanol) y luego con citrato de plomo.

Las extracciones de ARN de los tejidos fijados en gluteraldehído se hicieron con ácido perclórico durante 42 horas a 4°C, de acuerdo a la técnica de Solari y Tres (1967), y luego se tiñeron las secciones con acetato de uranilo (saturado en agua). Las secciones se examinaron con los microscopios electrónicos Siemens Elmiskop I y Zeiss EM-9A.

#### Reconocimiento de los estadios de la meiosis y de los diferentes tipos de espermatogonios.

El reconocimiento de los estadios de la meiosis se hizo según el método usado por Solari (1969). Cada sección transversal de un tubo seminífero (0,95  $\mu$ ) de espesor fue examinado con microscopio óptico, para determinar el estado de la espermatogénesis de acuerdo a la descripción sobre las asociaciones celulares en las distintas fases del ciclo del epitelio seminífero de la rata, hecho por Leblond y Clermont (1952) y Clermont y Perey (1957).

Los núcleos preleptoténicos fueron localizados en los estadios VI y VII del ciclo y los leptoténicos en los estadios VII y IX. Los núcleos en zigonema temprano, en los estadios X y XI; en zigonema medio, en los estadios VIII y IX.

Los núcleos en diplonema fueron localizados en los estadios XIII y XIV; las metafases de la primera y segunda división se localizaron en los estadios XIV y I respectivamente del ciclo del epitelio seminífero.

Para la localización de los distintos tipos de espermatogonios se hizo uso de la descripción hecha por Clermont y Bustos-Obregón (1968) sobre los distintos tipos de espermatogonios de la rata. Haciendo uso del esquema sobre el modo de proliferación y renovación de los espermatogonios de los mismos autores, se les localizó de la siguiente manera: los espermatogonios A-0, desde el estadio I al XIV del ciclo. Los A-1 del estadio I al IX. Los A-2 del X al XII. Los A-3 del XII al XIV. Los A-4 en los estadios XIV y I. Los espermatogonios intermedios, en los estadios I al II y los espermatogonios B, del estadio IV al VI.

## RESULTADOS

### ESPERMATOGONIOS A-0 (estadios I al XIV del ciclo)

Los espermatogonios A-0 se caracterizan porque tienen un núcleo alargado, unas veces de forma ovoide pero en otros casos con una curvatura en el lado que da a la membrana del tubo seminífero. (Fig. 1-3-4). La parte fibrilar de la cromatina es muy homogénea y distribuidas en todo el núcleo se observan condensaciones granulares de cromatina con diámetros que varían entre 400 A° y 2000 A°.

Un nucléolo pequeño se observa unido a la membrana nuclear. (fig. 1-2). En la primera mitad del ciclo del epitelio seminífero (estadios I al VIII) la morfología nuclear de los espermatogonios A-0 es muy similar, pero en la segunda mitad del ciclo aumentan un poco de diámetro y la forma es más ovoide (fig.4-5-6). En todos los estadios del ciclo los espermatogonios A-0 se observaron aislados. El núcleo en general es más oscuro que el de los espermatogonios A-2.

### ESPERMATOGONIOS A-1 (estadios II al VIII del ciclo)

Los espermatogonios A-1 se caracterizan por tener un núcleo en forma redonda con una cromatina muy homogénea. Algunos espermatogonios A-1 presentan un núcleo ligeramente ovoide. (fig. 7-9-11-12)

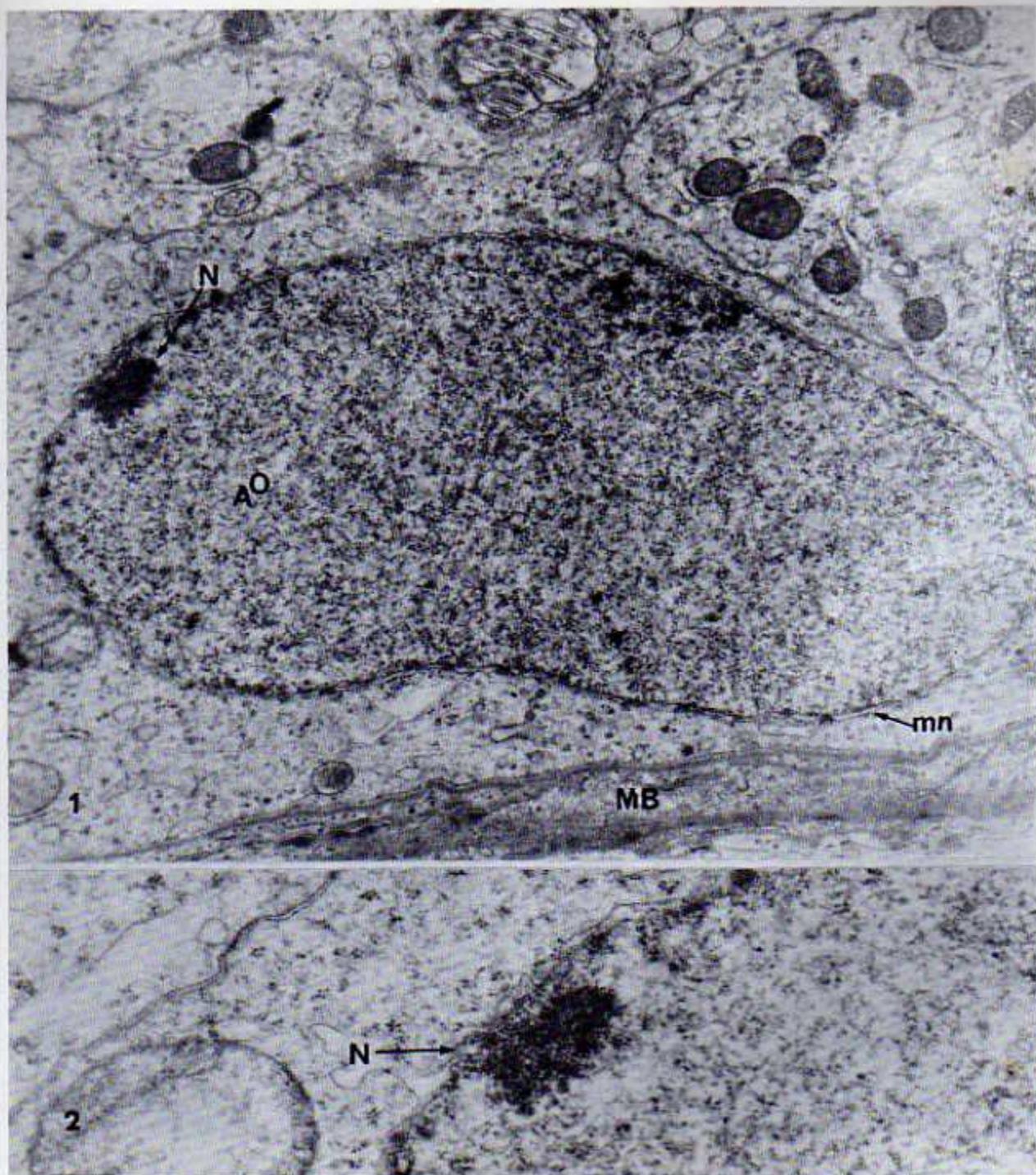


Figura 1. Espermatogonio de tipo A°, fotografiado en una sección de un tubo seminífero en el estadio VIII, del ciclo. MB, membrana basal; mn, membrana nuclear; N, nucléolo. X 21.000.

Figura 2. Micrografía de la zona nucleolar del espermatogonio A° de la figura 1. N, nucléolo. X 36.000.

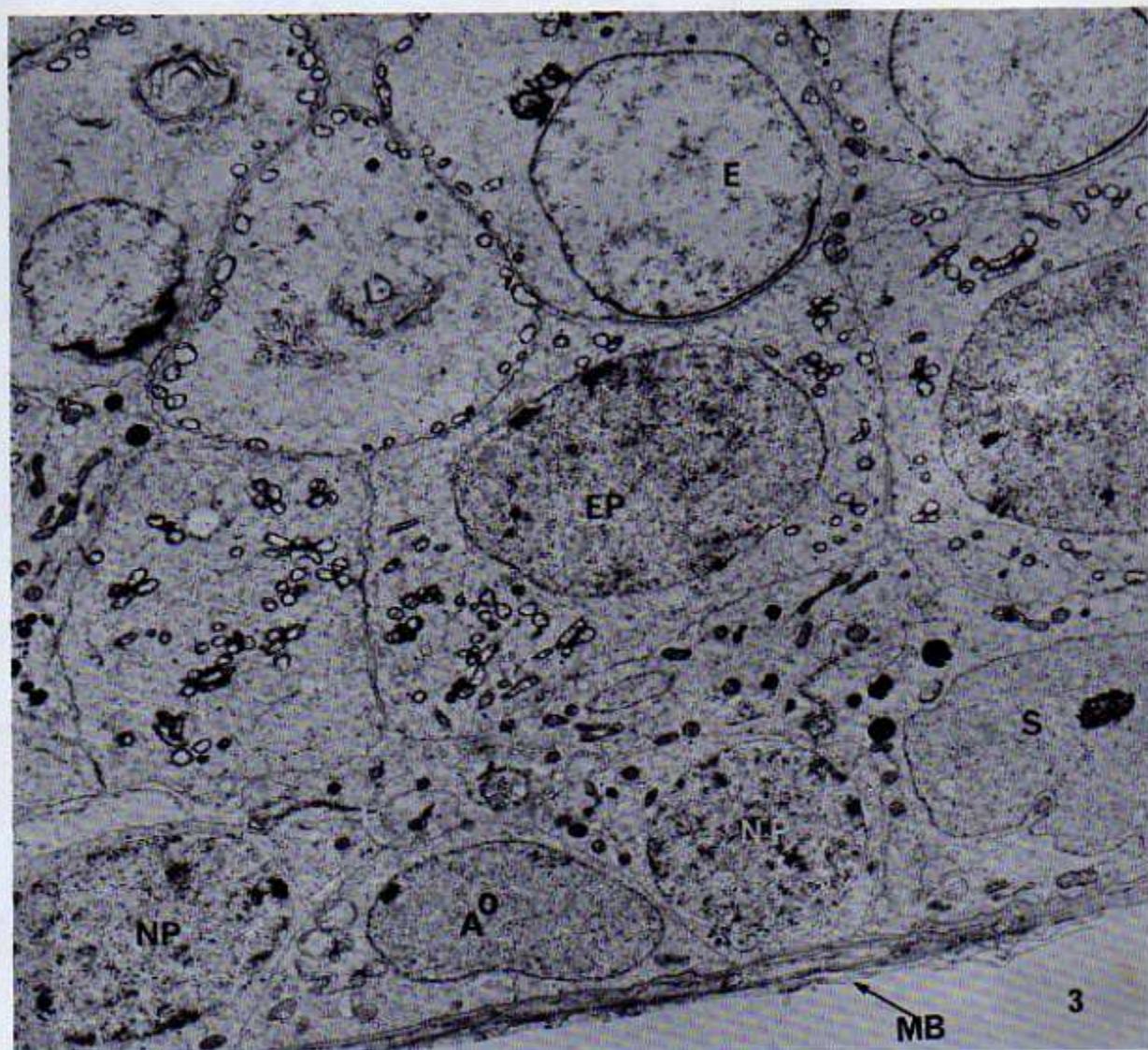
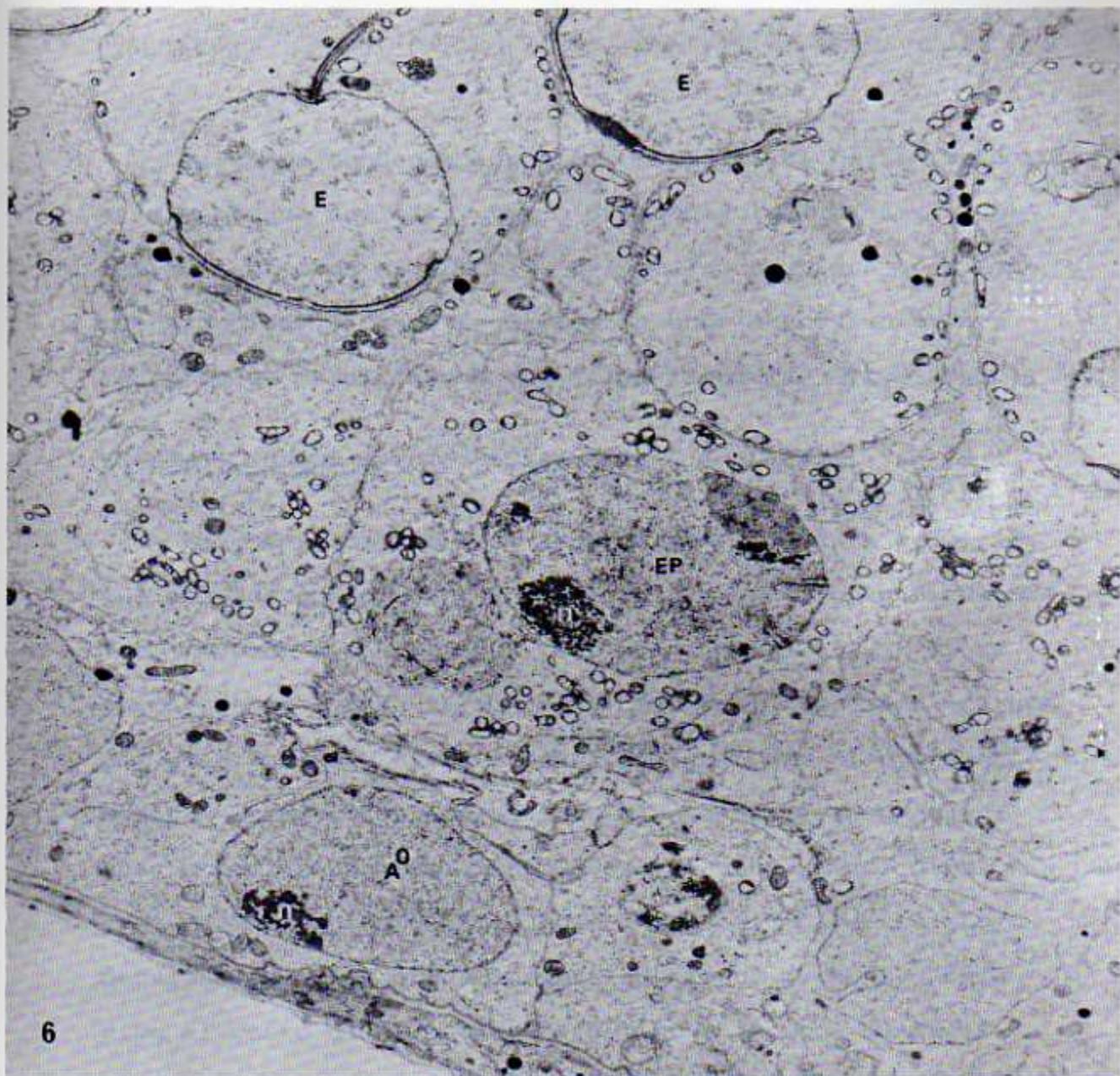


Figura 3. Micrografía electrónica panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio VII-VIII del ciclo. MB, membrana basal; NP, núcleos preleptoténicos; A<sup>0</sup>, espermátogonío A-0; S, célula de Sertoli; EP, espermátocitos en paquinema media; E, espermátida en el estadio VII-VIII. X 5200.



6

forma muy irregular distribuida en el interior del núcleo. Algunas veces, uno de ellos se encuentra en contacto con la membrana nuclear. (fig. 13-14 a, b, c)

ESPERMATOCITOS (estadios III-IV del ciclo)

Figura 6. Micrografía electrónica panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en estadio IX-X del ciclo. A°, espermatogonio A-O; EP, espermatócito en paquinema tardío; E, espermátida en estadio IX-X; n, nucléolo. X 5200.

Pequeñas condensaciones de cromatina se hallan unidas a la membrana nuclear. Uno o dos nucléolos grandes se observan libres en el interior del núcleo o unidos a la membrana nuclear. Estos nucléolos en unos casos son esféricos pero en otros tienen una forma irregular (figs. 8-10).

#### ESPERMATOGONIOS A-2 (estadios IX-XII del ciclo)

De todos los tipos de espermatogonios de la rata, los A-2 son los que poseen el núcleo más grande; éste tiene una forma ovoide o más o menos redonda (fig. 13-15). El espermatogonio A-2 se caracteriza por tener una cromatina con muy poca densidad electrónica. Al igual que el espermatogonio A-0, distribuidas en todo el núcleo se encuentran unas granulaciones de cromatina muy densas, cuyos diámetros varían entre 200 A° y 1000 A° aproximadamente. La densidad de estas granulaciones contrasta mucho con relación al resto de la cromatina debido a la poca densidad electrónica de ésta última. Se observan tres nucléolos de forma muy irregular distribuidos en el interior del núcleo. Algunas veces, uno de ellos se encuentra en contacto con la membrana nuclear. (fig. 13-14 a,b,c)

#### ESPERMATOGONIOS A-3 (estadios XIII-XIV del ciclo)

Los espermatogonios A-3 se caracterizan porque tienen

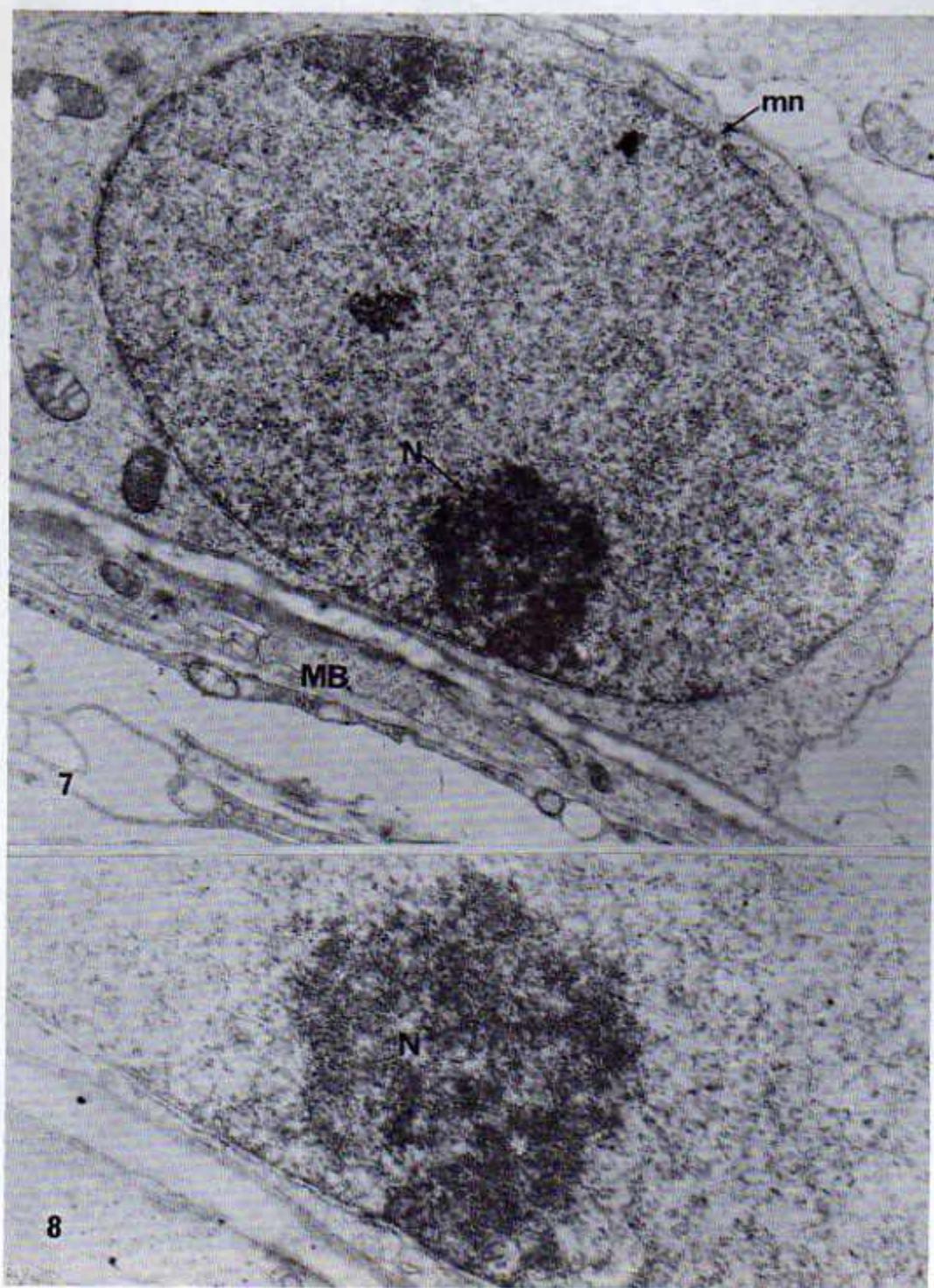


Figura 7. Espermatogonio de tipo A-1 fotografiado en un corte transversal de un tubo seminífero en el estadio II-III del ciclo. MB, membrana basal; N, nucléolo; mn, membrana nuclear, X. 19.000

Figura 8. Micrografía electrónica a mayor magnificación del nucléolo del espermatogonio A-1 de la figura 7. N, nucléolo. X 32.000.



Figura 9. Micrografía electrónica de un espermatogonio A-1, fotografiado en un corte transversal de un tubo seminífero en el estadio II-III del ciclo. MB, membrana basal; mn, membrana nuclear; N, nucleólo. X 22.400

Figura 10. Nucleólo del espermatogonio A-1 de la figura 9 a mayor aumento. N, nucleólo. X. 36.000.

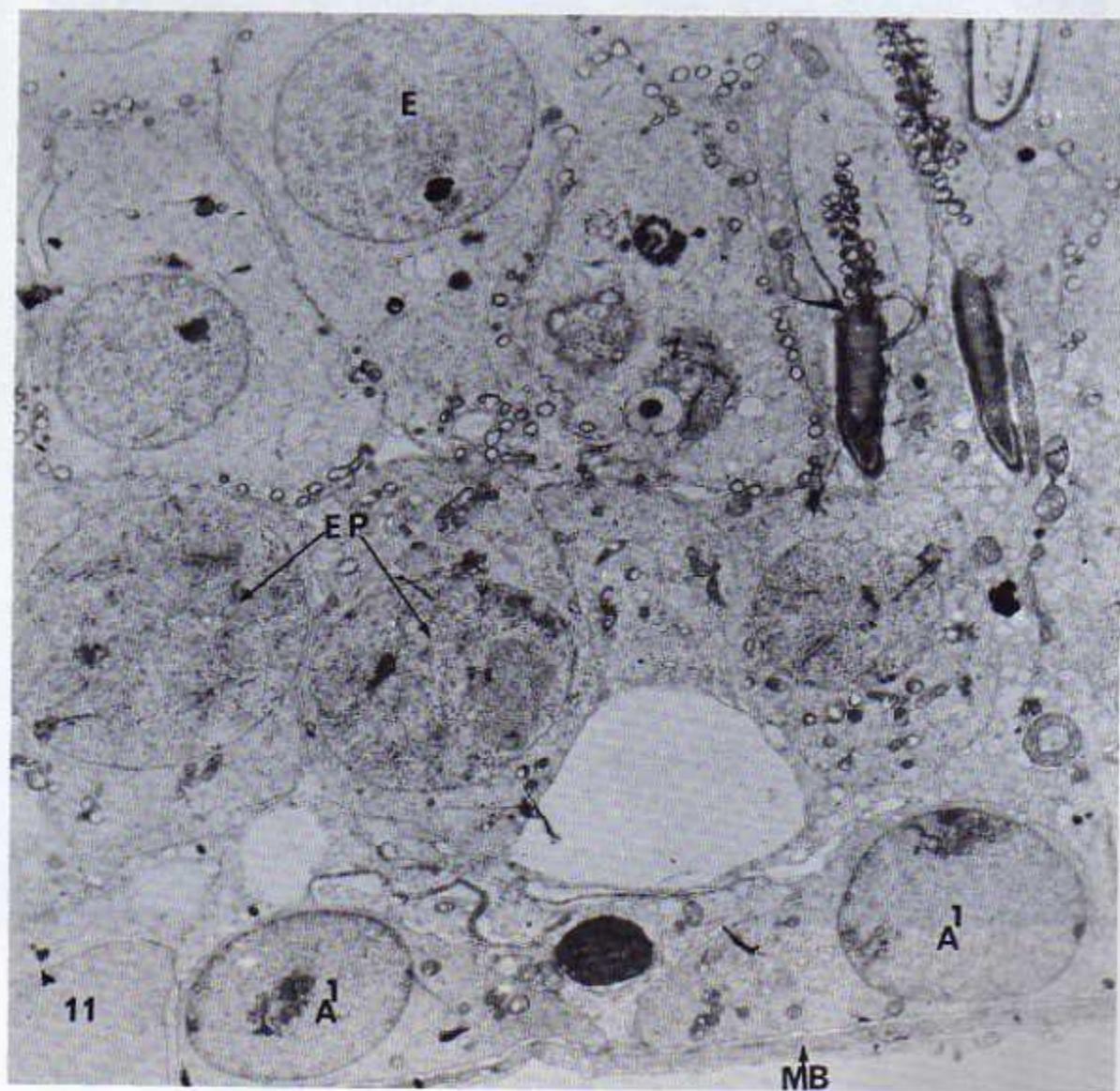


Figura 11. Micrografía electrónica panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio II-III del ciclo. MB, membrana basal; A<sup>1</sup>, espermatogonios A-1; EP, espermatócitos en paquinema temprano; E, espermátida temprana (estadios II-III del ciclo) X. 5200.

