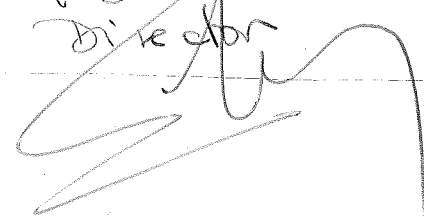


EL COMPLEX SINAPTINÈMIC COM A INDICADOR DE LES ANOMALIES
MEIÒTIQUES. NOVES APORTACIONS A L'ESTUDI DE LA
INFERTILITAT MASCULINA.

Vist i Pleu
J. Egozcue i Cuixart
Director



Memòria presentada per Francesca
Vidal i Domínguez per aspirar al
grau de Doctor en Ciències per la
Universitat Autònoma de Barcelona.

Treball realitzat sota la direcció
del Dr. Josep Egozcue i Cuixart,
Professor Agregat de Biologia
Cel·lular de la Universitat Autònoma
de Barcelona.

Barcelona, setembre 1982



Als meus pares i al meu avi Lluís

AGRAÏMENTS

- Al Dr. Josep Egozcue i Cuixart com a director del grup de Citogenètica, per tot el que d'ell he après, i per la valuosa ajuda rebuda en la direcció d'aquesta tesi.
- Al Dr. Simón Marina, que ha facilitat part del material utilitzat en aquest treball, i a la resta de membres del Centro de Estudios Andrológicos, per la seva amable col·laboració i interès en el treball realitzat.
- Al Departament d'Andrologia de la Fundació Puigvert, especialment al Dr. Pomerol i al Dr. Morer, per les mostres facilitades i la seva cooperació.
- A tots els companys de l'equip de Citogenètica pel seu estímulo durant la realització d'aquesta tesi, especialment a Joaquina Navarro i Cristina Templado, amb les quals he treballat en equip en l'estudi de la infertilitat masculina.
- A tots els companys del Departament de Biologia Cel·lular, especialment a Miriam Guitart per la seva col·laboració en la posada a punt de les tècniques d'estudi de complexos sinaptinèmics amb microscopi òptic.
- A tots els membres de l'Institut de Biologia Fonamental i de l'Institut de Química Bio-orgànica, per l'ambient d'amistat que m'han ofert durant la realització d'aquest treball.

- A l'Organització Mundial de la Salut (O.M.S.) per l'ajut econòmic en el finançament de part del treball presentat.
- A Anna Burset i Maria Eulàlia Palou, per la seva bona disposició, eficiència i amabilitat a l'hora de dur a terme el mecanografiat d'aquest treball.
- A Josep Toda per la correcció del català, i
- A totes aquelles persones que d'una o altra manera han fet possible aquesta tesi, a tots, gràcies.

1. <u>INTRODUCCIO</u>	1
1.1. Aparell reproductor masculí	2
1.1.1. Anatomia	2
1.1.1.1. Testicles	2
1.1.1.2. Vies espermàtiques	4
1.1.2. Histologia del testicle	5
1.1.3. Funció endocrina del testicle	9
1.1.3.1. Funció androgènica	9
1.1.3.2. Secreció estrogènica	9
1.2. Espermatogènesi	11
1.2.1. Procés espermatogènic	11
1.2.2. Cicle de l'epiteli seminífer	18
1.2.3. Ona de l'epiteli seminífer	18
1.2.4. Durada de l'espermatogènesi	20
1.3. Complex sinaptinèmic	24
1.3.1. Estructura del complex sinaptinèmic ..	26
1.3.2. Composició química del complex sinaptinèmic	28
1.3.3. Cicle sinàptic	29
1.3.3.1. Leptotè	30
1.3.3.2. Zigotè	30
1.3.3.3. Paquitè	36
1.3.3.4. Diplotè	43

	<u>pàg.</u>
2.3.4.1.1. Metodologia	73
2.3.4.2.2. Fonaments	75
2.3.4.2. Tinció convencional	75
2.3.4.2.1. Metodologia	75
2.3.4.2.2. Fonaments	76
2.3.5. Tècniques de fotografia	76
2.3.5.1. Microfotografia	76
2.3.5.2. Tècniques de revelat	77
2.3.5.3. Tècniques de positivat	77
3. <u>RESULTATS</u>	79
3.1. Caracterització del nuclis profàsics i cinètica dels complexos sinapteinèmics	80
3.1.1. Identificació dels estadis de la profase	80
3.1.1.1. Leptotè	80
3.1.1.2. Zigotè	82
3.1.1.3. Paquitè	85
3.1.1.4. Diplotè	91
3.1.2. Freqüència dels estadis profàsics ...	93
3.1.3. Identificació i cariotipat dels complexos sinapteinèmics	95
3.2. Estudi de CS en individus infèrtils	99
3.2.1. CS en individus amb cariotip mitòtic normal	102

3.2.1.1.	Individus amb formació normal de CS	102
3.2.1.2.	Individus amb bloqueig meiòtic pre-paquitènic	105
3.2.1.3.	Individus amb anomalies en els CS	105
3.2.1.4.	Individus amb absència total de CS	112
3.2.2.	CS en individus portadors d'anomalies cromosòmiques	112
3.2.2.1.	Formació dels CS en individus portadors de translocacions ...	112
3.2.2.2.	Formació dels CS en la Síndrome de Klinefelter	115
3.3.	Estudi meiòtic cromosòmic en individus infèrtils	119
3.4.	Estudi comparatiu dels resultats meiòtics convencionals i dels complexos sinap-tònemics	123
3.4.1.	Comportament meiòtic normal	123
3.4.2.	Anomalies meiòtiques detectables per l'estudi cromosòmic i de CS	125
3.4.3.	Anomalies meiòtiques detectables tant sols mitjançant l'estudi de CS	126
3.4.4.	Absència de cèl.lules germinals	126

4. <u>DISCUSSIO</u>	130
4.1. Estudi de CS amb microscopi òptic	131
4.2. Comportament meiòtic a profase en indivi- dus-control	133
4.3. Comportament meiòtic a profase en individus infèrtils	136
4.4. Activitat meiòtica en individus infèrtils.. Comparació de les dades meiòtiques conven- cionals i el comportament meiòtic a pro- fase	140
4.5. Comportament meiòtic a profase en indivi- dus portadors de translocacions Robertso- nianes	149
4.6. Pronòstic en individus infèrtils portadors de translocacions Robertsonianes	152
4.7. Protocol d'estudi citogenètic en el baró infèrtil	154
5. <u>CONCLUSIONS</u>	157
6. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	163

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Aparell reproductor masculí

Les cèl.lules reproductores masculines, els espermatozous, es formen en les parets del conductes seminífers de les gònades masculines o testicles. Després aquests es traslladen al llarg de les vies espermàtiques fins el moment de la seva sortida al exterior. El conjunt dels testicles, les vies espermàtiques, un grup de glàndules anexas que aporten secrecions líquides al semen i el penis formen l'aparell reproductor masculí.

1.1.1. Anatomia

En aquest apartat no pretenem tractar en detall l'anatomia de l'aparell reproductor. Ens limitarem, tan sols, a la descripció dels elements relacionats amb l'esterilitat, infertilitat i subfertilitat masculina, que poden ésser directament implicats en el nostre treball.

1.1.1.1. Testicles

Els testicles, en nombre de dos, són els òrgans productors dels espermatozous, i constitueixen al mateix temps una glàndula de secreció interna.

En l'home, cada testicle té forma ovalada, i és aplanat transversalment. El testicle pesa per terme mig 20 gr i té aproximadament 4 cm de llarg per 2,5 cm de gruix i 3 cm d'alçària. No obstant, hi ha variacions importants en funció dels individus estudiats.