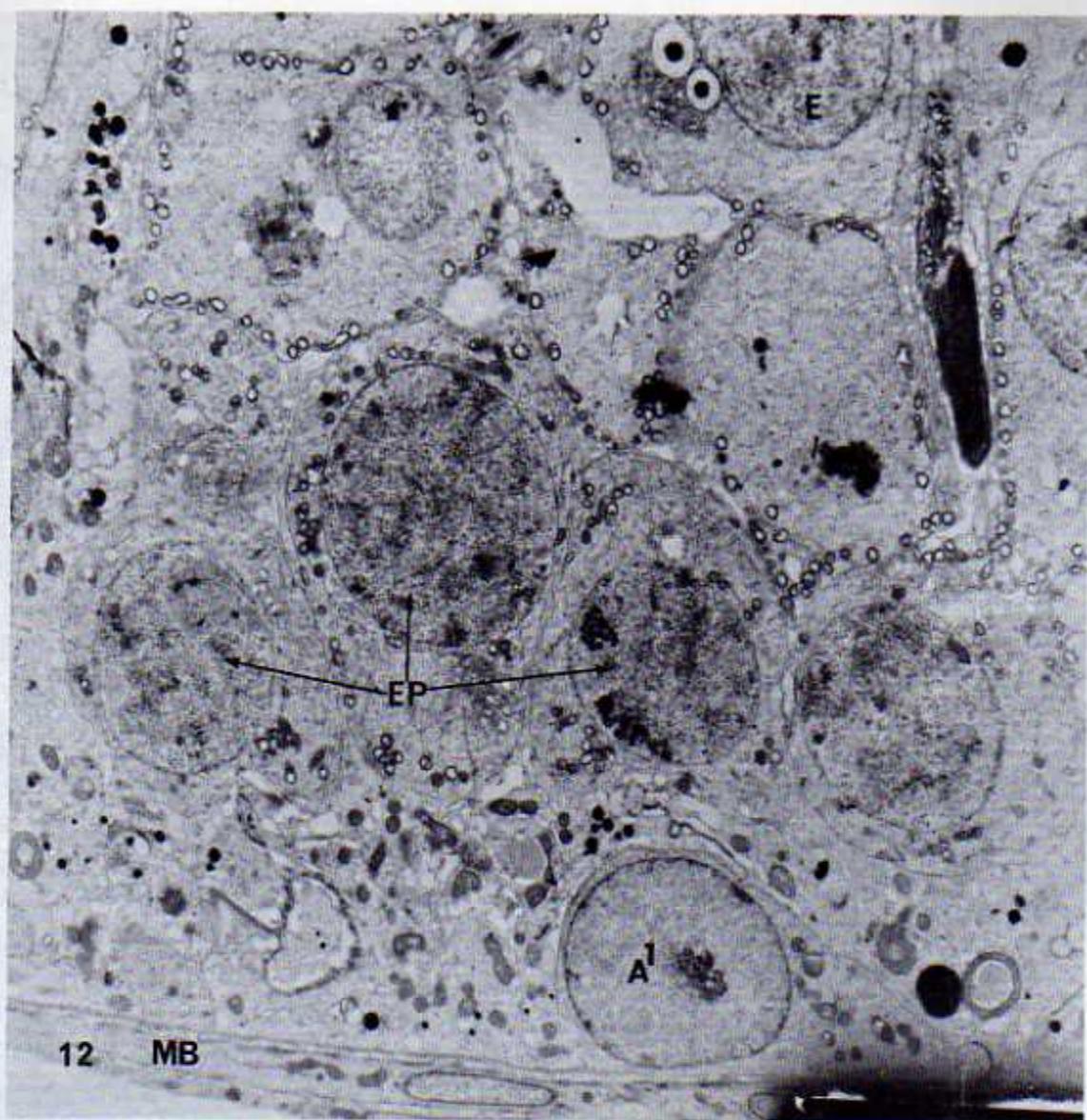


Figura 12. Micrograffas electrónica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estado II-III del ciclo. MB, membrana basal; A<sup>1</sup>, espermatogonio A-1; EP, espermatócitos en paquinema; E, espermátida en estado II de la espermiogénesis. X. 5200.

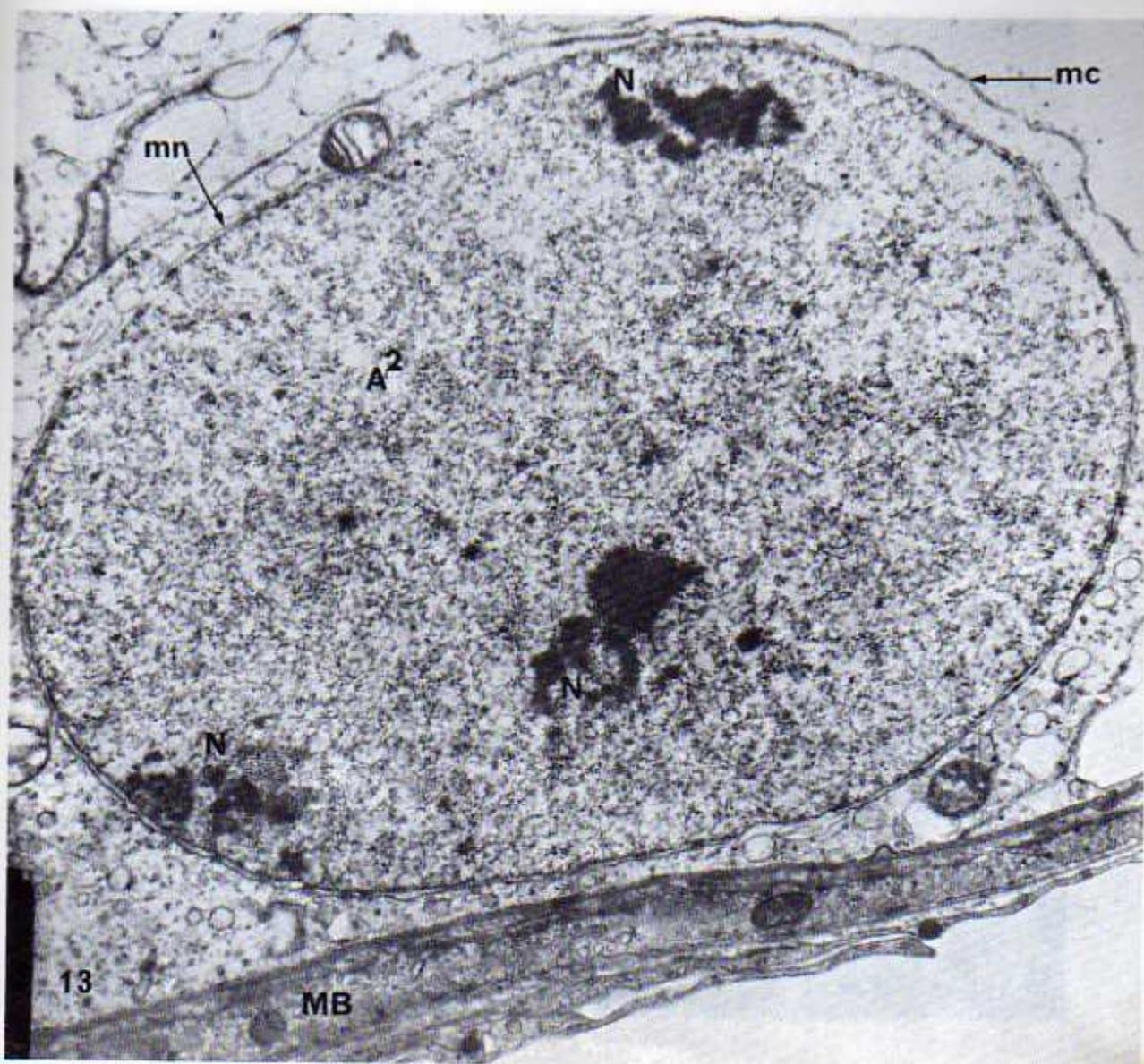
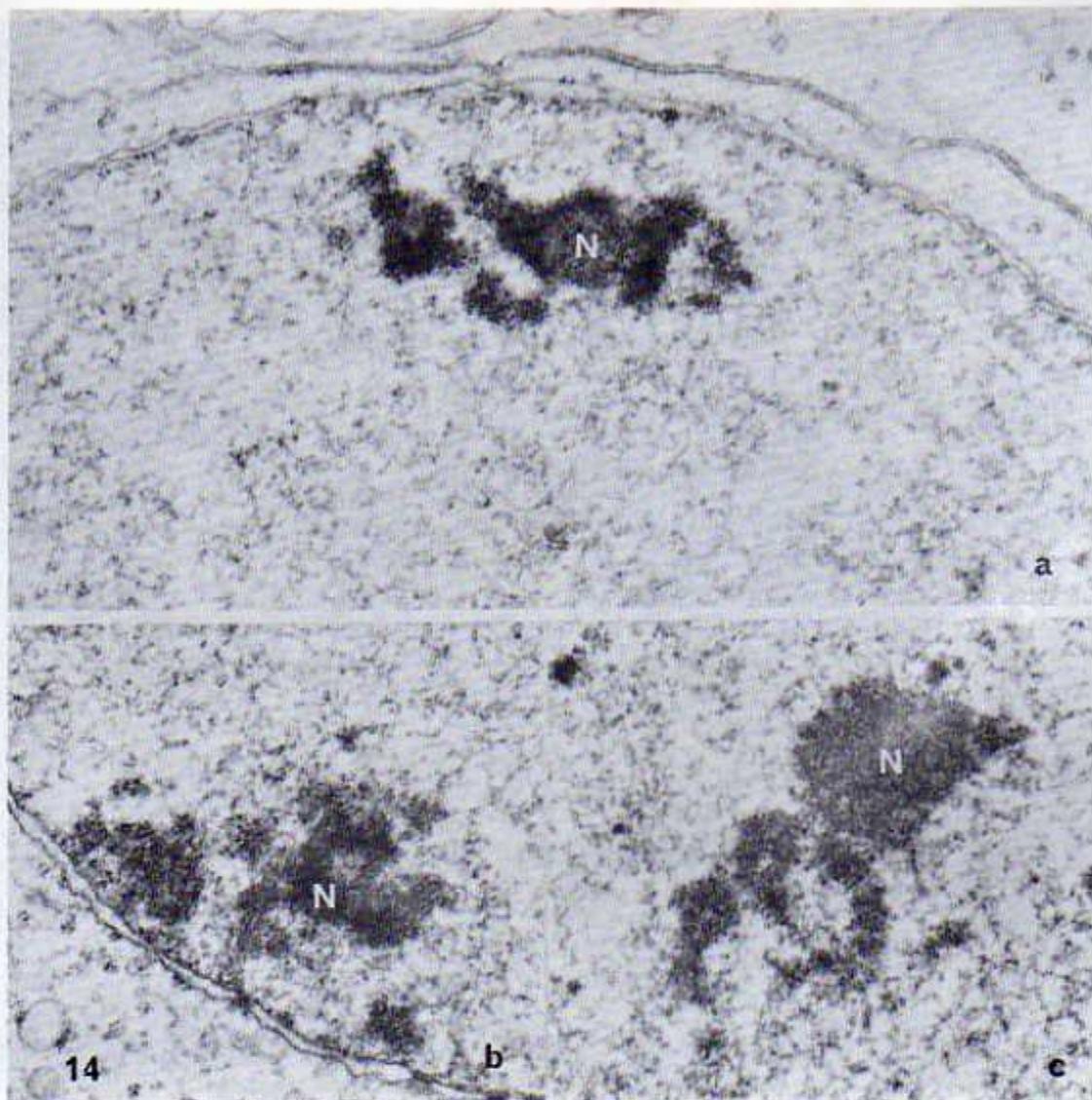
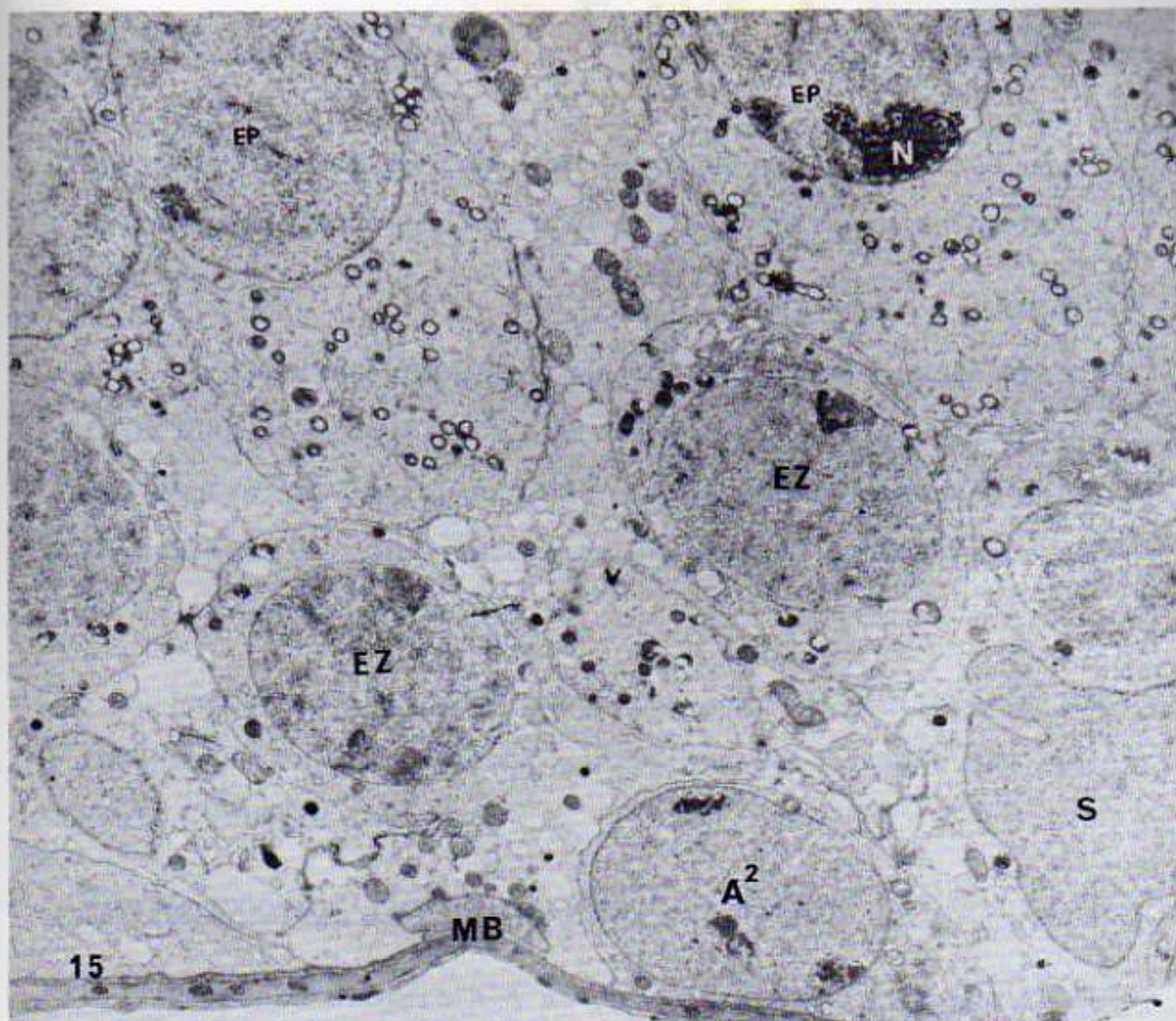


Figura 13. Micrografía electrónica de un espermatogonio de tipo A-2, MB, membrana basal; mc, membrana citoplasmática, N, nucléolos; mn, membrana nuclear. X 20.000.



Figuras 14 abc. Micrograffas a mayor aumento, de los nucléolos del espermatogonio A-2 de la figura 13. N, nucléolos. X. 36.000.

membrana basal; A<sup>+</sup>, espermatogonio A-1, espermatogonio en etapa temprana; B, célula de Sertoli; EP, espermatocitos en pro-fase I. X 5200.



que el núcleo presenta una cara plana en el lado adyacente a la célula que se apoya a la pared del tubo seminífero. Otras características que permiten diferenciarlos del núcleo del espermatogonio A-2 es la presencia de los nucleólos grandes de forma alargada que se observan en el lado adyacente al núcleo.

Las granulaciones de cromatina se encuentran en mucha menor cantidad que las que se observan en los espermatogonios.

Figura 15. Micrografía electrónica panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio X-XI del ciclo. MB, membrana basal; A<sup>2</sup>, espermatogonio A-2, espermatócitos en zigo nema; S, célula de Sertoli; EP, espermatócitos en paquinema tardío. X 5200.

un núcleo grande de forma ovoide y de mayor densidad electrónica que la de los núcleos de los espermatogonios A-0, A-1 y A-2.

Se observan granulaciones de cromatina muy densas distribuidas en todo el núcleo; éstas son de mayor diámetro y más densas que las observadas en los espermatogonios A-2. Un nucléolo de forma irregular se observa generalmente cerca de la membrana nuclear.

Las características nucleares son muy similares a las observadas en los espermatogonios A-4 del estadio XIV del ciclo (fig.16-17).

#### ESPERMATOGONIOS A-4 (estadio XIV del ciclo)

El espermatogonio A-4 se caracteriza principalmente porque el núcleo presenta una cara plana en el lado en donde la célula se apoya a la pared del tubo seminífero. Otra característica que permite diferenciarlo del núcleo del espermatogonio A-3 es la presencia de un nucléolo grande de forma alargada que se observa en el interior del núcleo.

Las granulaciones de cromatina se encuentran en mucho menos cantidad que las que se observan en los espermatogonios A-3 (fig. 18-19).

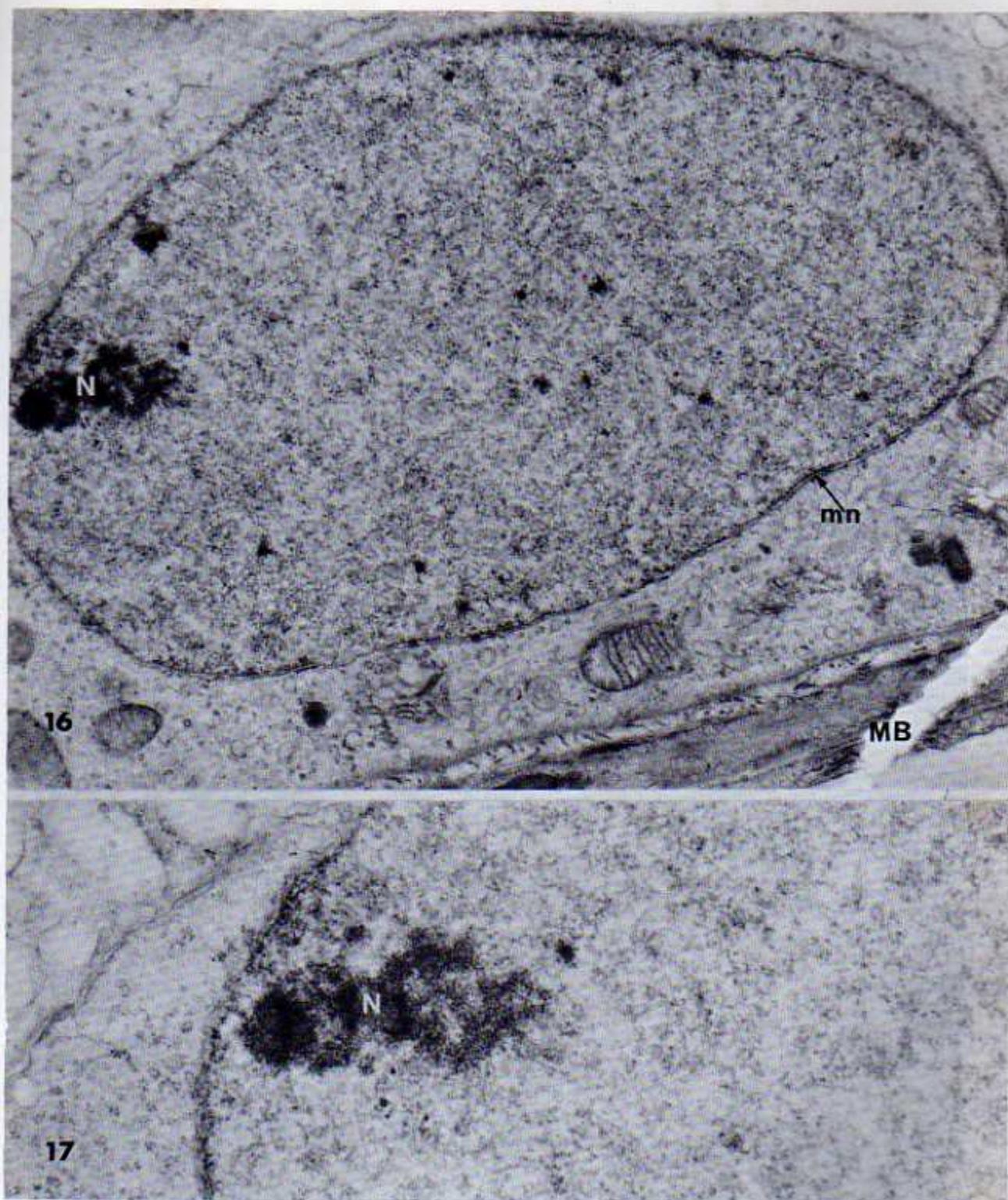


Figura 16. Micrografía electrónica de un espermatogonio de tipo A-3, fotografiado en una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio XIII del ciclo. MB, membrana basal; mn, membrana basal; mn, membrana nuclear; N, nucléolo. X 21.000.

Figura 17. Micrografía electrónica del nucléolo del espermatogonio A-3 de la figura 16. N, nucléolo, X 32.000.

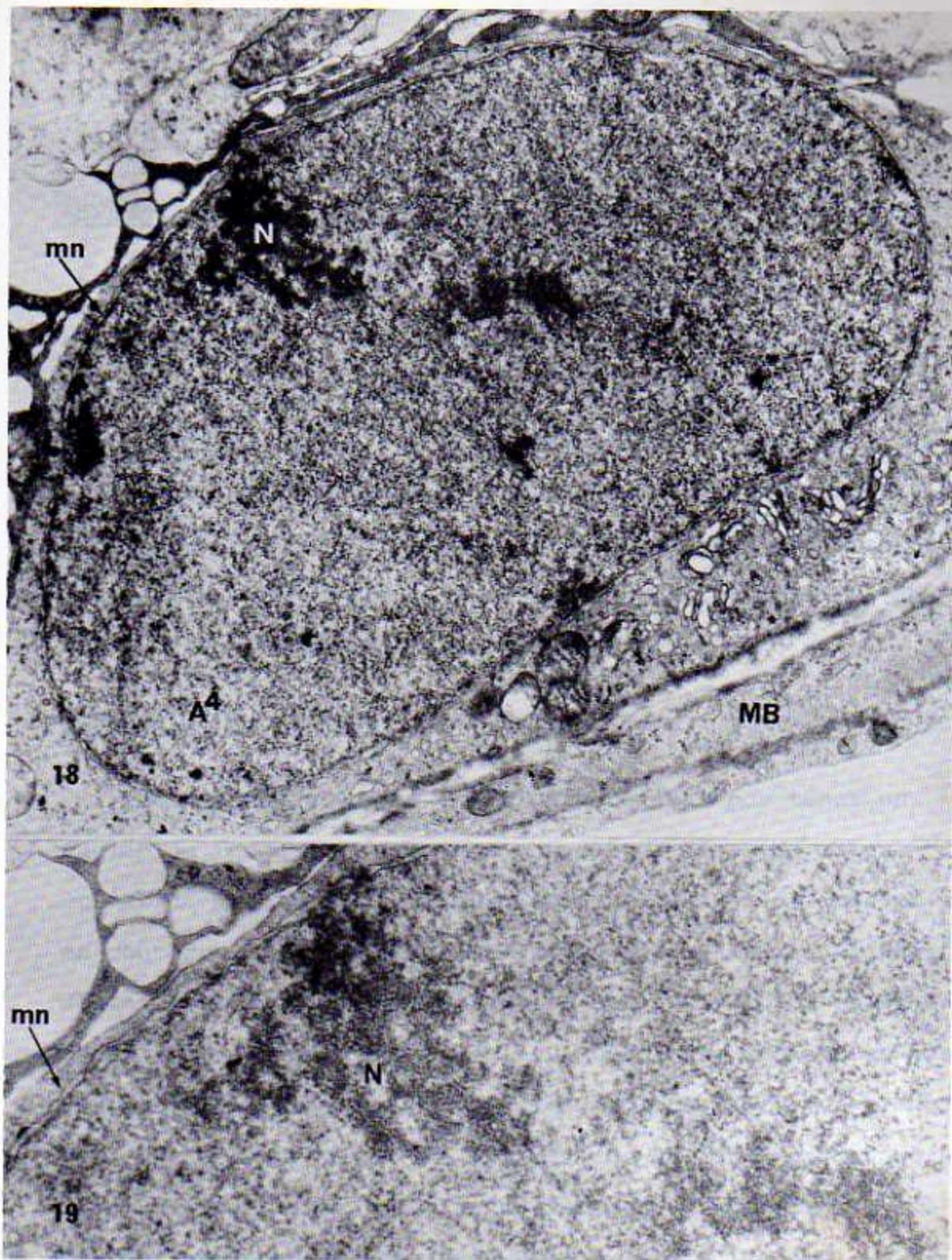


Figura 18. Espermatogonio de tipo A-4, fotografiado en un corte transversal de un tubo seminífero en el estadio XIV del ciclo, MB, membrana basal; mn, membrana nuclear; N, nucleólo. X 19.000

Figura 19. Micrografía electrónica de la zona nucleolar del espermatogonio A-4 de la figura 18. N, nucleólo; mn, membrana nuclear. X 32.000.