Un tall transversal del testicle ens mostra que està envoltat per una membrana fibrosa anomenada albugínea. Aquesta membrana és resistent, inextensible i dóna al testicle el seu color blanc. El seu gruix sol ésser de 1 mm.

Interiorment el testicle és dividit en petits compartiments anomenats lòbuls. Cada lòbul, de forma cònica, és constituït per túbuls seminífers. La longitud d'aquests túbuls, molt sinuosos, varia entre 30 i 80 cm; el nombre és, al menys, de 250 a 300 per testicle (Geep, R.O., 1968; Cohen, J. 1974).

Segons Cohen (1974), els túbuls seminífers tenen un diàmetre que oscil·la entre 170 i 300 μm , i s'originen sota l'albugínia. Una de les característiques d'aquests és que són molt recargolats i apilatonats sobre ells mateixos, com fàcilment es pot imaginar si tenim en compte la seva longitud real (30-80 cm) i la del lòbul que el conté (3 cm com a màxim). Els túbuls s'acaben a la punta de la piràmide de cada lòbul, agrupant-se uns i altres, de manera que es forma un sol conducte de diàmetre menor que el conducte original. Aquesta disposició dóna lloc que cada lòbul sigui quasi independent, ja que les anastomosis interlobulars són molt rares.

1.1.1.2. Vies espermàtiques

Són els conductes excretors de l'esperma. Procedeixen del testicle i, segons Leeson (1967) i Cohen (1974), podem dividir-los en: tubs rectes, rete testis, conductes eferents, conductes epididimaris, conductes deferents, vesícules seminals i conductes ejaculadors.

Els tubs rectes tenen el seu origen en la unió dels túbuls seminífers. Els túbuls seminífers de cada lòbul es reuneixen en un sol conducte que ocupa la posició superior del lòbul. Són molt curts (200-400 μm) i de diàmetre menor que els túbuls seminífers (20-50 μm).

Els tubs rectes es reuneixen en una xarxa de canals que forma un espai cavernós anomenat rete testis.

De la rete testis emergeixen 12 o 14 conductes que reben el nom de conductes eferents, es reuneixen en forma cònica formant els cons vasculosos.

Els conductes eferents, de uns 15 mm de llarg, es fusionen en un conducte únic anomenat conducte epididimari. El conducte epididimari és molt recargolat sobre ell mateix; és tés, pot medir al voltant de 6 m de llarg; té un diàmetre mitjà de 0.3 mm i ocupa uns 5 cm. S'ha demostrat que els espermatozous trets dels túbuls seminífers són completament immòbils i no tenen capacitat de fertilització. És després d'haver estat en l'epididim durant aproximadament 18 h - 10 dies que es desenvolupa el seu poder de motilitat i es tornen capaços de fertilització. Per això s'acostuma a dir que en l'epididim té lloc la maduració dels espermatozous.

La continuació i eixamplament de l'epididim forma el conducte deferent. Aquest conducte té una longitud mitjana de 40 cm, un diàmetre aproximat de 2 mm i acaba en el punt d'unió de les vesícules seminals i el conducte ejaculador. Després de creuar l'urèter, el conducte deferent es dilata en forma de fus i en el seu extrem distal trobem la vesícula seminal. La vesícula seminal és un organ allargat de 5-6 cm de llarg i uns 5 mm de gruix i la seva capacitat és de 4 a 6 ml.

El conducte ejaculador comença a la terminació del conducte deferent i la vesícula seminal. Sol tenir 2 cm de longitud i el seu diàmetre disminueix de dalt a baix (1 mm - 0,5 mm).

1.1.2. Histologia del testicle

En el moment del naixement, els túbuls seminífers són en una fase indeferenciada, el seu diàmetre és petit (50-60 μm), són plens de cèl.lules sense diferenciar, i hi predomina el teixit intersticial. En etapes successives els túbuls seminífers augmenten de diàmetre i sobretot en longitud i comencen a aparèixer algunes espermatogònies. Al voltant dels 11 anys (Cohen, 1974) ja poden veure's espermatogònies i just abans de la pubertat apareixen els espermatòcits II i les espermàtides; és la fase anomenada de maduració de Charny.

En la pubertat els conductes seminífers són més llargs (100-150 μm), l'espermatogènesi s'intensifica i podem trobar alguns espermatozous en la llum dels túbuls.

Un testicle normal i adult mostra, en un tall longitudinal, una multitud de túbuls seminífers, separats entre ells per un teixit conjuntiu intertubular que està format per: cèl.lules indiferenciades, cèl.lules de Leydig i capilars. Segons Cohen (1974) en una biopsia d'un testicle normal, el 80% dels túbuls presenten una espermatogènesi activa. La resta es en estat de repós o d'esclerosi/atròfica.

/Els túbuls seminífers presenten una forma cilíndrica i, com hem dit a l'apartat 1.1.1.1., el seu diàmetre oscil·la entre 170 i 300 μm .

Estudis a microscopia electrònica fets per Vilar i col., (1970) demostren que els túbuls seminífers humans són limitats per una estructura membranosa de 3-6 μm de gruix, formada per dues parts: una capa interna, que és una estructura laminar fina de 1 a 2 μm , làmina basal, que presenta prolongacions cap a les cèl.lules de l'epiteli germinal, i una capa més externa, anomenada túnica pròpia, que és molt més densa i gruixuda i és composta per cèl.lules planes i fibres de col.lagen i connecta amb el teixit intersticial.

Clermont (1958) suggerí que aquestes cèl.lules eren de tipus contràctil i responsables de les contraccions dels túbuls. Segons Dym i Fawcett (1970) aquestes cèl.lules peritubulars o cèl.lules mioïdes formen una barrera que tan sols pot ésser travessada a nivell dels intersticis oblics que hi ha entre elles, i permetent així el pas de substàncies des del teixit intersticial fins a les cèl.lules de Sertoli o les cèl.lules germinals.

Interiorment, podem veure en els túbuls seminífers dos tipus de cèl.lules: les de Sertoli i les cèl.lules germinals.

Les cèl.lules de Sertoli, fàcilment diferenciables, presenten un nucli oval, de 9 a 12 μm de diàmetre, i un citoplasma molt abundant. Són separades, les unes de les altres, per diferents capes de cèl.lules germinals.

Segons Bustos-Obregon (1975) les cèl.lules de Sertoli queden com elements permanents, sense dividir-se. Aquestes cèl.lules tindrien diferents missions durant l'espermatogènesi i podrien ésser relacionades amb: l'arquitectura de l'epiteli seminífer, els intercanvis metabòlics entre les cèl.lules germinals (i per tant tindrien un cert paper en el trofisme de les cèl.lules), certs aspectes de la coordinació de l'espermatogènesi i una activitat secretora endocrina que encara no està del tot rigorosament demostrada.

Les cèl.lules germinals estan en contínua transformació. Des de les espermatogònies, que són les que es troben més externament, fins als espermatozous, els més propers a la llum del túbul, els elements cel.lulars que apareixen successivament són:

1 - espermatogònies: tenen una forma arrodonida o poligonal, bastant grosses (10-15 μm) i amb un nucli petit. Clermont (1966) descriu tres tipus d'espermatogònies en l'espècie humana: espermatogònies A tipus pàlid, espermatogònies A tipus obscur i espermatogònies B. La seva diferenciació és deguda principalment a característiques del nucli