### ESPERMATOGONIOS INTERMEDIOS (estadios II al IV del ciclo)

Los espermatogonios intermedios se caracterizan por tener un núcleo de forma ovalada de un tamaño similar al del espermatogonio de tipo A-O. La característica morfológica más sobresaliente de los espermatogonios intermedios es la de que sus núcleos poseen zonas de cromatina muy densas distribuidas alrededor del núcleo y en contacto con la membrana nuclear. Uno o dos nucléolos de forma irregular se observan cerca de la membrana nuclear (fig. 20).

### ESPERMATOGONIO B (estadios V-VI del ciclo)

Los espermatogonios B, se caracterizan por tener un núcleo de forma esférica, con abundantes masas de heterocromatina distribuidas uniformemente alrededor del núcleo y en contacto con la membrana nuclear (fig. 21-22). Algunas de las masas de heterocromatina se observan libres en el interior del núcleo. En general su morfología nuclear es bastante similar a la que ofrecen los núcleos preleptoténicos, pero la heterocromatina de los núcleos de los espermatogonios B es más densa y más irregular que la que ofrecen los núcleos preleptoténicos (fig. 21).

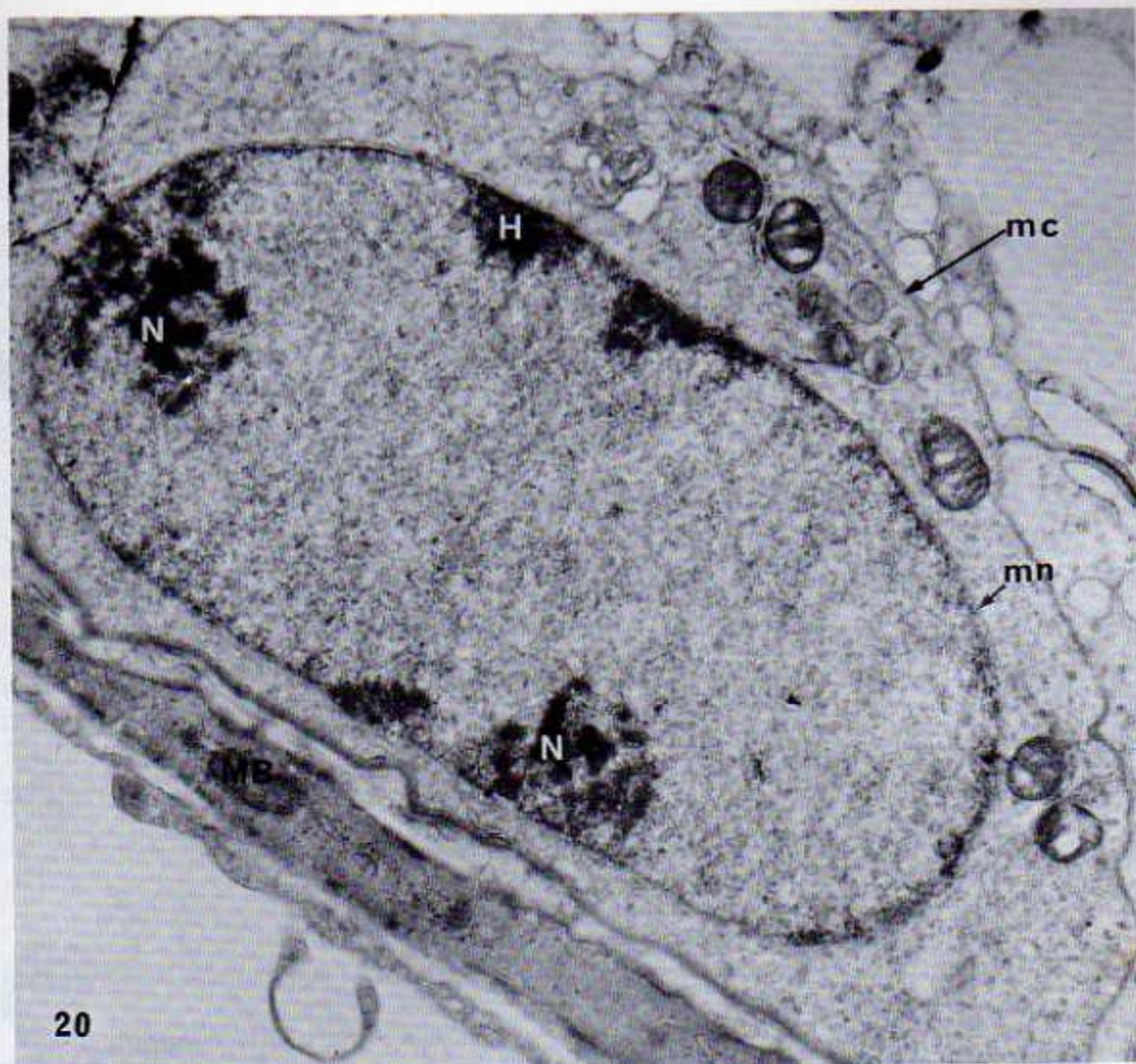


Figura 20. Micrografía electrónica de un espermatogonio de tipo intermedio, fotografiado en un corte transversal de un tubo-seminífero en el estadio II-III del ciclo. MB, membrana basal; N, nucleólo; H, heterocromatina; mn, membrana nuclear; mc, - membrana citoplasmática. X. 21.000.

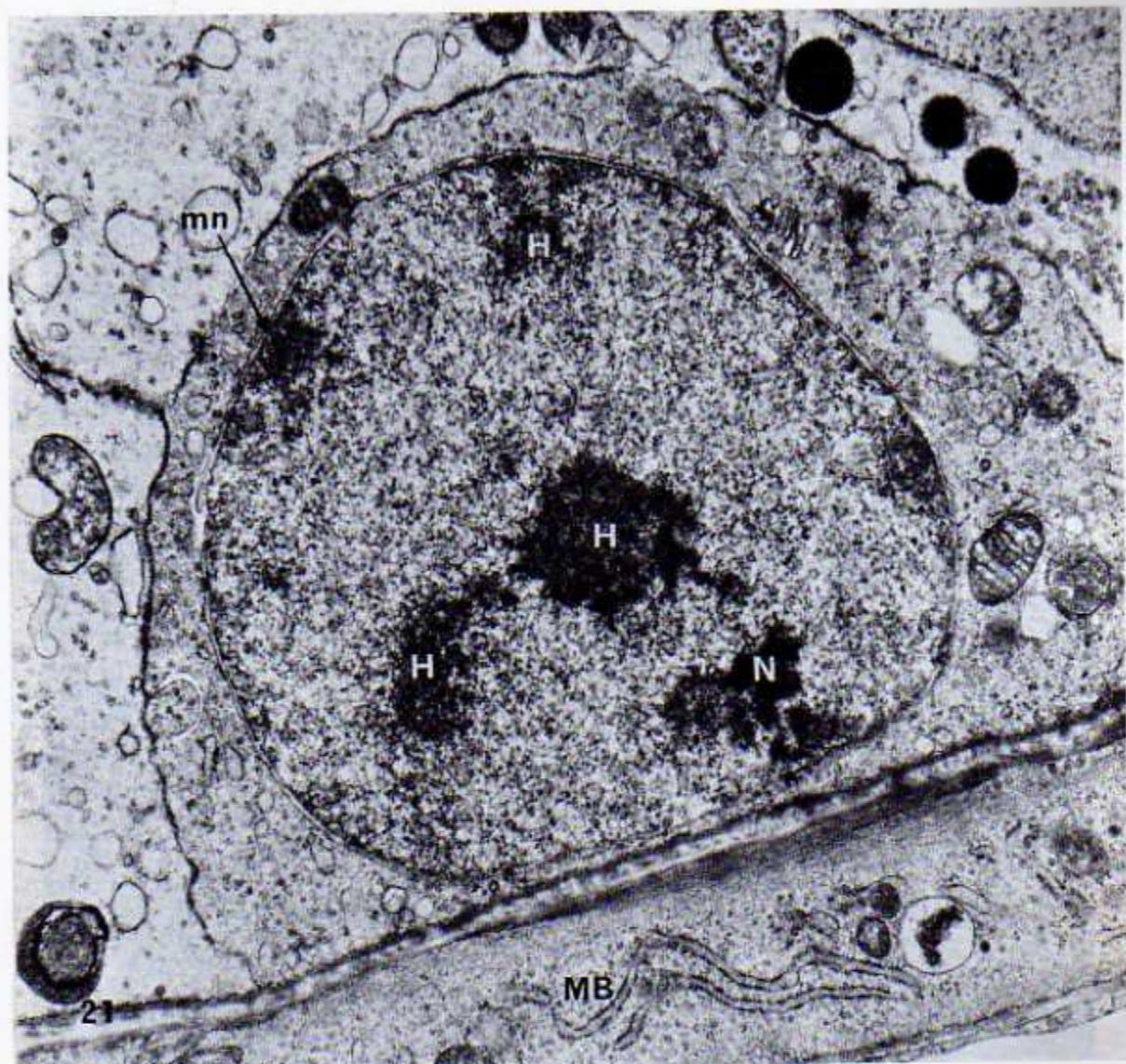
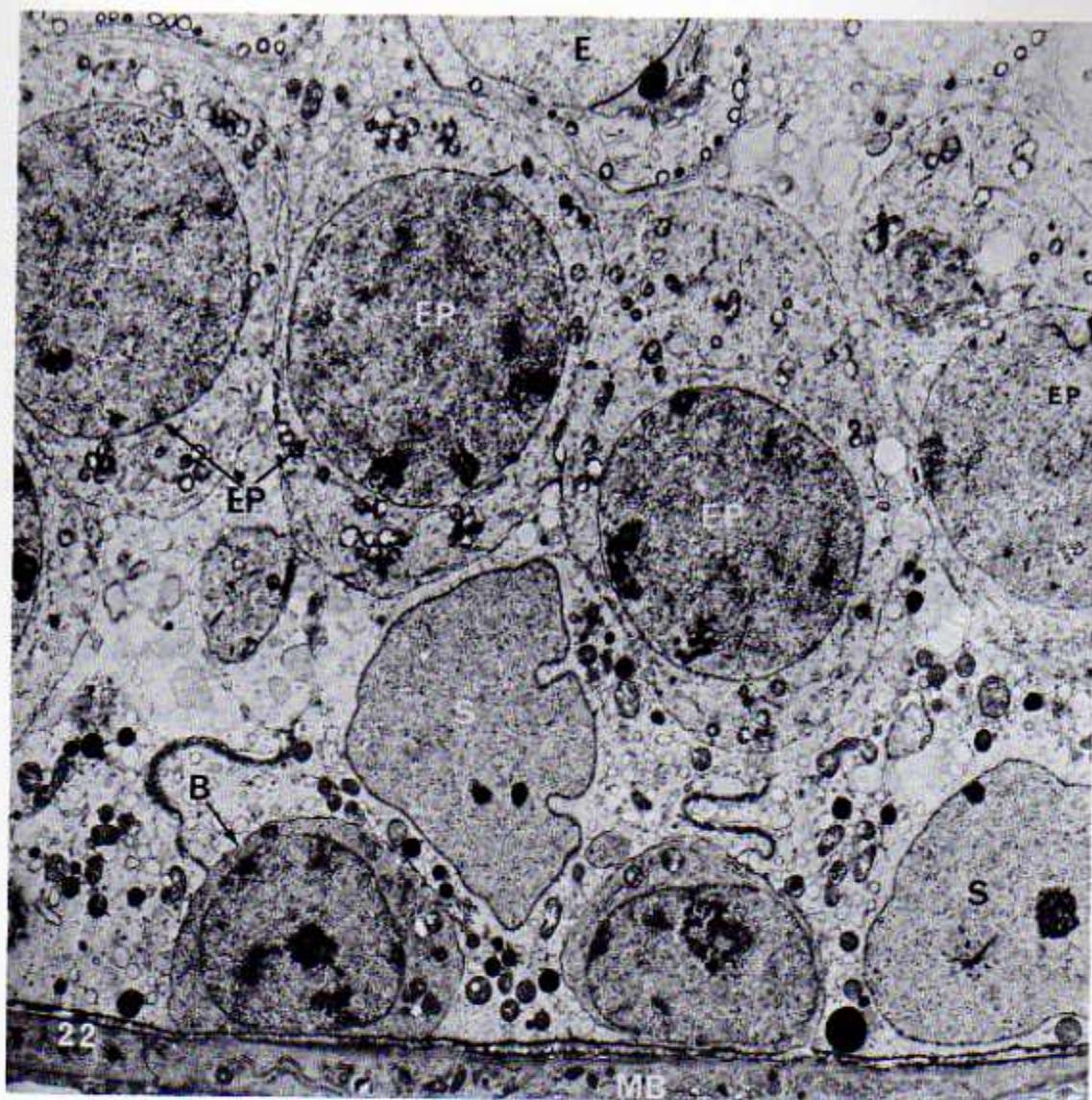


Figura 21. Espermatogonio de tipo B, fotografiado en una sección de un tubo seminífero en el estadio V del ciclo. MB, membrana basal; N, nucléolo; H, heterocromatina; mn, membrana nuclear. X 21.000.



zonas de heterocromatina de los núcleos primarios...  
 con la membrana basal...  
 y el núcleo...  
 organización...  
 muy corto...  
 clase y ya en el estado VII-VIII...  
 otros espermáticos...

Figura 22. Micrografía electrónica panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio V del ciclo. MB, membrana basal; B, espermatogonio B; S, célula de Sertoli; EP, espermátocitos en paquinema medio; E, espermátida en estadio V de la espermiogénesis. X 5200.

### ESPERMATOCITOS EN PRELEPTONEMA

Las divisiones mitóticas de los espermatogonios de tipo B producidos en el estadio V-VI del ciclo, dan origen a los espermatócitos preleptoténicos (espermatócito muy temprano aun en el estado metabólico o de reposo). Los núcleos de los espermatócitos preleptoténicos se caracterizan por ser redondos, con densas masas de cromatina (heterocromatina) localizadas principalmente en contacto con la membrana nuclear aunque algunas se encuentran en el interior (fig. 23-24). El resto de la cromatina del núcleo del espermatócito es homogénea. Los espermatócitos preleptoténicos del estadio VI-VII, se hallan apoyados sobre la membrana basal del tubo seminífero (fig. 23). Los núcleos de estas células pueden ser fácilmente confundidos con los núcleos de los espermatogonios de tipo B; pero las densas masas de heterocromatina de los núcleos preleptoténicos, son de menor densidad electrónica, más homogéneas y en mayor número y tamaño que las de los espermatogonios B. Los espermatócitos preleptoténicos tienen un período de vida muy corto. Rápidamente sufren cambios en su morfología nuclear y ya en el estadio VII-VIII del ciclo, los núcleos de estos espermatócitos son de mayor tamaño, muy redondos y muchos de ellos se han separado de la membrana basal (fig. 25-26) y están sostenidos por proyecciones citoplasmáticas de

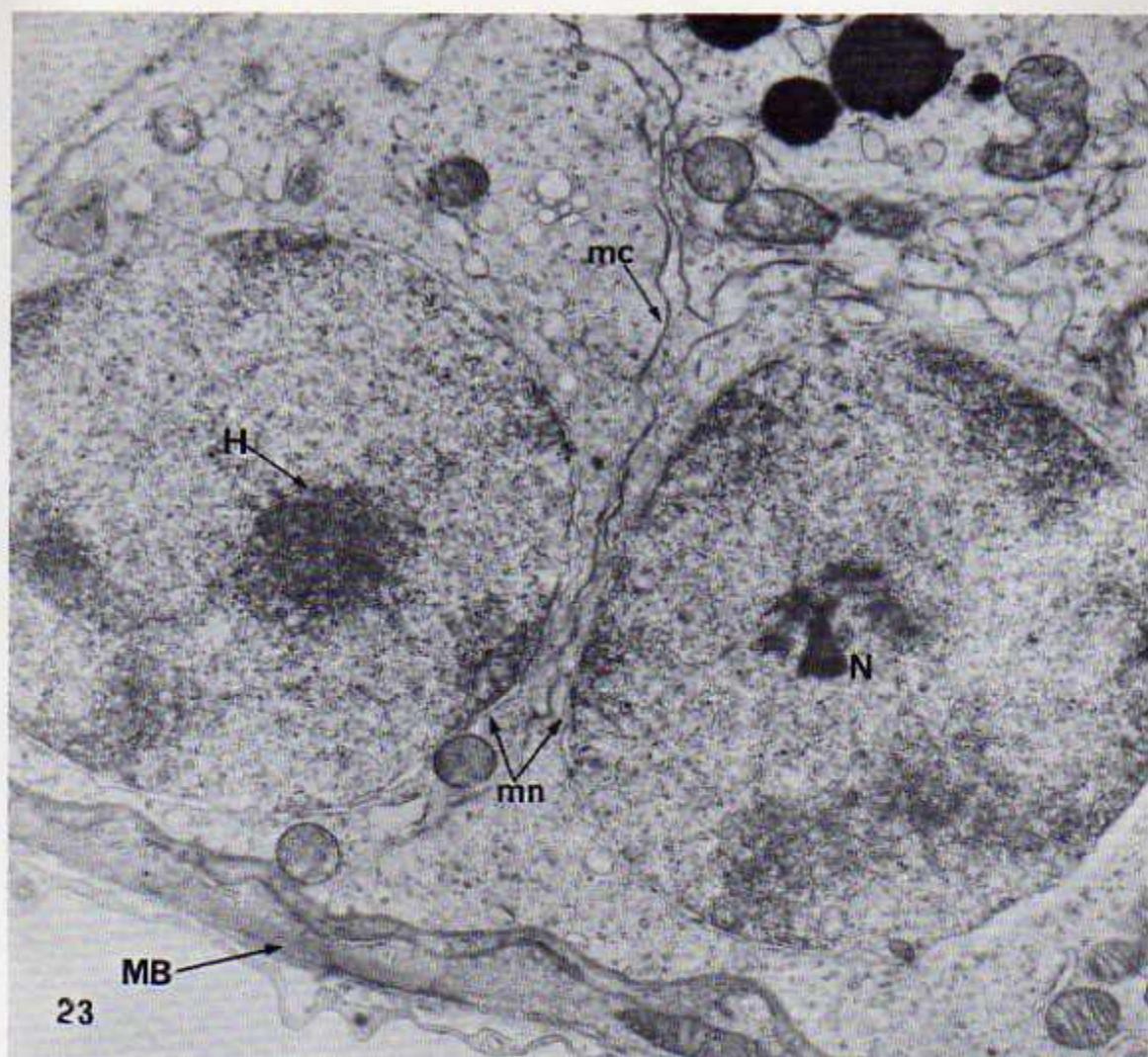


Figura 23. Micrografía electrónica de dos células en preleptonema, fotografiadas en una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio VI-VII del ciclo. MB, membrana basal; mn, membranas nucleares; H, heterocromatina; mc, membrana citoplasmática. X 21.000.

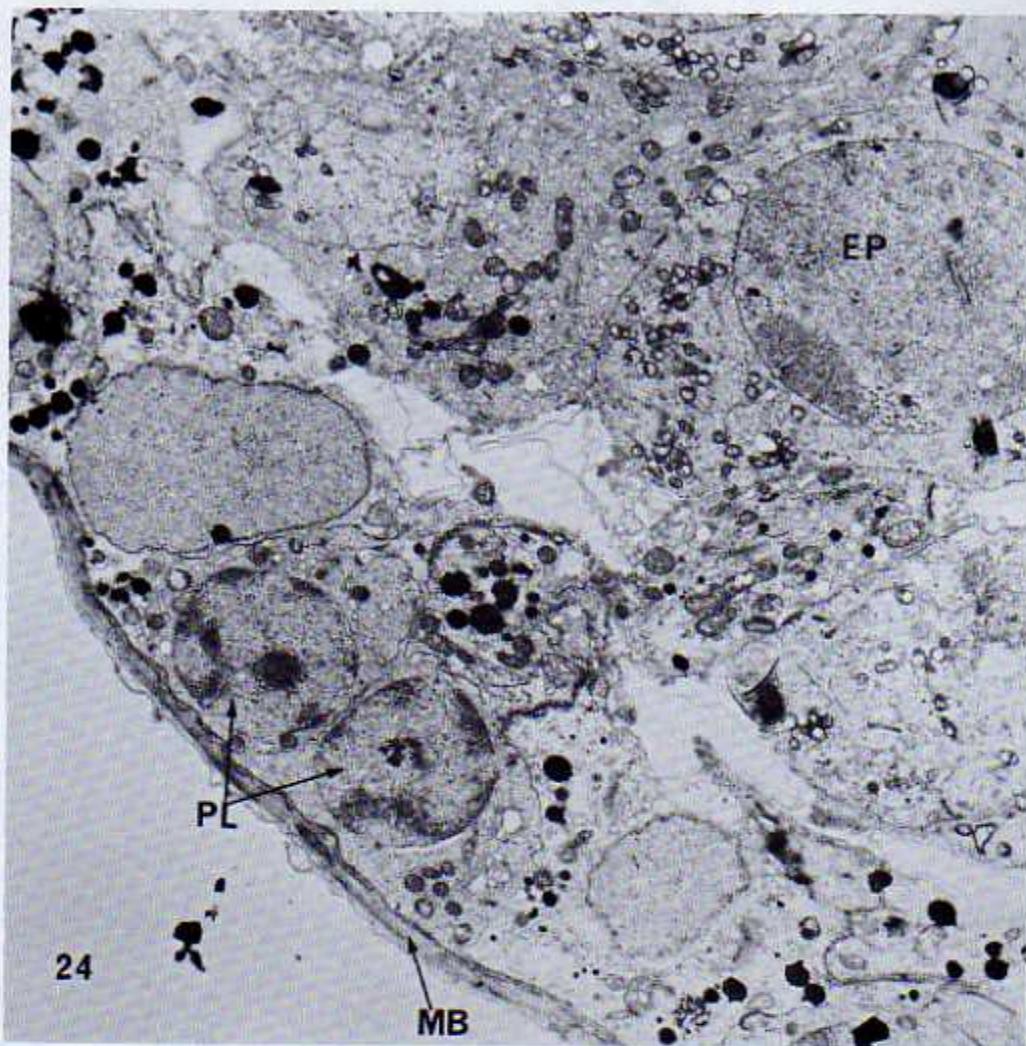


Figura 24. Micrografía electrónica de una sección de un tubo seminífero en el estadio VII del ciclo. MB, membrana basal; PL, espermátocitos en preleptonema; EP, espermátocitos en paquina media. X 5200.

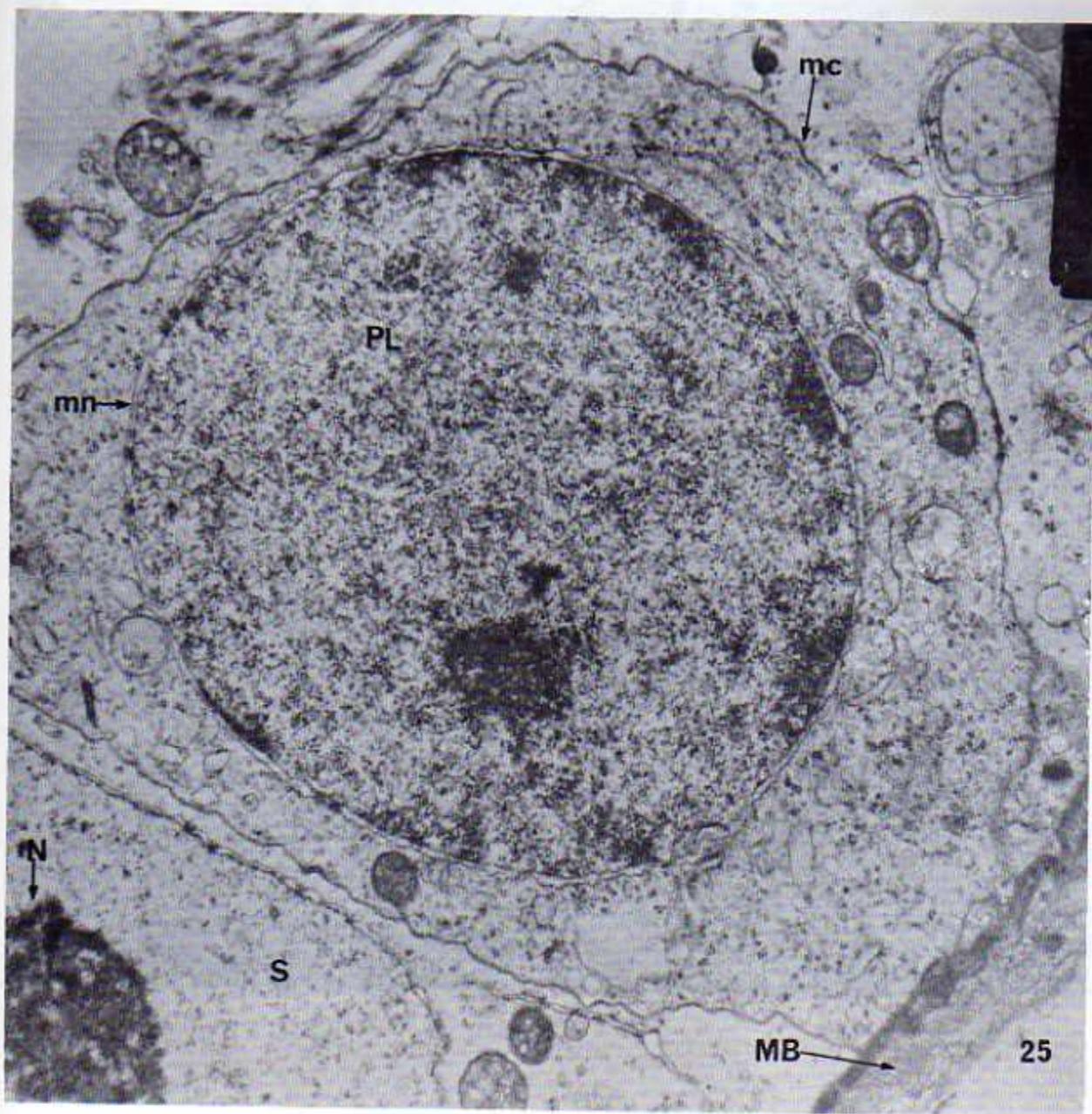


Figura 25. Micrografía electrónica de una célula en preleptonema, fotografiada en una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio VII-VIII del ciclo. MB, membrana basal; S, célula de Sertoli; mn, membrana nuclear; mc, membrana citoplasmática X 21.000.

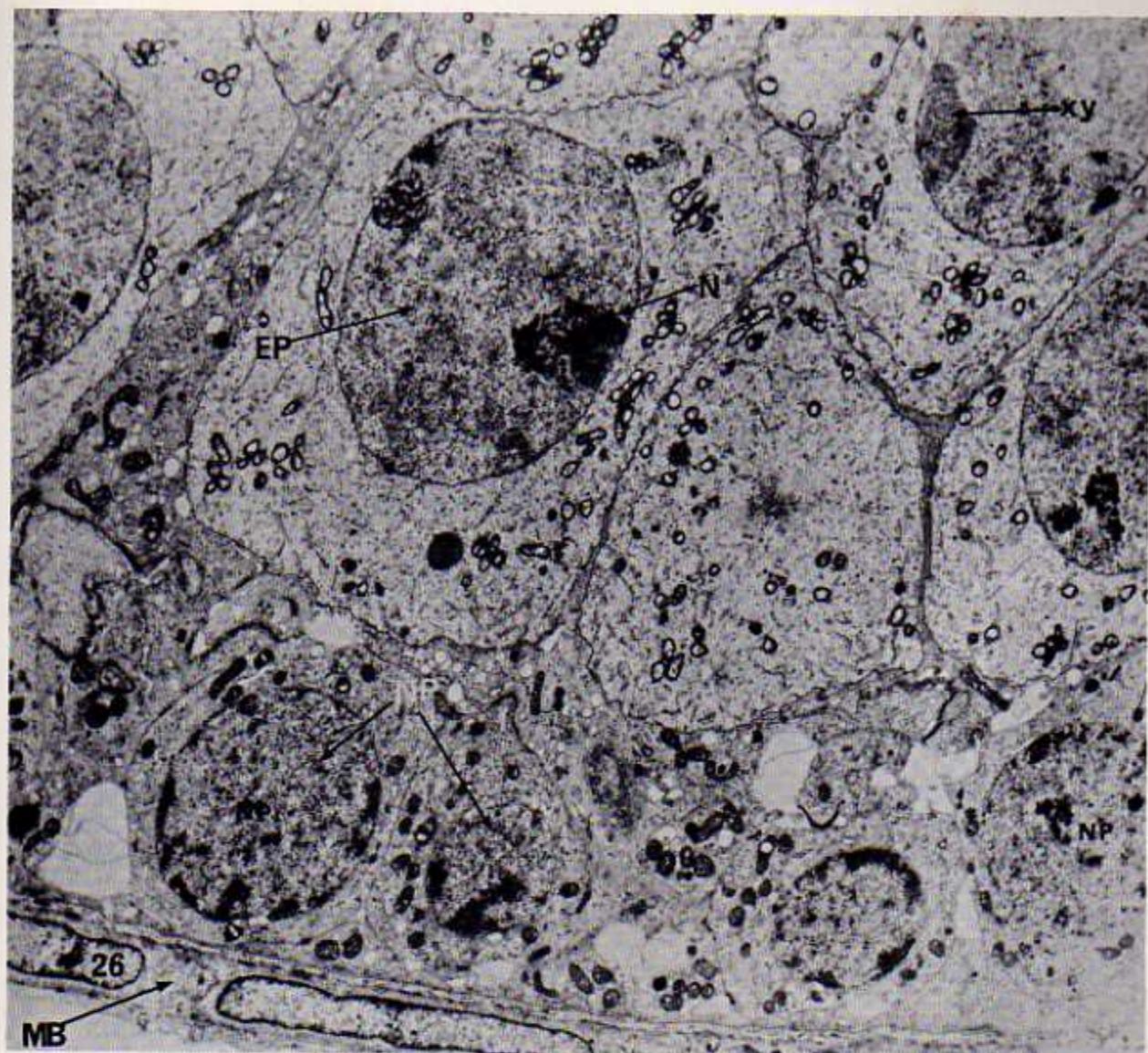


Figura 26. Micrografía electrónica de una sección de un tubo seminífero en el estadio VIII del ciclo. MB, membrana basal; NP, núcleos en preleptonema; EP, espermátocitos en paquinema medio; N, nucléolo; X-Y, cromosomas sexuales. X 5200.

las células de Sertoli. Las masas densas de heterocromatina han disminuido mucho de tamaño, pero siempre se encuentran localizadas en contacto con la membrana nuclear; el resto de la cromatina es ahora más densa y homogénea (fig. 25). Así en el estadio que sigue (IX del ciclo) se han transformado en característicos núcleos en leptonema.

#### ESPERMATOCITOS EN LEPTONEMA (estadios IX-X del ciclo)

Cuando las restantes zonas heterocromáticas de los núcleos preleptoténicos se descondensan (VII-IX del ciclo) queda un espermatócito con un núcleo redondo, grande y completamente homogéneo que son los espermatócitos en leptonema temprano (estadio IX del ciclo) (fig. 27-30). Estos espermatócitos ya no están en contacto con la membrana basal. Conforme avanza el estadio de leptonema la cromatina de ciertas zonas va aumentando su condensación y en el centro de esa condensación comienza a aparecer un eje no muy bien delimitado (estadio IX del ciclo) (fig. 28-29).

Los filamentos de cromatina del par X-Y no pueden ser diferenciados del resto de autosomas en este estadio porque tienen el mismo grado de condensación.

#### ESPERMATOCITOS EN ZIGONEMA (estadios X al XIV del ciclo)

Los espermatócitos en zigonema temprano tienen núcleos

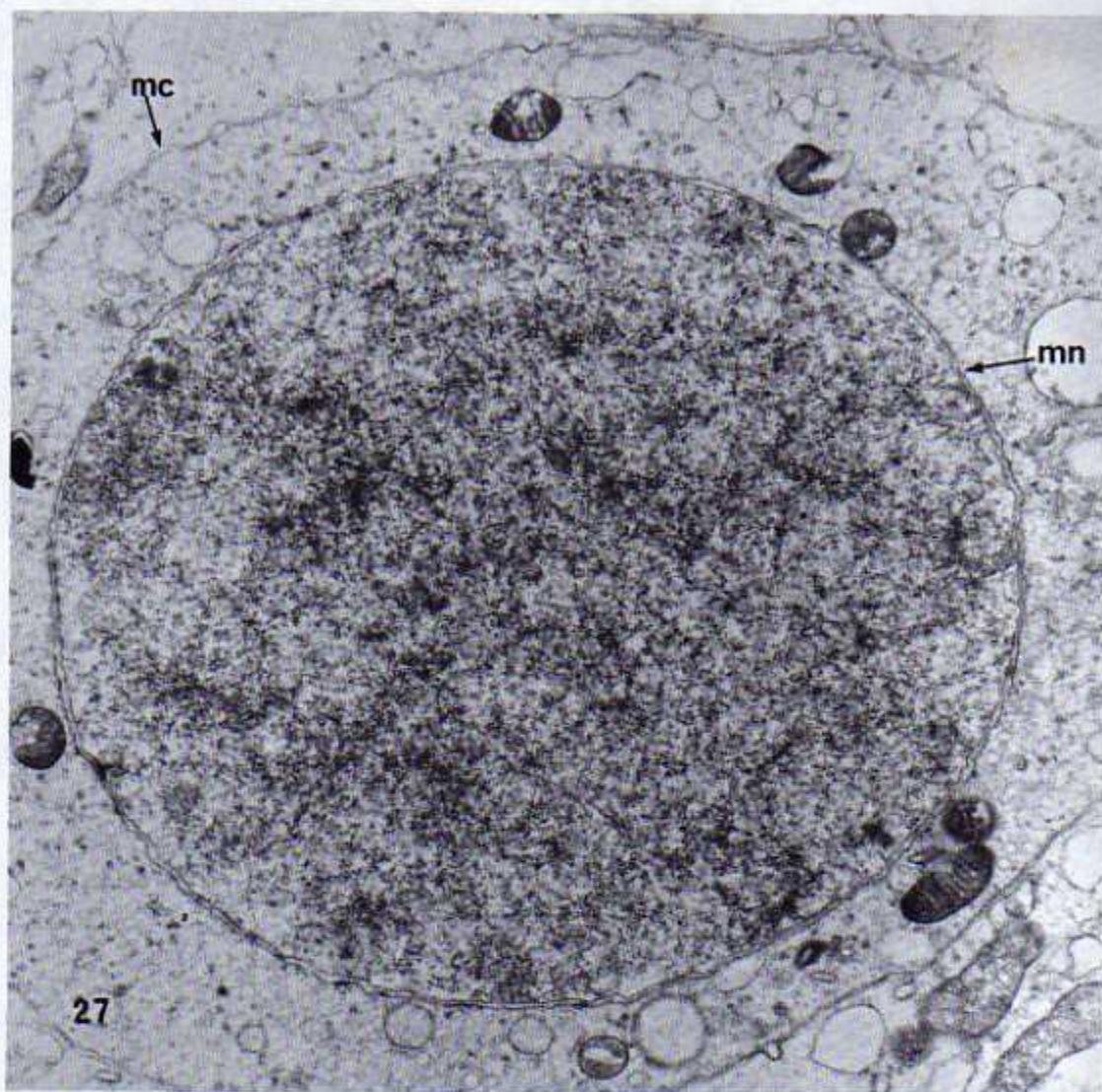
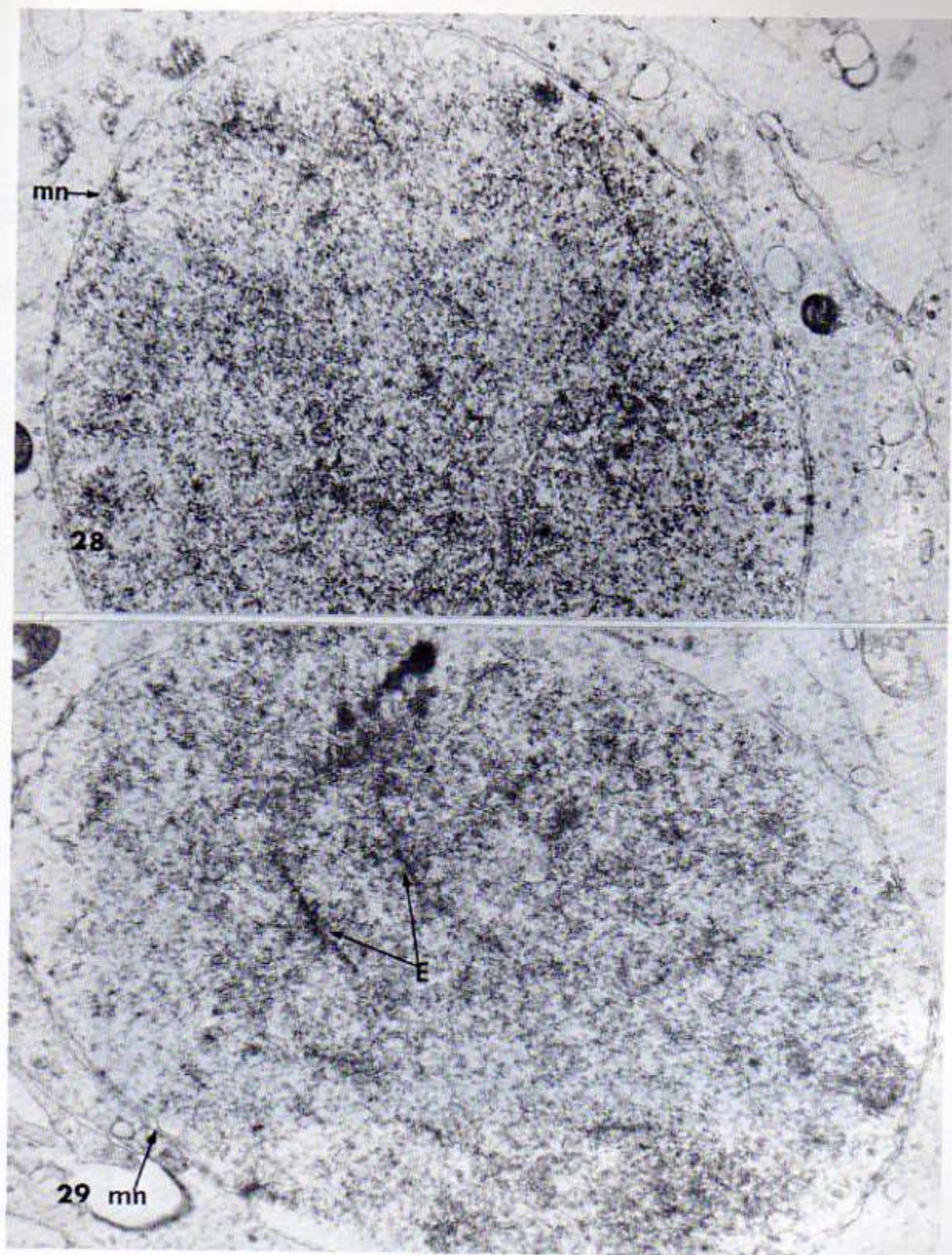


Figura 27. Micrografía electrónica de un espermatócito en leptonema, fotografiado en una sección transversal de un tubo - seminífero en el estadio IX del ciclo. Mn, membrana nuclear; mc, membrana citoplasmática. X 18.900.



Figuras 28 y 29. Micrografías electrónicas de dos espermatocitos en leptonema, fotografiados en una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio IX-X del ciclo. E, ejes; mn, membrana nuclear; X 21.000.

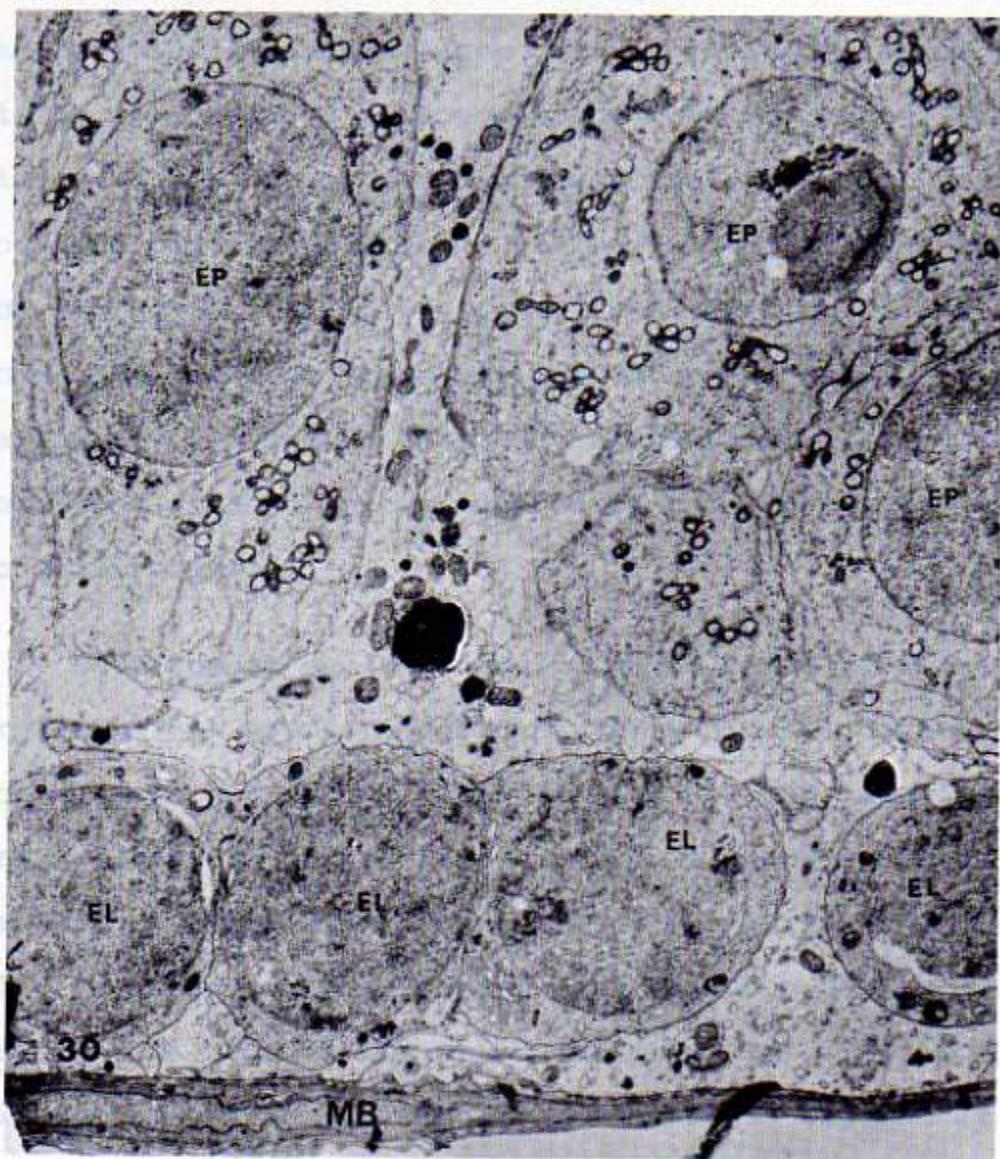


Figura 30. Micrografía electrónica de una sección de un tubo seminífero en el estadio IX-X del ciclo. MB, membrana basal; EL, espermátocitos en leptonema; EP, espermátocitos en paquinema tardío. X. 5200.

grandes, redondos y el número de ejes ha aumentado. La característica fundamental que permite reconocerlos es la aparición de complejos sinaptonémicos formados por el apareamiento de los cromosomas homólogos (fig. 31-32). Tienen una posición más avanzada hacia la luz del tubo seminífero que los espermátocitos en leptonema. Los ejes que forman los complejos sinaptonémicos son perfectamente visibles en este estadio, ya que su densidad ha aumentado. El número de complejos sinaptonémicos aumenta conforme progresa el estado de Zigoteno.

En Zigonema medio y tardío, ya se puede localizar la cromatina del par X-Y (estadios XII y XIV del ciclo); se reconoce ésta porque las fibras de ADN del par sexual comienzan a formar un único cuerpo (vesícula sexual). Esta zona es más homogénea que el resto de la cromatina y dentro de ella se observan ejes simples, muy densos y de mayor diámetro que los ejes de los autosomas (fig. 32). Los complejos sinaptonémicos de los autosomas tienen las siguientes dimensiones: los ejes o elementos laterales tienen un diámetro de 300 a 400 A° y están separados por un espacio de 900 a 1100 A° de diámetro; estas dimensiones no son distintas a las que ofrecen en paquinema temprano y medio.

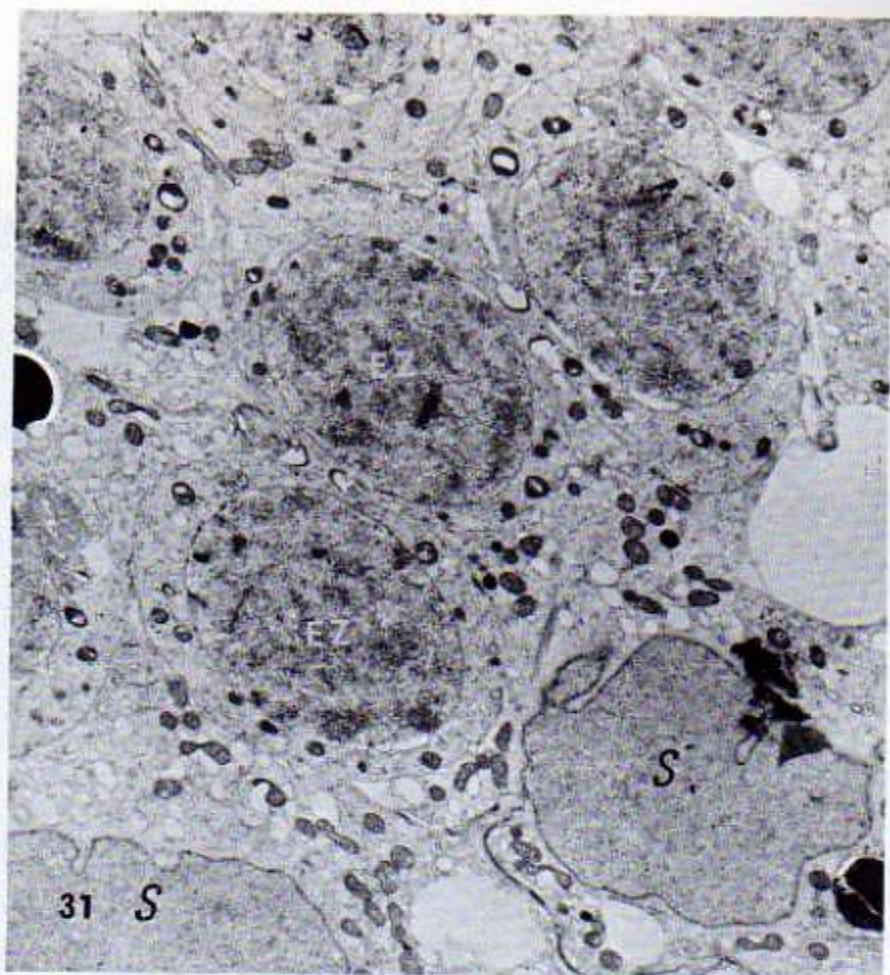


Figura 31. Micrografía electrónica panorámica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio X-XI del ciclo. Se observan tres núcleos de espermatocitos en zigonema muy temprano; EZ, espermatocitos en zigonema temprano; S, células de Sertoli. X 5200.

entre puntos de cada célula. X 19.500.

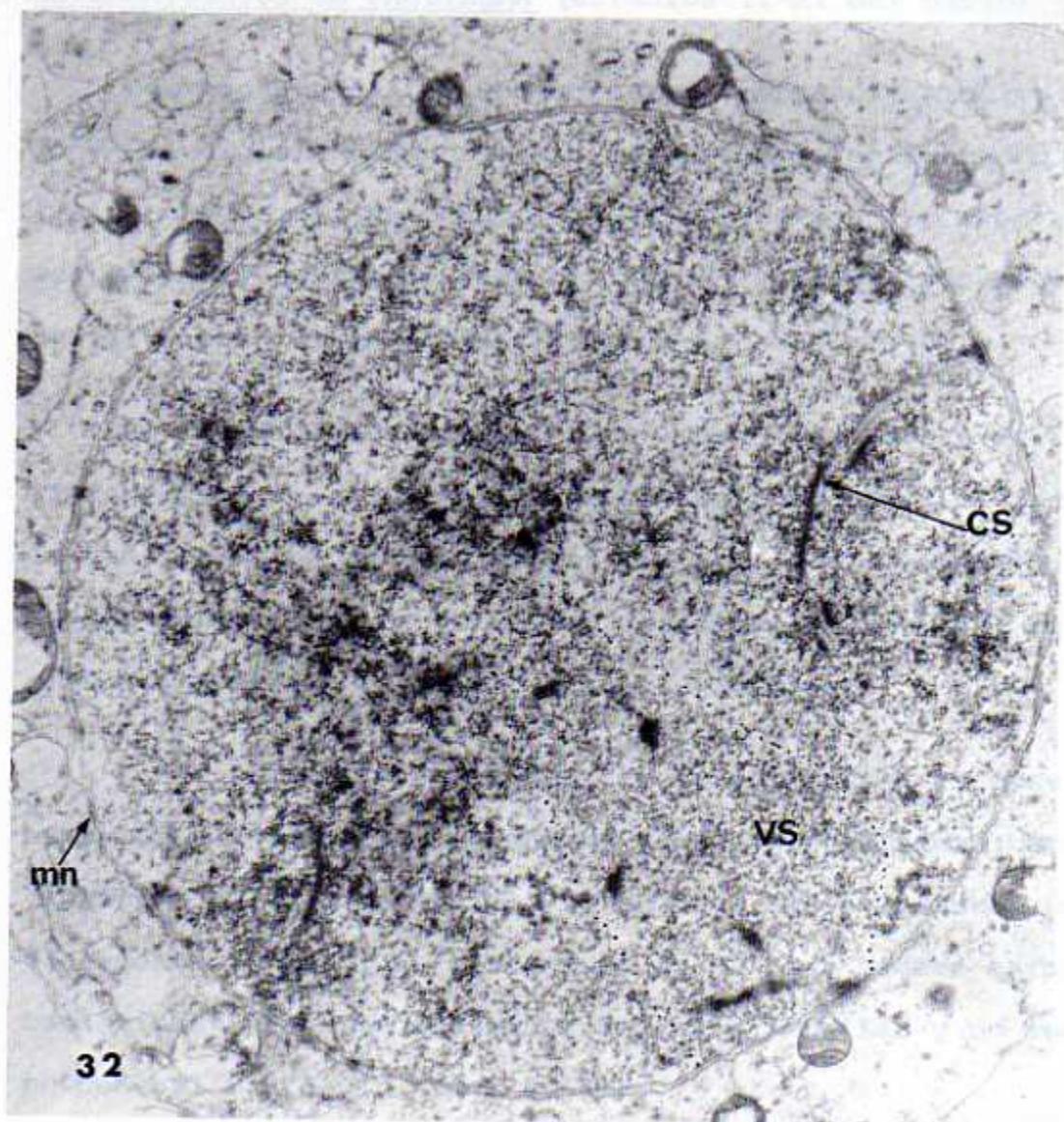


Figura 32. Espermatócito en zigonema tardío fotografiado en una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio XIV del ciclo. CS, complejo sinaptonémico; VS, vesícula sexual (demarcada entre puntos de tinta china). X 19.000.