- 2 - espermatòcits primaris: són cèl.lules més grosses (18-20 μm), amb un nucli de mida considerable i citoplasma granulat
- 3 - espermatòcits secundaris: cèl.lules petites (8-11 μm), nucli petit, arrodonit i vesiculat. El citoplasma és fi
- 4 - espermatides: elements petits i arrodonits. El seu nucli és voluminós, en relació a la mida total de la cèl.lula, prop de la llum del túbul. Són l'origen de les transformacions que tindran lloc fins a la formació dels espermatozous.
- 5 - espermatozous madurs: que són alliberats als conductes, en paquets i que no se separaran fins arribar a l'epidídim. Són cèl.lules dotades de un llarg flagel, que té aproximadament 60 μm de llarg. Podem diferenciar-hi:
 - el cap, que transporta la informació genètica, de 4 a 5 μm de llarg i 2 μm de gruix
 - una peça intermèdia de 4 a 5 μm
 - la cua, d'aproximadament 45 μm de longitud i important per la motilitat de l'espermatozou.
 - una peça terminal de 1 a 2 μm .

1.1.3. Funció endocrina del testicle

1.1.3.1. Funció androgènica

La funció androgènica depèn del teixit intersticial intertubular i més concretament de les secrecions de les cèl.lules de Leydig.

Les cèl.lules de Leydig apareixen en el segon més de la vida embrionària i, a partir del 5è dia després del naixement, té lloc una desdiferenciació d'aquestes cèl.lules, que perden la seva activitat (Cohen, 1974). En el moment de la pubertat, les cèl.lules de Leydig reapareixen, o millor dit es rediferencien, i s'inicia la secreció de testosterona que va elevant la seva taxa progressivament, fins que aconsegueix la de l'home adult. En condicions normals, aquesta taxa de secreció de testosterona varia entre 4 i 7 mgr/dia i la seva concentració en plasma oscil.la entre 5 i 8 mcg/litre.

La testosterona, hormona esteroide, és necessària per al desenvolupament puberal i per al manteniment dels òrgans genitals masculins i té una intervenció directa sobre l'espermatogènesi.

1.1.3.2. Secreció estrogènica

Segons Cohen (1974) la possible existència d'aquesta secreció secundària es basa en el fet que la testosterona per ella mateixa no és capaç de suplir la funció testicu-

lar d'un animal castrat.

Golzieher (1952) ja va identificar l'existència d'estrògens en el testicle humà. No obstant es discuteix quin pot ésser el paper real d'aquests estrògens i quina és la regió del testicle que els secreta. Alguns autors suposen que és a nivell de les cèl.lules de Leyding, mentre que d'altres suposen que és en les cèl.lules de Sertoli.

1.2. Espermatogènesi

1.2.1. Procés espermatogènic

Es defineix l'espermatogènesi com el conjunt de processos de diferenciació cel·lular, que comencen en la pubertat sota acció hormonal, en els quals a partir de les espermatogònies s'arriben a obtenir cèl·lules tan especialitzades com els espermatozous (figs. 1 i 2).

D'ençà que Regaud (1901) va aportar les primeres descripcions acurades de l'espermatogènesi, són nombrosos els treballs que s'han fet per poder arribar a esbrinar les característiques dels processos que tenen lloc en els túbuls seminífers.

Clermont (1977) divideix l'espermatogènesi en tres fases diferents:

- la primera fase implica la divisió de les espermatogònies fins que arriben a espermatòcits tot mantenint la seva reserva
- la segona fase implica els espermatòcits primaris i secundaris que, mitjançant la meiosi, donaran lloc a les espermatides
- i la tercera, referent a les transformacions citològiques complexes de les espermatides fins a arribar a espermatozous, anomenada espermiogènesi.