### ESPERMATOCITOS EN PAQUINEMA (estadios II-XI del ciclo)

Los espermátocitos en paquinema temprano (estadios II al V del ciclo) poseen núcleos que están caracterizados por los largos complejos sinápticos, formados por los tres elementos característicos bien definidos, rodeados por paquetes de fibras de cromatina (fig. 33-34-35-48-49-50).

En los espermátocitos en paquinema temprano se inicia la formación de uno o varios nucléolos. El material nucleolar en formación se observa unido a los "nódulos basales" de los cromosomas que contienen los organizadores del nucléolo (pares dos y siete), (fig. 33-34-35).

Estos nucléolos continúan creciendo durante el paquinema medio y adquieren su máximo tamaño en paquinema tardío (estadios VII-XI del ciclo). Cuando el nucléolo está completamente formado, se distinguen en él tres partes características: una zona granular, una zona fibrilar y un cuerpo central muy denso (fig. 40-41).

En paquinema medio y tardío se observan muchas secciones transversales y longitudinales de complejos sinaptonémicos. La cromatina del par sexual siempre ofrece mayor densidad y homogeneidad que la cromatina de los autosomas. En paquinema tardío la cromatina de los autosomas sufre una

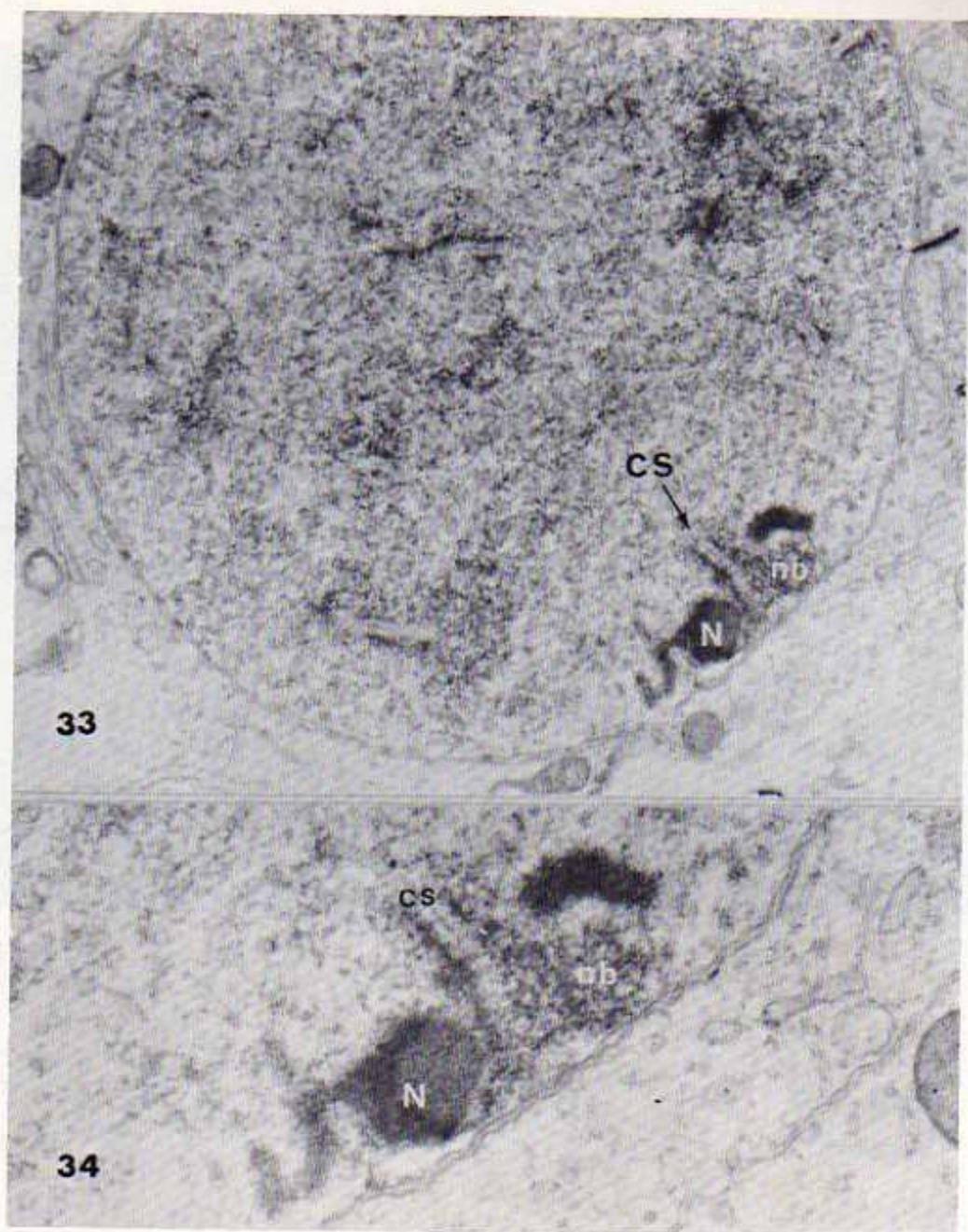


Figura 33. Espermatócito en paquinema muy temprano (estadio II-III del ciclo). CS, complejo sinaptonémico; nb, nódulo basal; N, nucléolo. X 14.000.

Figura 34. Nódulo basal del espermatócito de la figura 33 a mayor aumento. CS, complejo sinaptonémico; nb, nódulo basal; N, nucléolo. X 36.000.

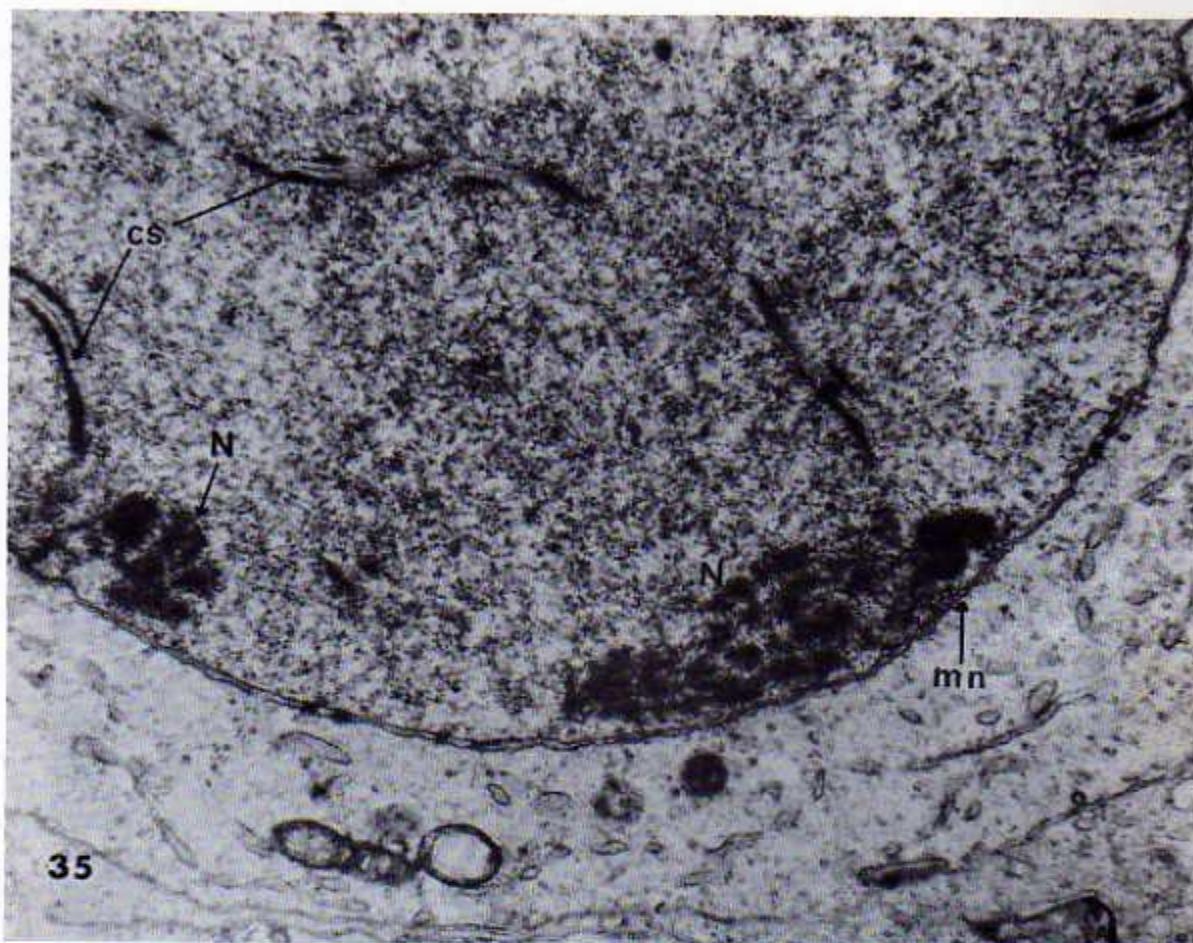


Figura 35. Micrografía electrónica de un espermatócito en paquinema medio (estadio VII del ciclo). Se observan los dos pares de autosomas que organizan los nucléolos. CS, complejos sinaptonémicos; N, nucléolos; mn,, membrana nuclear. X. 21.000

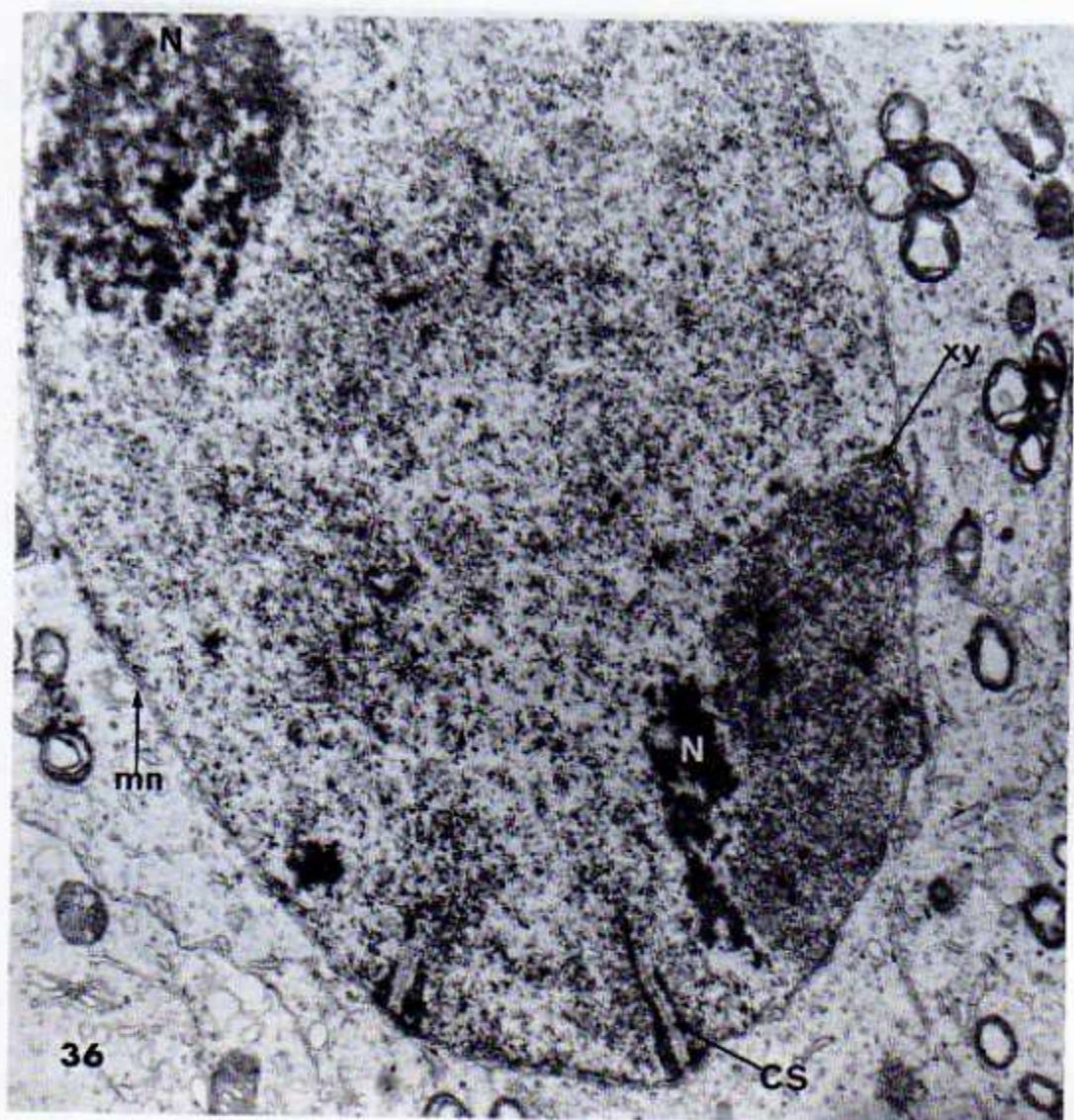


Figura 36. Micrografía electrónica de un espermatócito en paquinema medio (estadios VI-VII del ciclo). CS, complejo sinaptonémico; N, nucléolo; X-Y, cromosomas sexuales; mn, membrana nuclear. X 21.000.



Figura 37. Micrografía electrónica a mayor magnificación del espermatócito en paquinema medio de la figura 36. CS, complejo sinaptonémico; N, nucléolo; mn, membrana nuclear. X 36.000

descondensación lo que hace que la densidad electrónica de la "vesícula sexual" aparente ser mucho mayor (fig. 36-37-54).

#### ESPERMATOCITOS EN DIPLONEMA (estadios XII-XIV del ciclo)

Los espermátocitos en diplonema se caracterizan porque en ellos desaparecen progresivamente los complejos sinápticos dentro del núcleo. Se observan únicamente ejes simples dispersos en el núcleo. En diplonema temprano (estadio XII y XII del ciclo) ensanchados en sus uniones con la membrana nuclear. (fig. 38). En diplonema tardío los ejes ya han desaparecido, los núcleos de los espermátocitos ofrecen una cromatina descondensada y muy homogénea. Sin embargo, la cromatina de la vesícula sexual aún continúa densa, homogénea y en su interior todavía se observan aunque ya de muy poca densidad electrónica (fig. 39-40).

El nucléolo, aún en diplonema, conserva todos sus elementos característicos y al igual que en paquinema medio y tardío ocupa diferentes posiciones dentro del núcleo pero alejado del par X-Y. En muy pocos casos estas dos estructuras se encuentran cerca pero no hay continuidad física entre ellos (fig. 39-40).

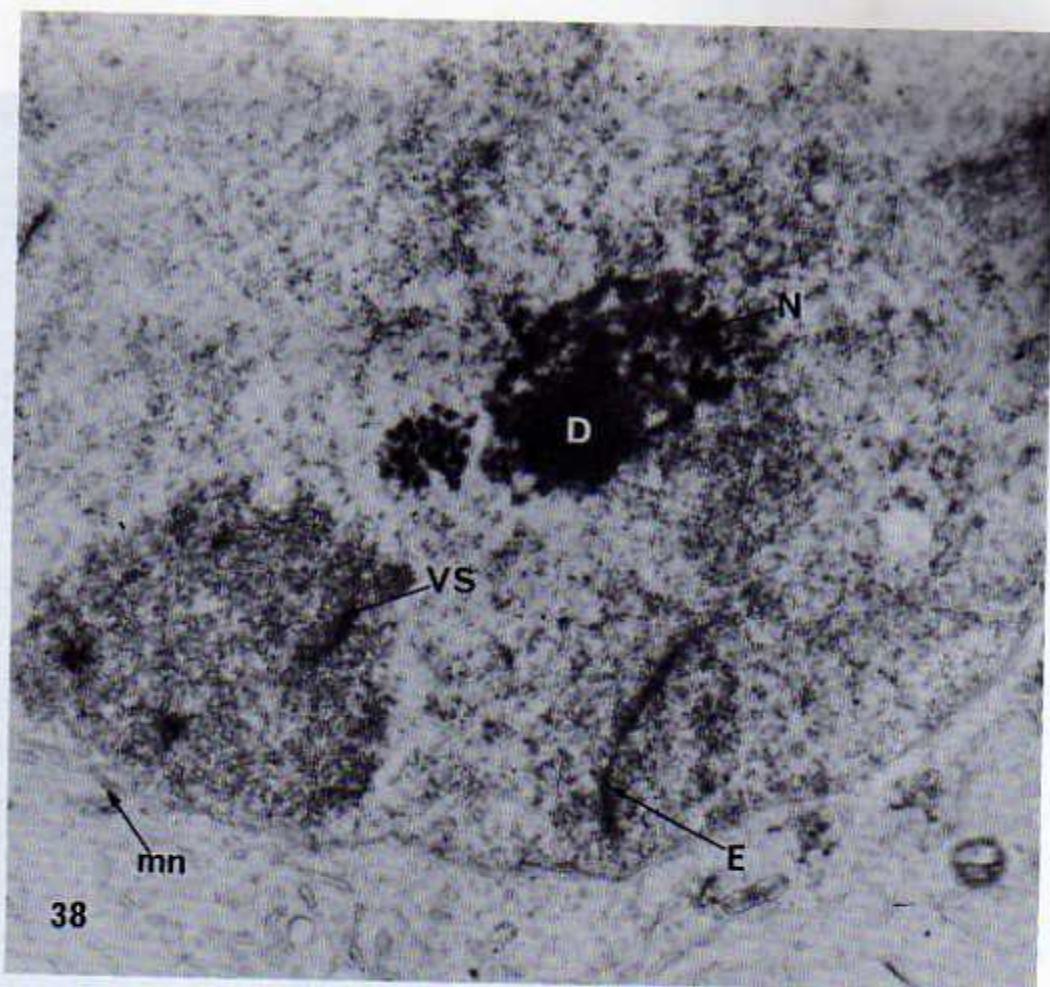


Figura 38. Micrografía electrónica de un espermatócito en diploema (estadios XII-XIII del ciclo). VS, vesícula sexual; E, eje; N, nucléolo; D, cuerpo denso central; mn, membrana nuclear. X 21.000.

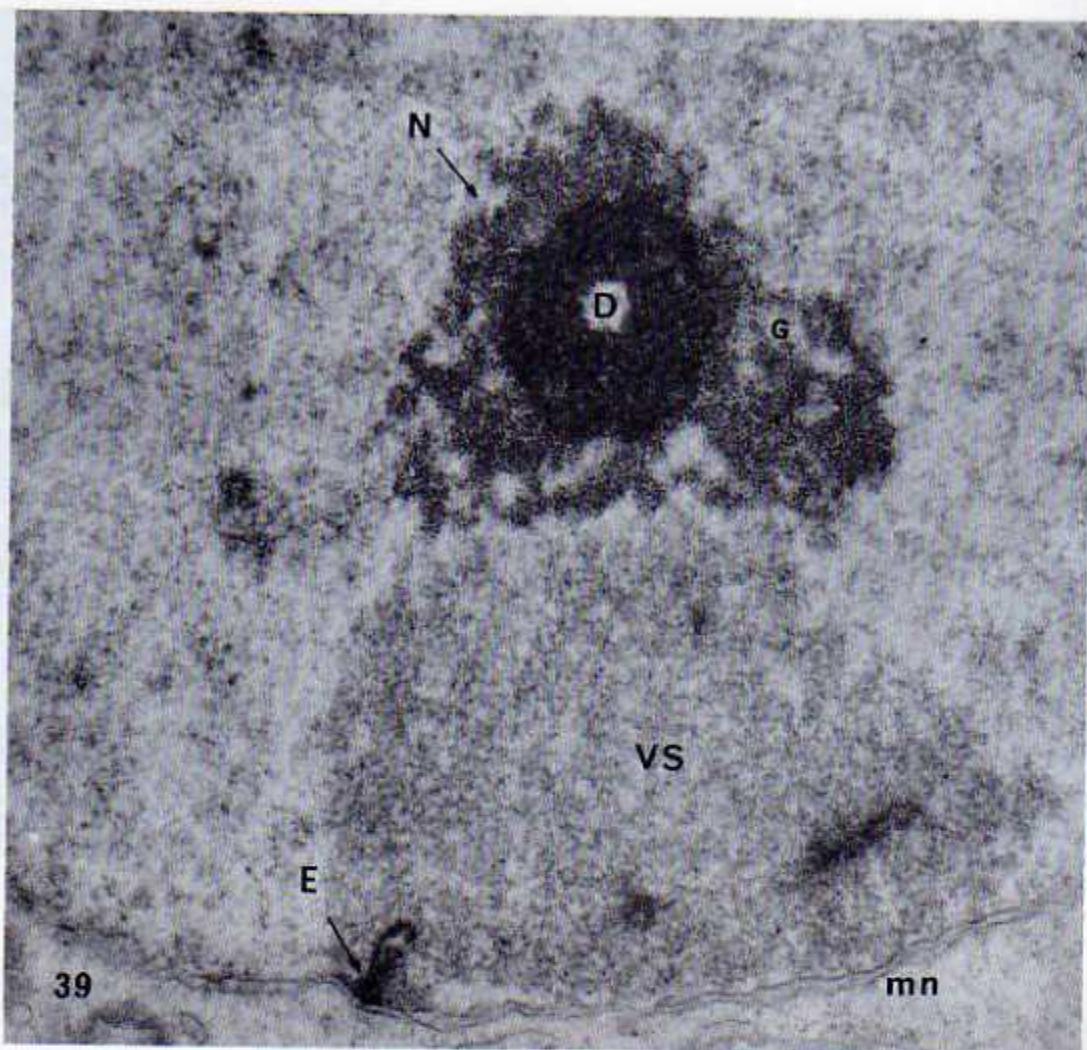
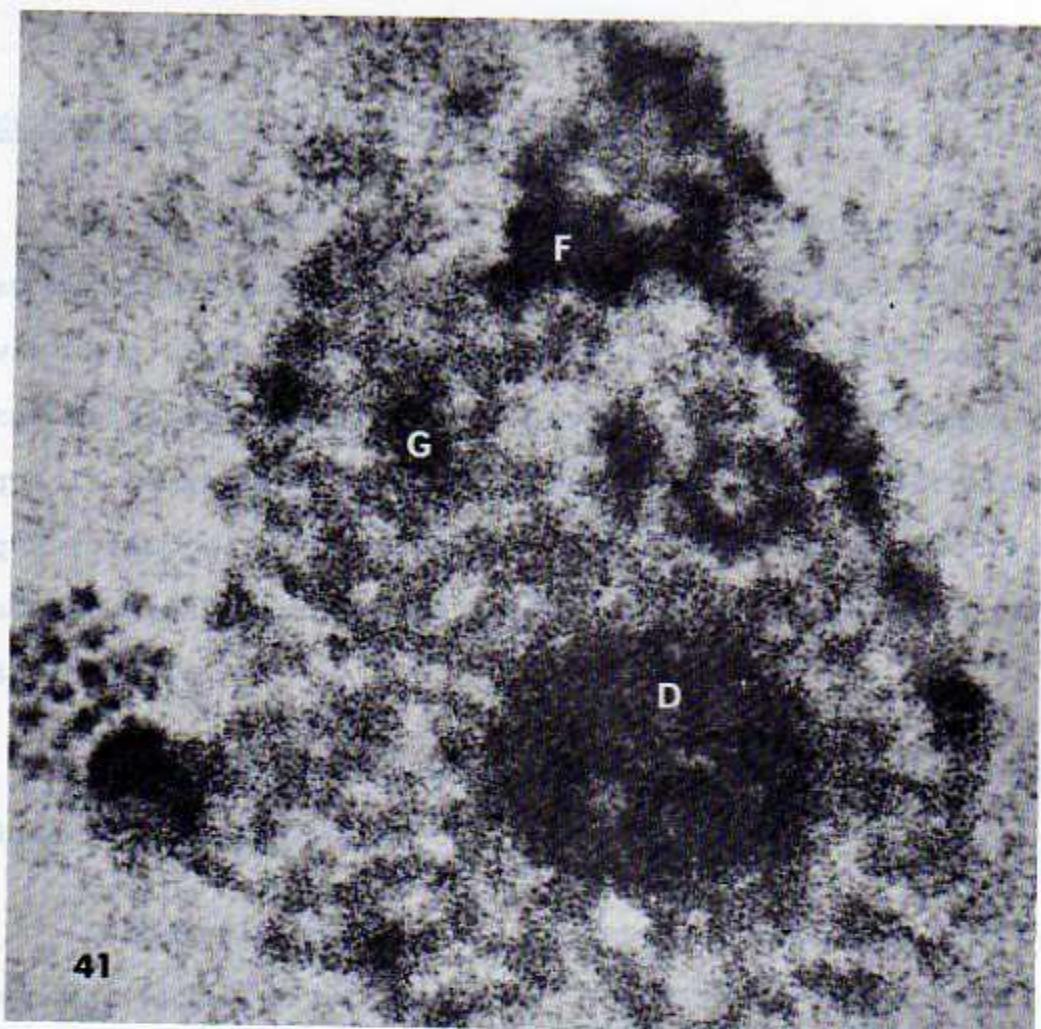


Figura 39. Micrograffa electrónica de un espermatócito en diplotema (estadio XIII del ciclo). VS, vesícula sexual; E, eje; N, nucléolo; D, zona central densa; G, zona granular; mn, membrana nuclear. X 36.000.



encuentras formado la vesícula sexual y además, la forma completa de los bivalentes no puede observarse en una sola sección muy fina (300 Å).

CRÓMOSOMAS SEXUALES EN RECOMBINACIÓN DE HOMÓLOGOS (estadios VIII y IX del ciclo).

Los núcleos leucocitos al revelar las cromátidas homólogas, por las las bases de las cromátidas que se observan en los

Figura 41. Micrografía electrónica del nucléolo principal del espermatócito de la figura 40, a mayor magnificación. D, zona central densa; G, zona granular; F, zona fibrilar. X 42.000

ESPERMATOCITOS EN METAFASE Y ANAFASE (estadio XIV del ciclo)

En el estadio XIV del ciclo se observan muchas células en metafase, anafase y telofase de la primera y segunda divisiones meióticas. Los cromosomas se observan como paquetes de fibras de cromatina dispersos en el citoplasma ya que la membrana nuclear ha desaparecido. Los microtúbulos que forman el huso se observan dirigidos de los centriolos hasta unirse con los centrómeros de los cromosomas. (fig. 42-43-44).

El nucléolo desaparece entre el final del diplonema y durante la diacinesis.

Durante la metafase I, anafase I y telofase I, los cromosomas sexuales no pueden ser localizados pues ya no se encuentran formando la vesícula sexual y además, la forma completa de los bivalentes no puede observarse en una sola sección muy fina (500 A°).

CROMOSOMAS SEXUALES EN ESPERMATOCITOS EN LEPTONEMA (estadios VIII y IX del ciclo).

Los núcleos leptoténicos poseen una cromatina uniforme, porque las masas densas de cromatina que se observan en los núcleos preleptoténicos ya han desaparecido, quedando un nú-

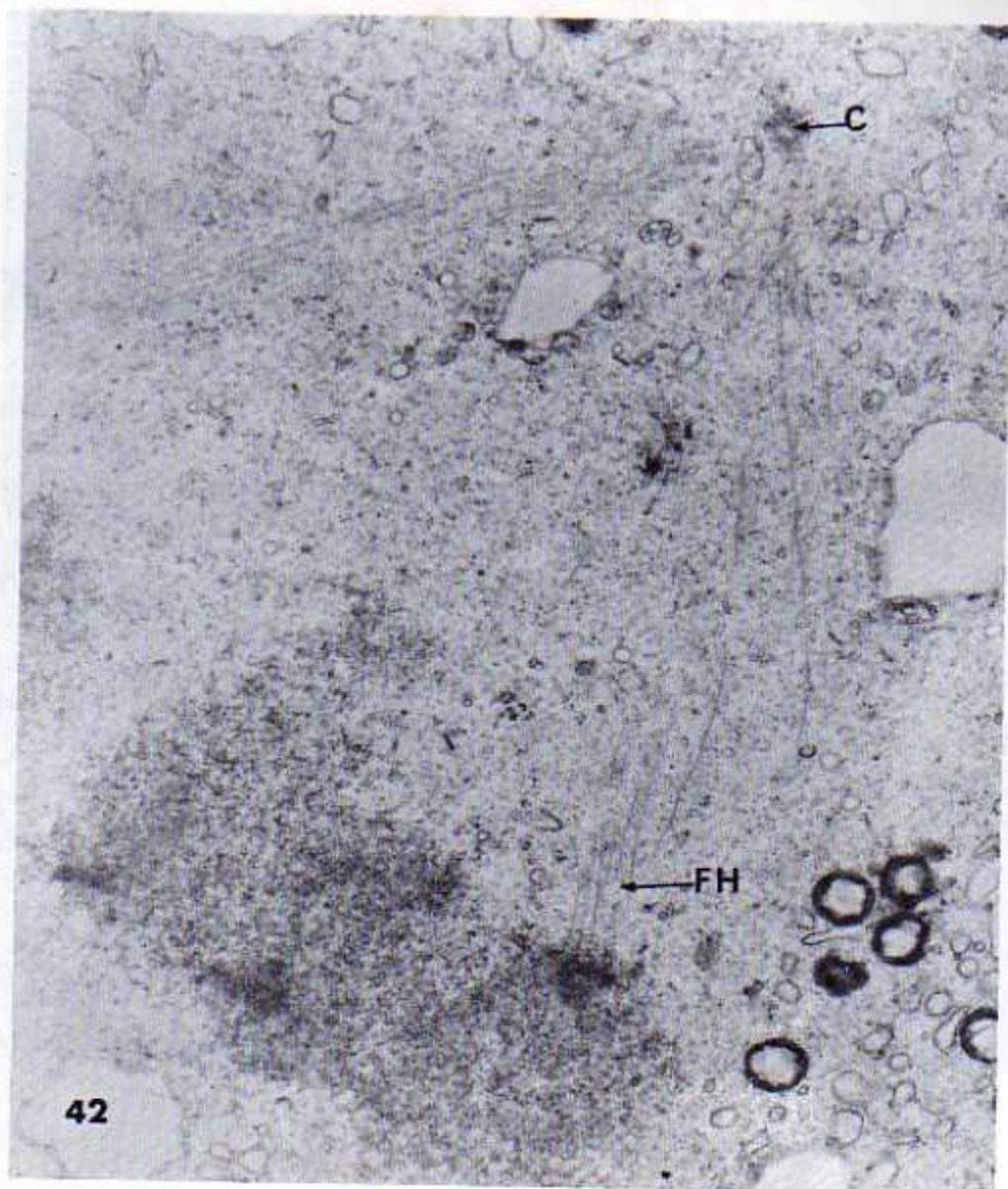


Figura 42. Micrografía electrónica de un espermatócito en metafase, fotografiado en un corte transversal de un tubo seminífero en el estadio XIV del ciclo. C, centríolo; FH, fibras del huso. X 21.000.

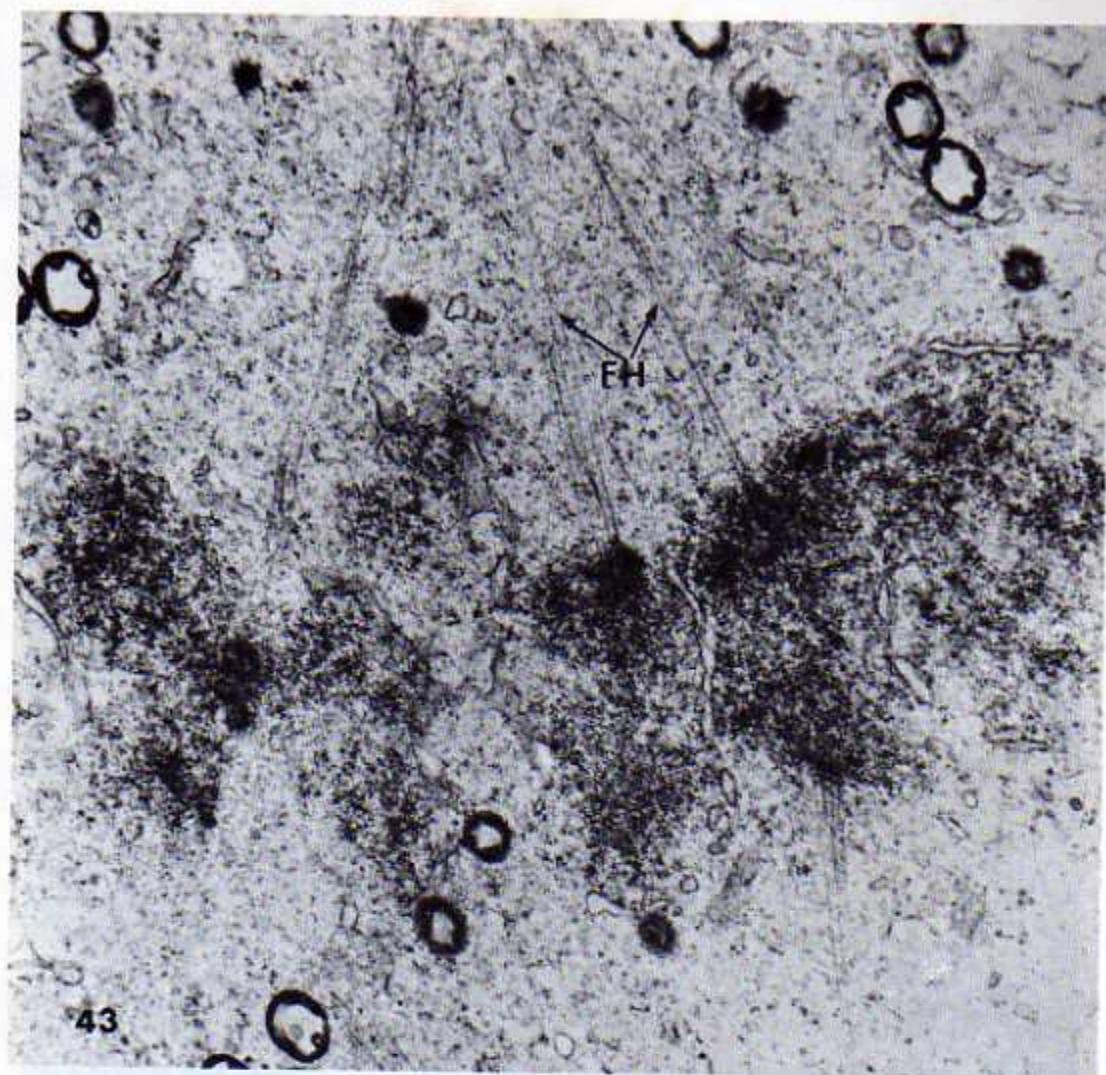
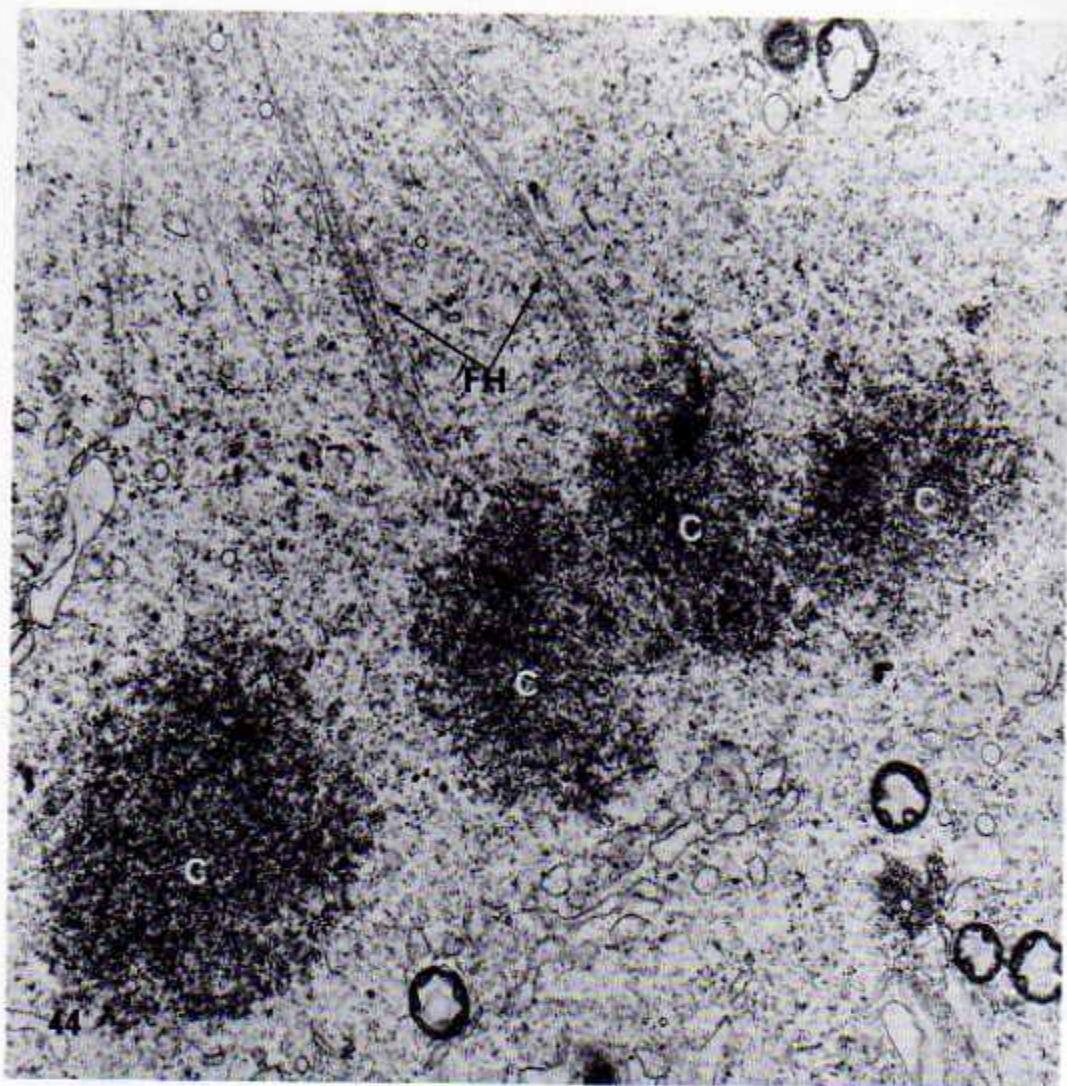


Figura 43. Micrografía electrónica de un espermatócito en anafase (estadio XIV del ciclo). FH, fibras del huso; X 21.000.



fibras del huso de AHI, pero ya se puede observar la "cicla sexual", la cual no está en contacto con la zona de molinos. Los ejes del par X-Y en el estadio de riones son gruesos y con una densidad electrónica menor que la de los ejes de los autosomas, lo que indica su importancia para el desarrollo del par sexual. Se

Figura 44. Micrografía electrónica de un espermatócito en anafase, fotografiado en una sección transversal de un tubo seminífero en estadio XIV del ciclo. FH, fibras del huso; C, cromosomas. X 21.000.

cleo de densidad uniforme en donde se inicia la formación de los ejes que pasarán a constituir los complejos sinápticos (fig. 27-28-29-30). Como su densidad electrónica es igual o menor que la del resto del ADN de los autosomas no fue posible la identificación de los cromosomas sexuales en este estadio.

CROMOSOMAS SEXUALES EN ESPERMATOCITOS EN ZIGONEMA (estadios X al XIV del ciclo).

En el estadio de zigonema los cromosomas sexuales son primeramente identificados como una masa ovalada de cromatina homogénea, que forma un cuerpo único (vesícula sexual). La masa de cromatina está formada por fibrillas que, a nivel de microscopía electrónica, se observan con una densidad homogénea. En zigonema temprano (fig. 32) la densidad de las fibras de cromatina es menor que la densidad de las fibras del resto de ADN, pero ya se puede observar la "vesícula sexual", la cual no está en contacto con la membrana nuclear. Los ejes del par X-Y en el estadio de zigonema son gruesos y con una densidad electrónica superior a la de los ejes de los autosomas, datos que son de mucha importancia para el reconocimiento del par sexual. En zigonema tardío (estadios XIII y XIV del ciclo) la densidad de las fibras de ADN de los cromosomas sexuales es mayor

que la densidad de las fibras de los autosomas, o sea que el par heterocromático (vesícula sexual) está bien definido y es de fácil reconocimiento. (s muy posible que la zona de apareamiento entre el par X-Y tenga mayor longitud que la que ofrece en paquinema). Como no se hicieron reconstrucciones tridimensionales de la región de apareamiento entre los cromosomas X-Y en zigonema, no se le pudo medir para compararla con aquella de paquinema.

Las pruebas histoquímicas no mostraron la presencia de ARN en el par sexual en zigonema. En este estadio la "vesícula sexual" se encuentra separada de los otros cromosomas por un espacio claro.

#### CROMOSOMAS SEXUALES EN ESPERMATOCITOCITOS EN PAQUINEMA

(estadios III al XI del ciclo).

Como el estadio de paquinema es muy largo y de muy fácil reconocimiento, la mayoría de las observaciones sobre los cromosomas sexuales se hicieron en este estadio de la profase I. Se examinaron detalladamente, tanto a nivel de microscopia óptica como electrónica, núcleos de espermátocitos en paquinema temprano (estadios IV al VI del ciclo), paquinema medio (estadios VI al VIII) y tardío (estadios IX al XI del ciclo).

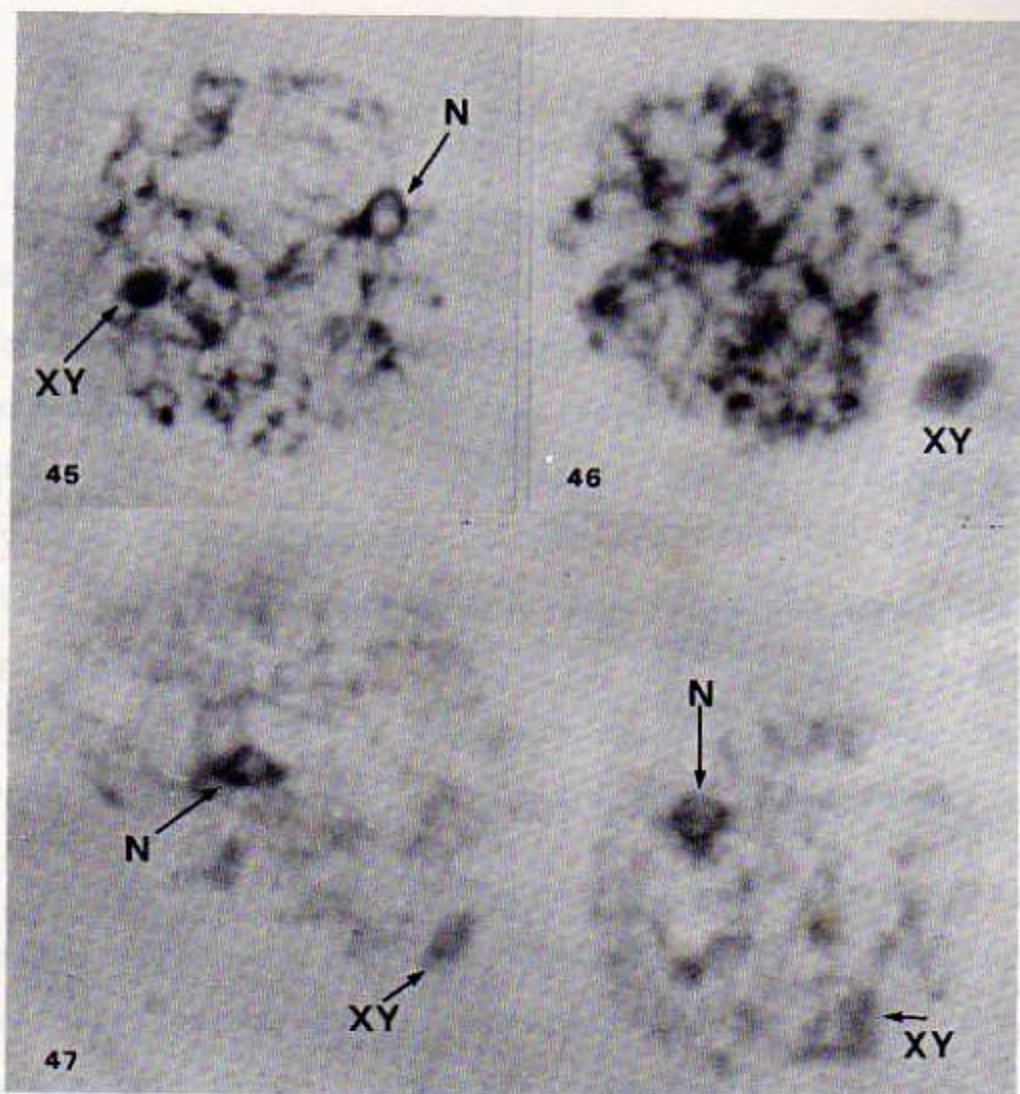


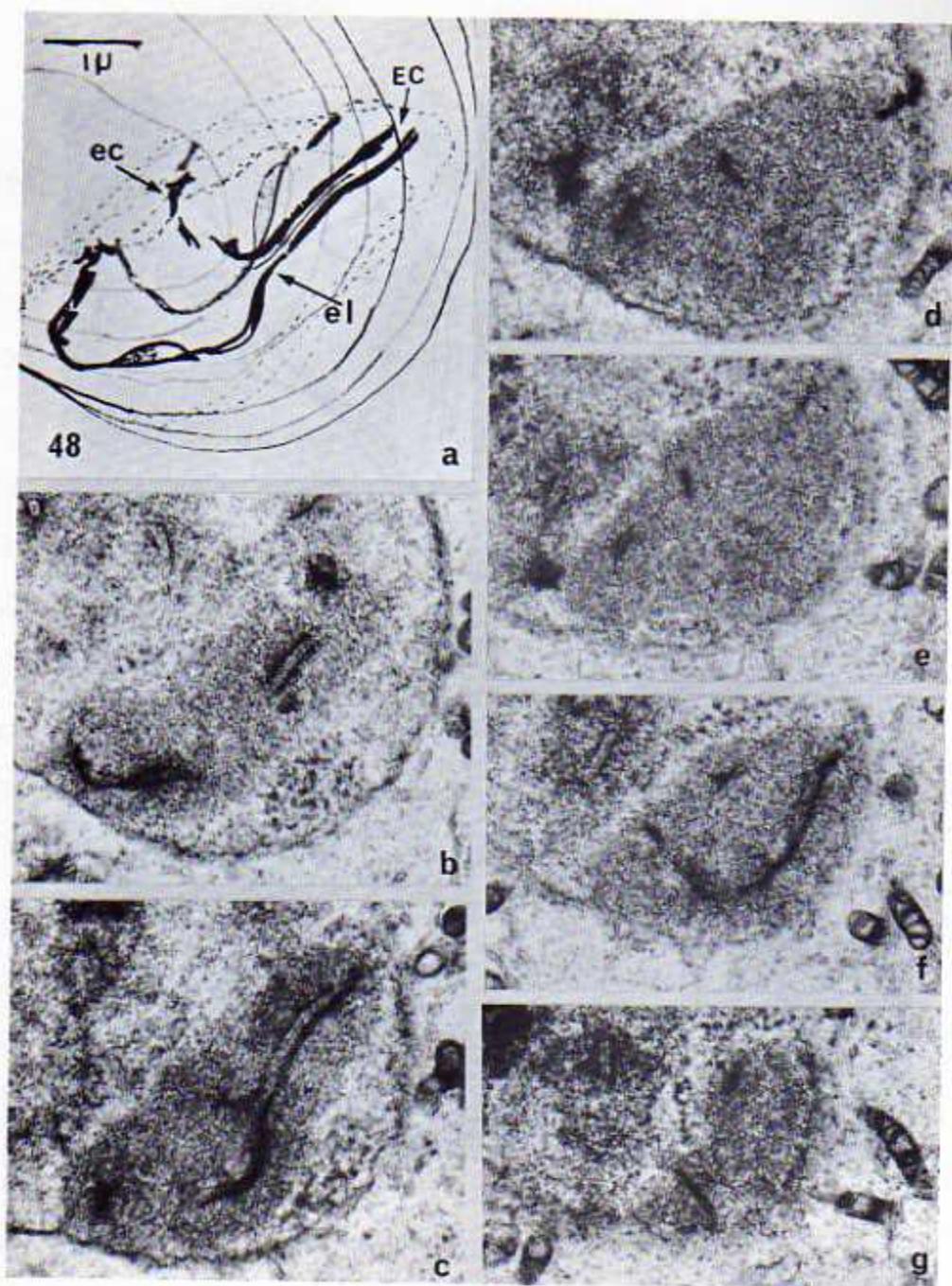
Figura 45 y 46. Espermatóцитos en paquinema, teñidos con azul de Toluidina. X-Y, cromosomas sexuales; N, nucléolo. X 1200.

Figura 47. Espermatóцитos en paquinema, teñidos con Verde Metil-Pironina. X-Y, cromosomas sexuales; N, nucléolo. X 1.300.

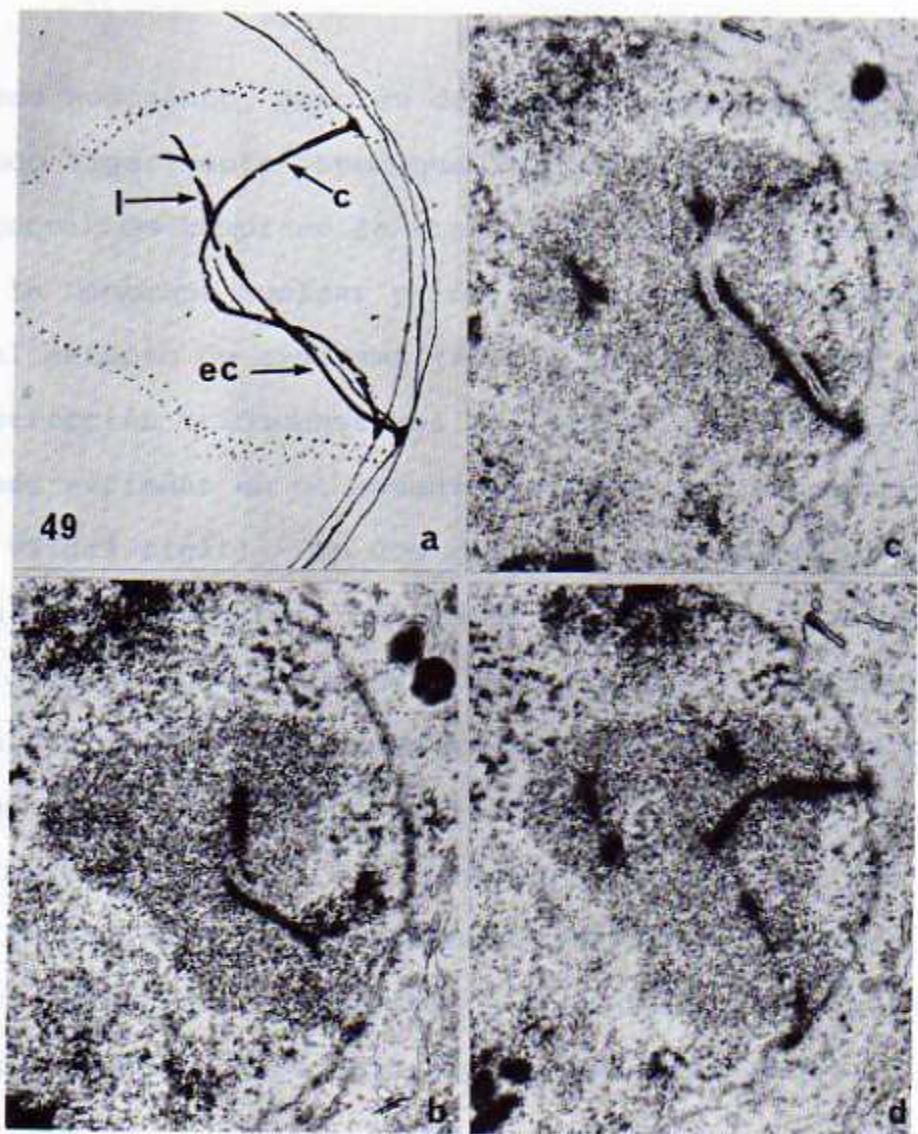
Las pruebas histoquímicas para la localización de ácidos nucleicos mostraron que el par X-Y siempre forma una masa de forma oval (vesícula sexual) durante el estadio de paquiteno (fig. 45-46-47). La "vesícula sexual" generalmente fue localizada en la periferia del núcleo, mientras que uno o más nucléolos se encontraron localizados en la parte central del núcleo, generalmente asociados con zonas heteropictóticas de autosomas (fig. 45-46-47). Un porcentaje muy bajo (menos de 10%) de células mostraron una asociación entre un nucléolo pequeño y el par X-Y durante paquinema.

El par sexual, se tiñe de color verde en forma homogénea y débilmente con verde metil-pironina. No se observó material pironinofílico en ningún estadio en el par X-Y. El nucléolo principal generalmente se observa como una masa pironinofílica de forma circular (fig. 47) y el centro no se tiñe con ningún tipo de colorante específico para ARN. Resultados similares se obtuvieron con la técnica de "Azul de Toluidina" (fig. 45-46). La frecuencia de contactos entre los nucléolos y los cromosomas sexuales (vesícula sexual), aunque fue superior en los extendidos, no se observó en más de un 15% de las células.

Las observaciones a nivel de microscopía electrónica mostraron que durante paquinema temprano el par sexual per-



Figuras 48 bg. Micrograffas electrónicas de secciones seriadas a través del par X-Y, en un espermatócito en paquinema temprano. La figura "a" es una fotografía del modelo obtenido por la superposición de la serie de cortes (b'c'd'e'f'g') obteniéndose una representación completa del par X-Y. EC, extremo común; ec, eje corto; el, eje largo.



Los ejes concilian y terminan en la misma molcula  
 pero únicamente existen tres veces de contacto, porque los  
 dos ejes tienen un extremo común (fig. 48-49). El extremo  
 común está formado por un extremo del eje corto y un extre-  
 mo del eje largo, que viajan paralelos hasta puntos en con-  
 tacto con la molcula vecina. En esta zona aparece un tipo

Figuras 49 bcd. Micrograffas electrónicas de secciones seriadas a través de la zona homóloga del par X-Y en paquinema temprano. La figura 'a' es una fotografía del modelo obtenido por la superposición de los cortes bcd. EC, extremo común, (complejo sinaptonémico del par X-Y); C, eje corto; l, eje largo. X 18.000.

manece homogéneo, pero su densidad electrónica ha aumentado, siendo ligeramente mayor que la densidad de los autosomas. En paquinema temprano la vesícula sexual está en contacto con la membrana nuclear y los ejes tienen menor diámetro que en el estadio de zigonema (fig. 48-49-50-51-52-53). La reconstrucción tridimensional del par X-Y, fue hecha con secciones seriadas en el estadio de paquinema temprano (estadio VI del ciclo). En dos reconstrucciones completas y varias reconstrucciones parciales, se observó lo siguiente: Dos ejes de aproximadamente 800 a 1000 Å de diámetro, corren dentro de la vesícula sexual. Cada eje tiene una longitud característica, el eje corto mide 4,5 µ de longitud y el largo 10,6 µ. El eje largo está formado por dos filamentos densos de aproximadamente 400 Å de diámetro, unidos en la mayoría de su longitud y ocasionalmente separados en algunos puntos, especialmente en paquinema medio.

Los ejes comienzan y terminan en la membrana nuclear, pero únicamente existen tres zonas de contacto, porque los dos ejes tienen un extremo común (fig. 48-49). El extremo común está formado por un extremo del eje corto y un extremo del eje largo, que viajan paralelos hasta ponerse en contacto con la membrana nuclear. En esta zona aparece un tercer elemento en posición central, de aproximadamente 150 Å

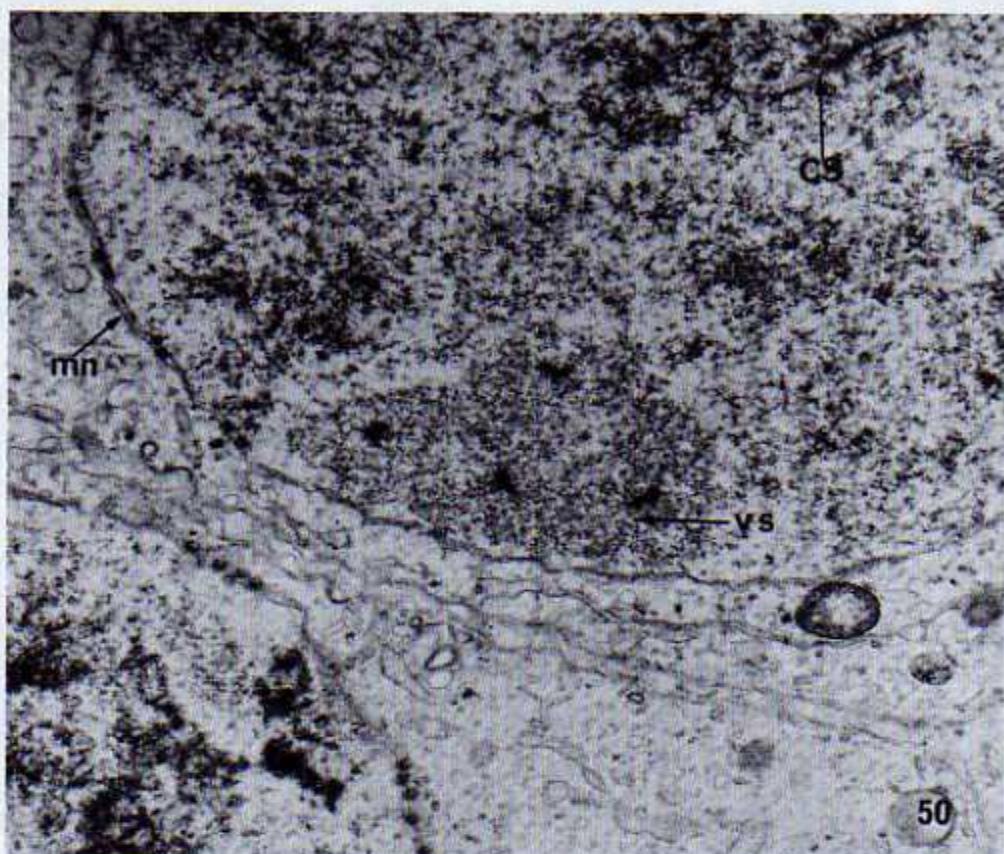


Figura 50. Micrografía electrónica de un espermotócito en paquinema muy temprano (estadio III del ciclo). CS, complejo sinaptonémico; VS, vesícula sexual; mn, membrana nuclear. X 19.000.



Figura 51. Espermatócito en paquinema temprano (estadio V del ciclo). Cs, complejo sinaptonémico; mn, membrana nuclear; X-Y, cromosomas sexuales. X 33.000.

de diámetro. Así el extremo común es un complejo sinaptonémico que tiene una longitud de  $1,7 \mu$ . (fig. 48a-48c-49ac). Los dos elementos laterales (ejes) están separados por un espacio central de  $1200 \text{ A}^\circ$ .

Durante paquinema temprano varios nucléolos inician su formación en diferentes partes del núcleo, generalmente lejos del par X-Y. En muy pocos casos un nucléolo se observa cerca de la vesícula sexual, pero siempre hay un espacio que separa ambas estructuras. (fig. 50-52-53). Los nucléolos crecen durante paquinema. Tres zonas principales pueden ser distinguidas en el nucléolo principal: Una zona esférica muy densa en posición central, que corresponde a la zona que da reacción negativa con las pruebas para ARN; una zona fibrilar generalmente pequeña; y una zona granular compuesta por gránulos de  $200 \text{ A}^\circ$  de diámetro. Esta última zona pierde su afinidad de tinción después de una extracción con ácido perclórico, indicando así que corresponde con la zona pironinofílica visible con el microscopio óptico.

En paquinema medio (estadios VI y VII del ciclo) la vesícula sexual está perfectamente delimitada por un espacio que la rodea y la separa del resto de los autosomas. Los ejes se observan bien y conservan las mismas dimensiones que en paquinema temprano. En paquinema tardío (estadios

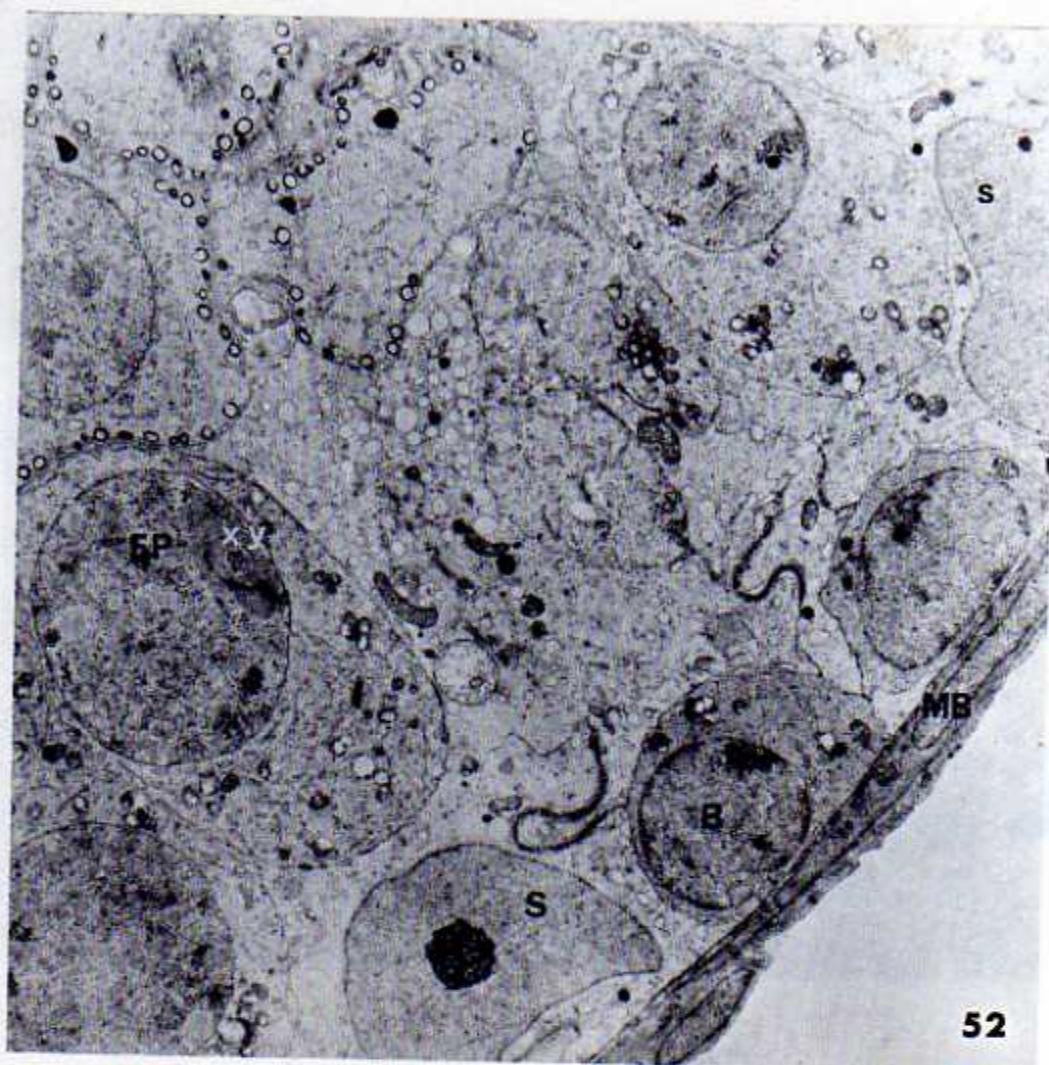


Figura 52. Micrografía electrónica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio V del ciclo. MB, membrana basal; S, célula de Sertoli; B, espermatogonio de tipo B; EP, espermatócito en paquinema medio; X-Y, cromosomas sexuales. X 52.000

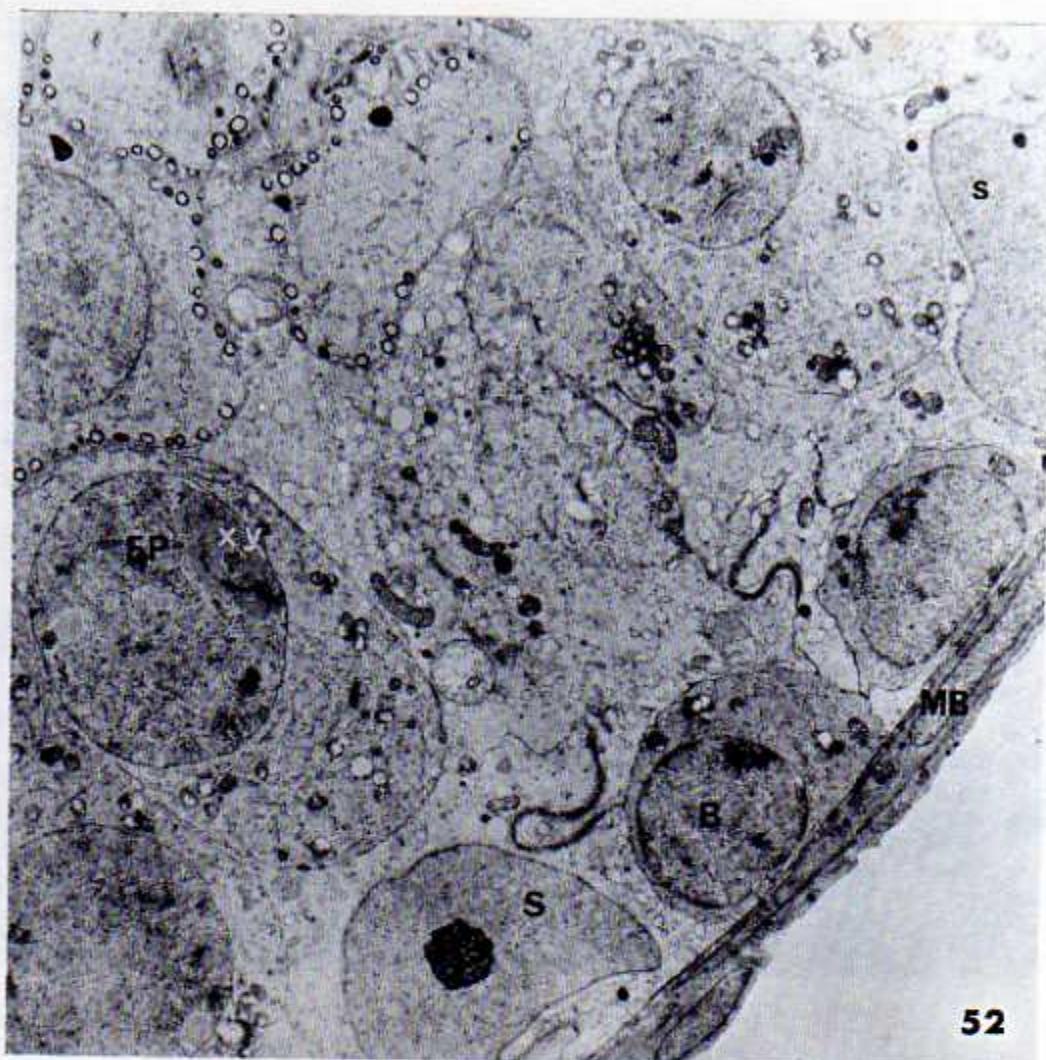


Figura 52. Micrografa electrónica de una sección transversal de un tubo seminífero en el estadio V del ciclo. MB, membrana basal; S, célula de Sertoli; B, espermatogonio de tipo B; EP, espermatócito en paquinema medio; X-Y, cromosomas sexuales. X 52.000

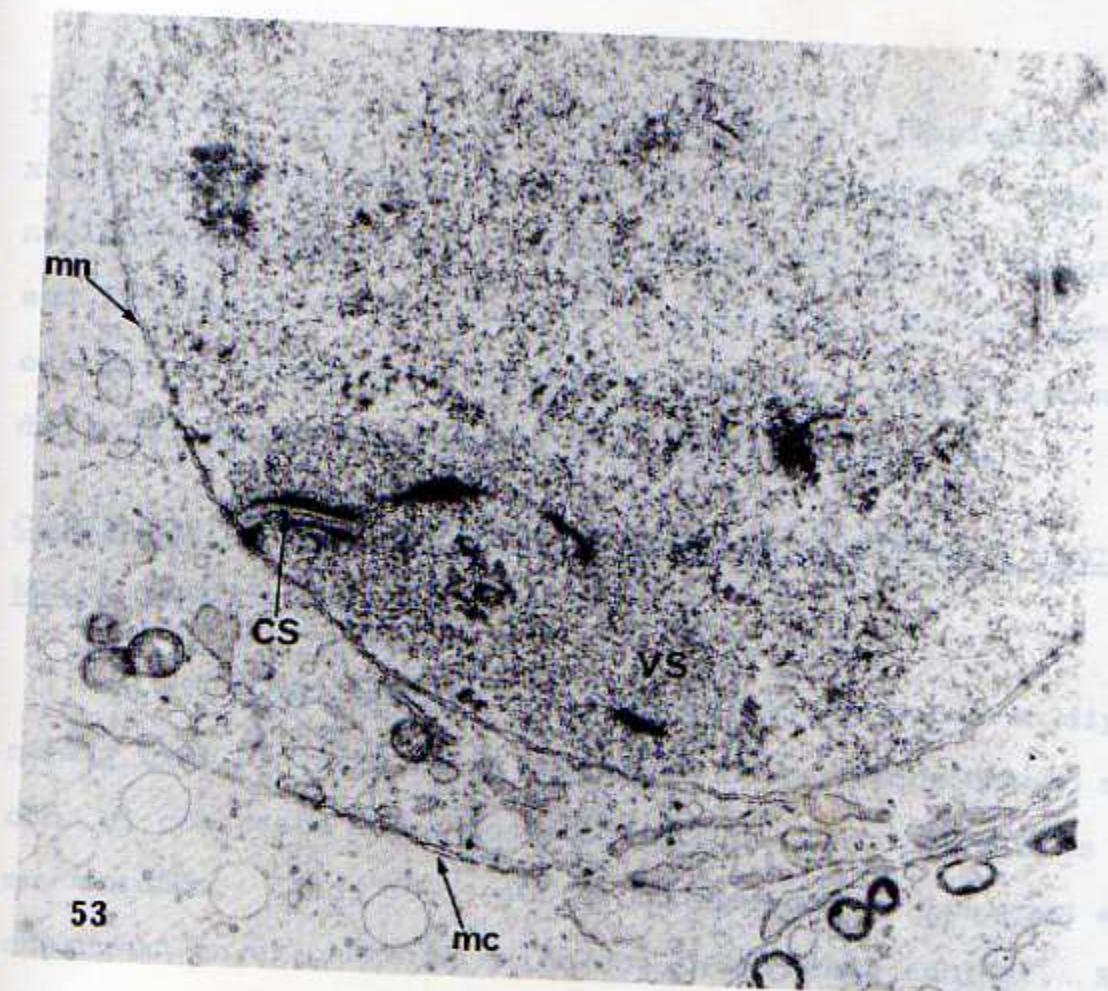


Figura 53. Micrografía electrónica de un espermatócito en paquinema medio (estadio V del ciclo). CS, complejo sinaptonémico; VS, vesícula sexual; mc, membrana citoplasmática; mn, membrana nuclear. X 21.000.

IX al XI del ciclo) la cromatina del par X-Y (vesícula sexual) ofrece una mayor densidad que los autosomas. Como el nucléolo ha llegado a su máximo tamaño, las dos estructuras son fácilmente observables con gran detalle. Aun en este estadio de máximo desarrollo no se observa ninguna continuidad entre la vesícula sexual y el nucléolo (fig. 54).

CROMOSOMAS SEXUALES EN ESPERMATOCITOS EN DIPLONEMA Y DIACINESIS (estadios XII y XIV del ciclo).

La "vesícula sexual" continúa siendo muy densa en diplonema y como el resto de la cromatina se ha descondensado mucho, el contraste entre los dos tipos de fibras de ADN es muy marcado. (fig. 38-39-40). Los extremos de los ejes se ensanchan en el punto de unión con la membrana nuclear. Se observan desdoblados en sus dos componentes. El nucléolo desaparece en el estadio de diplonema. El par X-Y no fue localizado en los núcleos en diacinesis.

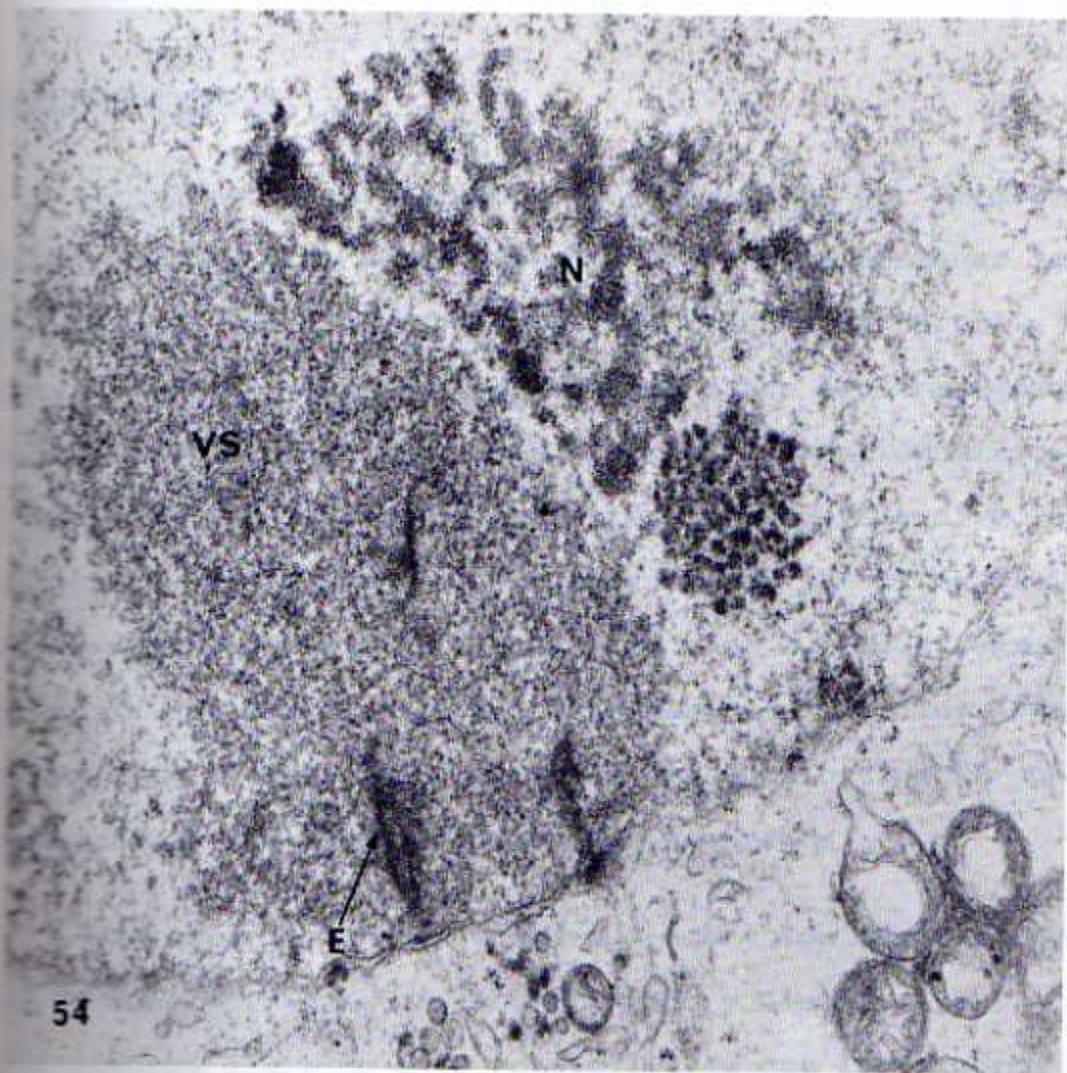


Figura 54. Micrografía electrónica de un espermatócito en paquinema tardío (estadio X del ciclo). VS, vesícula sexual; E, ejes; N, nucléolos; X 36.000.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

### ESPERMATOGONIOS

El término espermatogonio fue utilizado por primera vez por Von La Valette Saint George (1876), para designar las células que hoy día se conocen como células de Sertoli. Así, en las primeras investigaciones sobre espermatogénesis de la rata, los espermatogonios no fueron identificados con precisión. Los espermatogonios "poussiereuses" y "crou-telleuses" de Regaud (1910) son descritas por Allen (1918) como espermatogonios de tipo A y de tipo B respectivamente, nomenclatura que se siguió usando para designar los espermatogonios, aunque este autor usa el término tipo "B" para referirse a los espermatócitos muy tempranos.

Una descripción más elaborada sobre los espermatogonios de la rata fue hecha por Roosen-Runge y Giesel (1950). Estos autores llegaron a la conclusión de que los espermatogonios de tipo A sufrían varias divisiones antes de transformarse en los espermatogonios de tipo B.

Clermont y Leblond, 1953; Clermont y Perey, 1957, 1967; han hecho un extenso estudio sobre clasificación y forma de renovación de los espermatogonios de la rata. Estos investigadores usan el término "reposo" (resting) para designar las células originadas por las divisiones de los espermato-

gonios B. Esta designación fue cambiada posteriormente por Ortavant (1959) por el de "espermátocitos preleptoténicos". En los últimos estudios de microscopia óptica hechos por Clermont y Bustos-Obregón (1963) se describen cinco tipos de espermatogonios A, un tipo de espermatogonio intermedio y un tipo de espermatogonio B. Estos autores proponen un esquema de renovación en que mencionan tres grupos de espermatogonios: los A-0 que son considerados como células de reserva, de los A-1 a A-4 precursores de los espermatogonios intermedios y finalmente los espermatogonios B que producen los espermátocitos.

Todos estos trabajos mencionados han sido enfocados hacia la explicación de la forma de renovación de la población de espermatogonios de los mamíferos y muy pocos describen con detalle la morfología nuclear de éstos.

La ultraestructura de los diferentes tipos de espermatogonios fue estudiada a través de los catorce estadios del ciclo del epitelio seminífero. Las observaciones de este trabajo corroboran y aportan más información a las observaciones obtenidas por Clermont y Bustos-Obregón (1963) a nivel de microscopia óptica. Los espermatogonios A-0 fueron observados en varios estadios del ciclo. Estos son elementos de difícil localización en secciones transversales muy

finas debido a que su población es muy baja. Según Clermont, 1967; Clermont y Bustos-Obregón, 1968 esta célula raramente se divide y por eso la consideran como un elemento de reserva. Esta hipótesis es reforzada por las observaciones de Dym y Clermont (1967) quienes observaron que los A-0 son elementos radioresistentes en testículos irradiados con rayos X.

Los espermatogonios A-1 presentan núcleos redondos y ovoides con nucléolos de forma irregular en su interior, datos que no concuerdan con los de Clermont, 1967; Clermont y Bustos-Obregón, 1968.

Los espermatogonios A-2 son muy diferentes de los A-3 en su morfología nuclear. Su núcleo grande, de poca densidad electrónica, de forma redondeada y con tres nucléolos pequeños en su interior, lo hace muy diferente del espermatogonio A-3 que tiene un núcleo oscuro de forma ovoide y con un solo nucléolo. Estas observaciones no coinciden con las de Clermont y Bustos-Obregón (1968) quienes describen a los A-2 como espermatogonios con características muy similares a los A-3. Las masas globulares de cromatina que estos autores describen dentro del núcleo de los espermatogonios A-2 son tres nucléolos pequeños de forma irregular que a nivel de microscopia óptica no pueden ser identificados.

Los espermatogonios A-4 son células de fácil observación, ya que se localizan en el estadio XIV del ciclo, el cual a su vez está caracterizado por las metafases y anafases de la primera y segunda división meiótica. En cuanto al tamaño del núcleo es similar al del espermatogonio A-3, pero su nucléolo grande e irregular, junto con una cara plana del núcleo en la zona de apoyo a la membrana del tubo seminífero, lo caracteriza perfectamente. Los espermatogonios de tipo B tienen núcleos más pequeños que los espermatogonios A-1 a A-4 y su morfología nuclear es muy diferente de éstas. Se pudieron diferenciar bien los núcleos de los espermatocitos preleptoténicos de los espermatogonios B, diferencias que no se habían hecho a nivel de microscopía electrónica.

Los cromosomas sexuales no fueron identificados en los espermatogonios. Resultados similares en este respecto han sido obtenidos por Minouchi (1928) en la rata y por Tres y Solari (1968) en humanos.

#### ESPERMATOCITOS

En el proceso de la espermatogénesis, los espermatocitos primarios en desarrollo sufren una serie de cambios a nivel de núcleo y citoplasma, que los diferencian a través

de toda la profase de la meiosis. Los cambios a nivel del núcleo son los más importantes. El núcleo homogéneo de un espermatócito temprano (en leptonema) y el núcleo con ejes y complejos sinaptonémicos de un espermatócito en zigonema y paquinema son muy diferentes de los núcleos de espermatogonios, espermatidas y células de Sertoli, que en conjunto forman la población de células del tubo seminífero. Las transformaciones a nivel de citoplasma no se consideran en este trabajo.

Durante la profase I los espermatócitos sufren una serie de cambios ultraestructurales e histoquímicos a nivel de núcleo que fueron estudiados con detalle. Entre los cambios ultraestructurales más significativos tenemos: la descondensación y desaparición de densas masas de heterocromatina de los núcleos preleptoténicos; la formación de ejes simples en los núcleos en leptonema y acoplamiento de estos ejes en los espermatócitos en zigonema para formar los complejos sinaptonémicos.

El complejo sinaptonémico es una estructura asociada con cromosomas homólogos a lo largo de toda su longitud. Esta estructura ha sido considerada como universal, lo cual ha sido bien expuesto en una revisión por Moses (1968). El complejo sinaptonémico está formado por dos elementos late-

rales y uno central. Cada elemento lateral está rodeado por fibrillas de cromatina y corresponde a uno de los homólogos. La reconstrucción seriada de las nueve parejas de cromosomas hecha por Moens y Perkins (1969) de un pequeño protista lo ha comprobado. El complejo sinaptonémico se observa a lo largo de todo el homólogo en sinapsis y finaliza en la membrana nuclear (Moses y Coleman 1964; Moens y Perkins 1969).

En los núcleos de espermátocitos en leptonema temprano se observa el inicio de formación de los ejes o elementos laterales y ya en leptonema tardío los ejes están formados pero sin constituir complejos sinaptonémicos. Los complejos sinaptonémicos se observan en los espermátocitos en zigonema. Así a nivel de microscopia electrónica, la aparición de las primeras secciones transversales y longitudinales de complejos sinaptonémicos son tomados como referencia fundamental para indicar que el espermátocito ha entrado a la fase de zigonema de la profase I de la meiosis.

Estas estructuras complejas que siguen a la formación de los ejes en la profase de la meiosis, fueron descritas por Moses (1956, 1958) en espermátocitos primarios de cangrejo y por Fawcett (1956) en espermátocitos de paloma, gato y hombre. Posteriormente se describieron en diferentes espe-

cies de animales y plantas tanto unicelulares como pluricelulares (Moses, 1968).

Los complejos sinaptonémicos se continúan observando a través de todo el paquinema, pero ya en el estadio de diplo-teno el complejo desaparece, quedando únicamente zonas pequeñas en los puntos de unión a la membrana nuclear. En el estadio de diploteno se observan los elementos laterales libres en el núcleo, al igual que en leptonema tardío pero ahora con una marcada descondensación. Estos elementos laterales se observaron ensanchados en el punto de unión a la membrana nuclear.

La cromatina del par sexual heterocromático mantiene el mismo grado de condensación a través de toda la profase I de la meiosis, aunque su densidad aumenta considerablemente de zigonema a paquinema tardío. Lo contrario se observa con los autosomas que sufren una descondensación de paquinema temprano hacia diplonema; este fenómeno fue descrito por Solari (1969a) en el ratón. Este autor relaciona esta descondensación con una mayor actividad metabólica de los autosomas que la de los cromosomas sexuales durante la meiosis.

### ULTRAESTRUCTURA Y SINAPSIS DEL PAR X-Y EN LA RATA

Se ha demostrado que el complejo sináptico está relacionado con la sinapsis entre homólogos (Moses, 1956, 1958; Moses y Coleman, 1964; Moens, 1968). Las investigaciones sobre esta estructura en zigonema y paquinema en el par X-Y podría indicar la existencia de sinapsis en estos cromosomas. En ratón y en humanos, Solari (1969b) y Solari y Tres (1970) demostraron que el eje largo de la "vesícula sexual" corresponde al cromosoma X y que el corto al cromosoma Y, demostrando la existencia de una zona homóloga entre estos cromosomas. Ureña y Solari (1970) descubrieron un patrón similar en la rata. El complejo sinaptonémico formado por los ejes del par X-Y de la rata, tiene una longitud de  $1,7 \mu$  (paquinema temprano) y por lo tanto es considerablemente más largo que el observado en humanos, que es de aproximadamente  $0,8 \mu$  de longitud (Solari y Tres, 1970) y en ratón, cuya longitud es de  $0,95 \mu$  (Solari, 1969 b).

La existencia de la pequeña zona homóloga entre los cromosomas sexuales de la rata abren la posibilidad de un intercambio de material genético entre el par sexual. Los resultados presentes confirman y aumentan las observaciones sobre ultraestructura del par X-Y (vesícula sexual) obtenidos por Solari (1964, 1969b, 1970) en ratón y por Solari y

Tres (1967a, 1967b, 1970) en humanos.

En ratón la longitud del complejo sinaptonémico decrece rápidamente durante paquinema, (más rápidamente que en los autosomas). Lo mismo sucede en la rata. Por esta causa en diplonema la región de apareamiento no puede ser localizada con microscopia óptica.

Así la asociación "término-terminal" descrita por muchos autores (Killer y Darlington, 1934; Tjio y Levan 1956; Ohno, Kaplan y Kinosita, 1956) corresponde a un remanente de la asociación entre ambos cromosomas.

SIGNIFICADO DE LA PRESENCIA DE UN COMPLEJO SINAPTONEMICO EN EL PAR X Y DE LA RATA.

La nueva y detallada información obtenida con las investigaciones sobre la ultraestructura de los cromosomas sexuales de los mamíferos en los últimos 30 años (Solari, 1964, 1969a, 1969b, 1970; Solari y Tres, 1967a, 1967b, 1970; Ford y Woollam, 1966 ; Ureña y Solari, 1970) llegó a poner en evidencia el fenómeno conocido como "sinapsis parcial" entre los cromosomas sexuales X-Y. La presencia de un extremo común en el par sexual, indica que el comportamiento de los cromosomas sexuales es similar al de los autosomas. La he-

terocromatización especial del par X-Y durante la profase I de la meiosis ha sido interpretado como un mecanismo de seguridad (Swanson, 1960; Eberle, 1964; Grell y Valencia, 1969) que protege al par X-Y de sufrir entrecruzamiento, lo cual traería como consecuencia la destrucción de genes situados en la región diferencial del cromosoma Y.

La existencia de un complejo sinaptonémico de 1,7 u de longitud formado por los cromosomas X-Y de la rata, indica también la existencia de una sinapsis parcial (Ureña y Solari, 1970), en esta especie de mamífero, resultados que coinciden con los obtenidos por Solari (1969a, 1969b) en el ratón y por Solari y Tres (1970) en humanos; y que es lo esperado de acuerdo con el concepto clásico de evolución de la determinación cromosómica del sexo, Swanson (1960).

Así queda demostrado que existe una pequeña zona homóloga en los cromosomas sexuales de estas tres especies (ratón, humanos y rata).

En relación con la formación de quiasmas entre los cromosomas X-Y de la rata, la microscopia óptica no ha podido resolver nada. Koller y Darlington (1934) en un trabajo sobre las propiedades genéticas y mecánicas de los cromosomas sexuales de la rata describen una región de apareamiento a

través de toda la longitud del cromosoma Y y una zona del cromosoma X, con la formación de quiasmas terminales e intersticiales.

La interpretación de apareamiento parcial en el par X-Y resultó cierta, aunque estos autores se basan en observaciones deficientes pues son los únicos que describen a los cromosomas sexuales en la profase I de la meiosis sin formar la "vesícula sexual". La primera parte de esta hipótesis fue confirmada por Ureña y Solari (1970), pero no así lo relacionado con la formación de quiasmas.

La existencia de la pequeña zona homóloga, abre la posibilidad de que pueda producirse un intercambio de material genético en ella. Como el centrómero no fue localizado con microscopía electrónica, no se pudieron identificar los brazos que entran en esta asociación.

#### RELACION DEL PAR X-Y CON EL NUCLEOLO.

Los datos obtenidos a nivel de microscopía óptica y electrónica en este trabajo indican que histoquímicamente no hay ARN detectable dentro del par X-Y (vesícula sexual) de la rata durante la profase meiótica. Estos resultados están de acuerdo con los de Sachs (1955) y con los de Solari y Tres (1967). Sin embargo, otros autores (Eberle, 1963)

y especialmente Ohno, Kaplan y Kinosita (1956) habían descrito una vesícula sexual en la rata conteniendo ARN, el cual persistía aún después de que el nucléolo había desaparecido en la profase I tardía.

Koller y Darlington (1934) y Tjio y Levan (1956) han descrito el par sexual de la rata como asociado con un nucléolo. Sin embargo, los resultados muestran que tal asociación es un evento raro y que en los casos en que ambas estructuras están cerca no hay continuidad física entre ellas. El hecho de que los nucléolos no estén asociados con el par X-Y se debe a que los organizadores del nucléolo se encuentran localizados en constricciones secundarias de los pares de autosomas dos y siete, según lo demostraron Ohno, Kaplan y Kinosita (1959). Solari y Tres (1967); Solari (1969), demostraron que en el ratón el nucléolo está asociado con el par X-Y, formando una zona nucleolar bien definida en la "vesícula sexual" de este animal. Además, estos autores establecen que en los mamíferos en general la "vesícula sexual" está formada esencialmente por la cromatina condensada del par X-Y.

En el caso especial del ratón, el nucléolo está asociado con el par X-Y, porque los organizadores del nucléolo están localizados en el cromosoma X. (Ohno, Kaplan y Kinosi-

ta, 1957a).

Pueden explicarse las discrepancias en la literatura acerca de las relaciones entre el nucléolo y el par sexual de la rata por las asociaciones ocasionales entre un nucléolo secundario pequeño y el par cromosómico X-Y. Solari y Tres (1967) interpretan esta asociación como causada por la tendencia que tienen diferentes zonas heterocromáticas dentro del núcleo a asociarse entre sí. La afinidad de la heterocromatina para fusionarse ha sido descrita en muchas células (Mittwoch, 1967).

## RESUMEN

En este trabajo se estudió la ultraestructura de los núcleos de espermatogonios, espermatócitos y cromosomas sexuales de la rata (Rattus norvegicus albus) mediante microscopía electrónica y métodos histoquímicos.

Los espermatogonios A-0 tienen un núcleo alargado con granulaciones de cromatina cuyos diámetros varían entre 400 A° y 2000 A°. Un nucléolo pequeño se observa unido a la membrana nuclear.

Los espermatogonios A-1 se caracterizan por tener núcleos redondos y ligeramente ovalados con uno o dos nucléolos libres en su interior.

Los espermatogonios A-2 poseen un núcleo grande ligeramente redondo con una cromatina muy poco densa; tres nucléolos pequeños de forma muy irregular se observan en el interior del núcleo.

Los espermatogonios A-3 y A-4 se caracterizan porque sus núcleos son de forma ovoide con granulaciones de cromatina distribuidas dentro de ellos y poseen un nucléolo grande y alargado.

Los espermatogonios intermedios se caracterizan por su núcleo alargado ligeramente ovoide con zonas de heterocroma-

tina muy densas en contacto con la membrana nuclear.

Los espermatogonios B tienen un núcleo esférico con abundantes masas de heterocromatina en contacto con la membrana nuclear.

Los espermátocitos preleptoténicos tienen núcleos que se caracterizan porque poseen zonas de heterocromatina de poca densidad electrónica, irregularmente distribuidas.

Los espermátocitos en leptonema tienen núcleos con una cromatina muy homogénea. En leptonema tardío aparecen filamentos (ejes) rodeados de fibras de cromatina. En los espermátocitos en zigonema se observan los complejos sinaptonémicos. Sus núcleos son de mayor tamaño que los leptoténicos. El par sexual se identifica como una zona de cromatina más homogénea que el resto de ADN.

Los espermátocitos en paquinema se caracterizan por su núcleo grande, complejos sinaptonémicos completos, un nucléolo en formación y una vesícula sexual bien formada. La reconstrucción tridimensional del par X-Y en paquinema temprano demuestra la existencia de una sinapsis parcial en estos cromosomas. La ultraestructura del par X-Y fue estudiada en secciones seriadas. El par X-Y de la rata en paquinema temprano contiene dos ejes, uno largo y uno corto que

forma un complejo sináptico de 1,7  $\mu$  de longitud en su extremo común. El eje largo (10,6  $\mu$ ) y el eje corto (4,5  $\mu$ ) corresponden a los cromosomas X-Y respectivamente.

En paquinema tardío el nucléolo principal está completamente formado, en él se distinguen tres zonas características: una granular, una fibrilar y un cuerpo central denso.

No hay ARN detectable histoquímicamente en el par X-Y, como tampoco una relación directa entre la vesícula sexual y el nucléolo.

Los espermatócitos en diplonema se caracterizan porque han desaparecido en el núcleo los complejos sinaptonémicos, existiendo únicamente ejes simples. El par X-Y aún continúa heterocromático.

Los espermatócitos en anafase y metafase se caracterizan por la desaparición de la membrana nuclear. Los cromosomas se observan libres en el citoplasma. Las fibras del huso se observan unidas a los centrómeros.

## REFERENCIAS CITADAS

- Allen, E.  
1918. Studies on Cell Division in the albino rat. Morphol., 31: 133-174
- Amano, M. J.  
1962. Improved techniques for the enzymatic extraction of nucleic acids from tissue sections. J. Histochem., 10: 204-212.
- Clermont, Y.  
1962. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for the renewal of spermatogonia. Am. J. Anat., 111: 111-129.
- Clermont, Y.  
1967. Cinétique de la spermatogénese chez les mammifères. Arch. Anat. Micro. Morph., 56: 7-60
- Clermont, Y., y E. Bustos-Obregón.  
1968. Re-examination of Spermatogonial Renewal in the Rat by Means of Seminiferous Tubules Mounted "in toto". Amer. J. Anat., 122: 237-247.
- Clermont, Y., y C.P. Leblond  
1953. Renewal of spermatogonia in the rat. Amer. J. Anat., 93: 475-502.
- Clermont, Y., y B. Perey  
1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. Amer. J. Anat., 100:241-259.

Clermont, Y., y B. Perey

1967. The states of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. Rev. Canad. Biol., 16: 451-462.

Dym, M., y Y. Clermont

1967. Effects of X rays on type A spermatogonia in the rat. Anat. Pec., 157: 238-253.

Eberle, P.

1964. Comparative studies on sex chromosomes in different species. Genetic., 13: 34-46.

Fawcett, D. W.

1956. The fine structure of chromosomes in the meiotic prophase of vertebrate spermatocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2: 403-406.

Ford, E. H., y D. H. Woollam

1966. The fine structure of the sex vesicle and sex chromosome association in spermatocytes of mouse, golden hamster, and field vole. J. Anat., 100: 787-799.

Grell, R. F., y J. I. Valencia

1964. Distributive paring and anuploidy in man. Science., 145: 66-67.

Koller, P. C., y C. D. Darlington

1934. The genetical and mechanical properties of the sex chromosomes. J. Genet., 29: 159-173.

La Valette, S. T. George Von.

1876. Ueber die Genese der Samenkörper. Arch. Mikr. Anat., 12: 735-758.

Leblond, C.P., y Y. Clermont

1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Ann. N.Y. Acad. Sci., 55: 548-573.

Lenhossek, M. V.

1898. Untersuchungen über Spermatogenese. Arch. Mikr. Anat., 51: 215-318.

Minouchi, O.

1928. Spermatogenesis of the albino rat. Japan J. Zool., 1: 235-256.

Mittwoch, U.

1967. Sex Chromosomes. New York. Academic Press. 246 pp.

Moens, P. B.

1968. The structure and function of the synaptonemal complex in Lilium longiflorum sporocytes. Chromosoma (Berl), 23: 418-451.

Moens, P. B., y F. O. Perkins

1969. Chromosome Number of a Small Protist: Accurate Determination., Science, 166:1289-1291.

Moses, M. J.

1956. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2: 215-218.

Moses, M. J.

1958. The relation between the axial complex of meiotic prophase chromosomes and chromosome pairing in a Salamander (*Plethodon cinereus*). J. Biophys. Biochem. Cytol., 4: 633-638.

Moses, M. J.

1968. Synaptonemal Complex. Ann. Rev. Genetics, 2: 363-411.

Moses, M. J., y J. R. Coleman

1964. Structural patterns and the functional organization of chromosomes. The role of chromosomes in development. Academic Press, New York. 1149 pp.

Ohno, S., W. Kaplan, y R. Kinosita

1956. Concentration of RNA of the heteropycnotic X-Y bivalent of the rat. Exp. Cell. Res., 11: 520-526.

Ohno, S., W. Kaplan, y R. Kinosita

- 1957a. Heterochromatic regions and nucleolus organizer in chromosomes of the mouse, Mus Musculus. Exp. Cell. Res., 13: 358-364.

Ohno, S., W. Kaplan, y R. Kinoshita

- 1957b. Conjugation of the heteropycnotic X and Y chromosomes of the rat spermatocytes. Exp. Cell. Res., 12: 395-397.

Ohno, S., W. Kaplan, y R. Kinoshita

1959. The centromeric and nucleolus-associated heterochromatin of Rattus norvegicus. Exp. Cell. Res., 16: 348-367.

Ortavant, R.

1954. Contribution a l'étude de la durée du processus spermatogénétique du bœuf a l'étude du P 32. C. R. Soc. Biol. Paris., 148: 804-806.

Ortavant, R.

1959. Spermatogenesis and morphology of the spermatozoon. Academic Press. New York, Vol, II.

Pearse, A. G.

1960. Histochemistry. J.&A. Churchill, Ltd. London. 987 pp.

Regaud, C.

1910. Etudes sur la structure des tubes séminifères et sur la spermatogénèse chez les mammifères. Arch. Anat. Microsc., 11: 291-431.

Roosen-Runge, E. C.

1962. The proces of spermatogenesis in mammals. Biol. Rev., 37: 345-377.

Roosen-Runge, E. C., y L. O. Giesel

1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. Amer. J. Anat., 93: 475-502.

Sachs, L.

1955. The possibilities of crossing-over between the sex chromosomes of the house mouse. Genetics., 27: 309-322.

Sjöstrand, F. S.

1967. Instrumentation and techniques. In Electron Microscopy of Cells and Tissues. Academic Press, New York. Vol, I.

Solari, A. J.

1964. The morphology and ultrastructure of the sex vesicle in the mouse. Exp. Cell. Res., 36: 160-168.

Solari, A. J.

- 1969a. Evolution of the ultrastructure of the sex chromosomes (sex vesicle) during meiotic prophase in mouse spermatocytes. J. Ultrastruct. Res., 27: 289-305.

Solari, A. J.

- 1969b. Changes of the sex chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. Genetics, Suppl., 61: 113-120.

Solari, A. J.

1970. The spacial relationships of the X and Y chromosomes during meiotic prophase in mouse spermatocytes. Chromosoma (Berl)., 29: 217-236.

Solari, A. J., y L. Tres

- 1967a. The localization of nucleic acids and the argentaffine substance in the sex vesicle of mouse spermatocytes. Exp. Cell. Res., 47: 86-96.

Solari, A. J., y L. Tres.

- 1967b. The ultrastructure of the human sex vesicle. Chromosoma (Berl). 22: 16-31.

Solari, A. J. y L. Tres

1970. The three-dimensional reconstruction of the X-Y chromosomal pair in human spermatocytes. J. Cell. Biol., (in press, 1970).

Swanson, C. P.

1960. Cytology and Cytogenetics. Prentice-Hall, Inc. 595 pp.

Tjio, J. H., y A. Levan

1956. Note on the sex chromosomes of the rat during male meiosis. Anal. Estac. Exp. Aula Dei., 4: 173-183

Tres, L. L., y A. J. Solari.

1968. The ultrastructure of the nuclei and the Behavior of the sex Chromosomes of Human Spermatogonia. Zellforschung., 91: 75-89.

Ureña, F., y A. J. Solari.

1970. Three-dimensional reconstruction of the X-Y pair during pachytene in the rat (Rattus norvegicus). Chromosoma (Berl)., 30: 258-268.