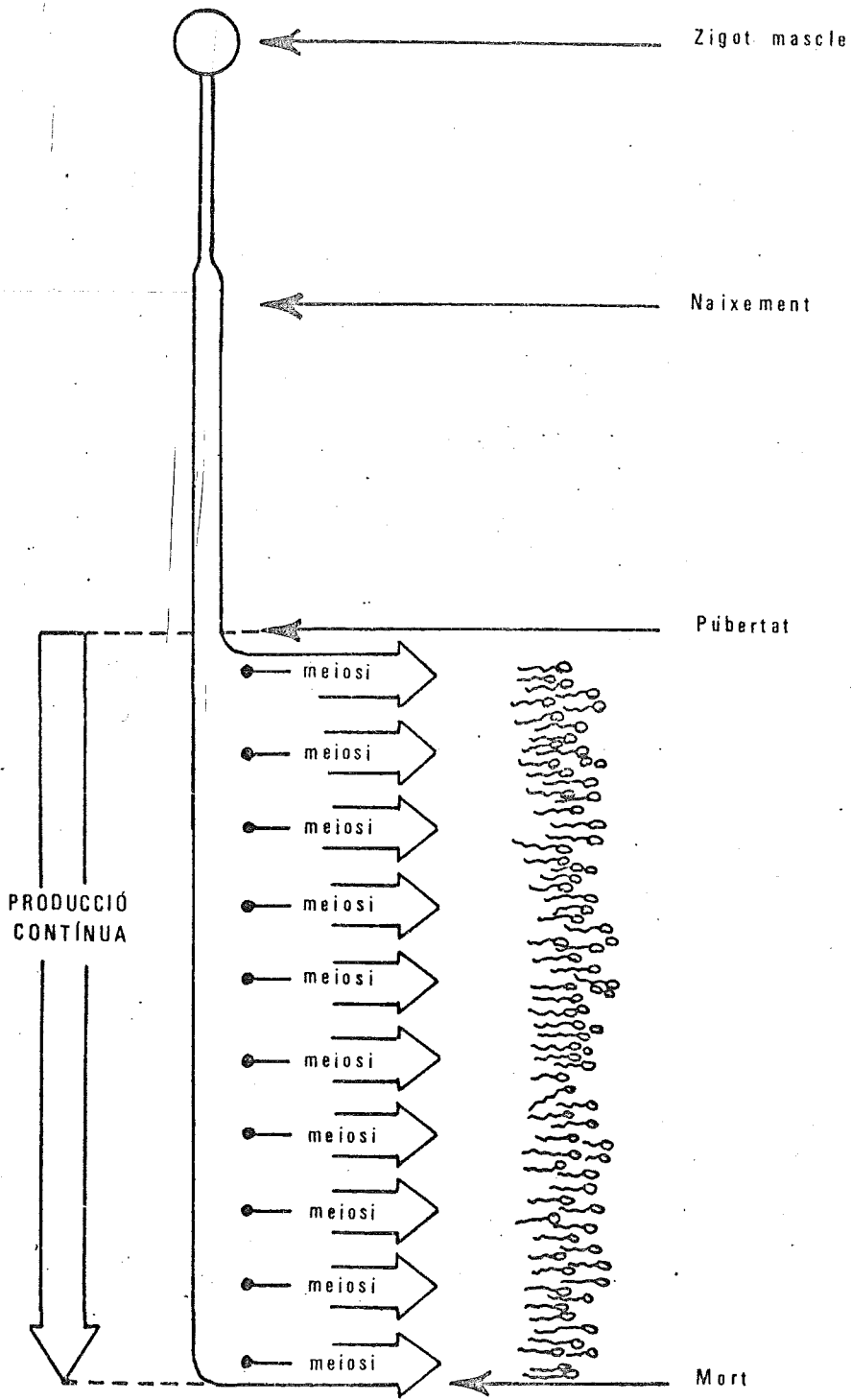


Figura 1.- Esquema de l'espermatogènesi.

En l'home s'han descrit tres tipus d'espermatogònies: tipus A obscur (Ad), tipus A pàlid (Ap) i tipus B. Totes elles presenten, una dotació cromosòmica diploide de 46 cromosomes i són situades a la zona basal dels túbuls seminífers, limitades per la membrana basal dels túbuls i de cantó amb cèl.lules de Sertoli. Durant molt de temps va ésser un enigma com aquestes cèl.lules es diferenciaven, quines eren precursors de les altres i, sobre tot, com podien continuar renovant-se.

Segons Clermont (1972, 1977), en l'espècie humana, les espermatogònies de tipus A obscur (Ad) formarien la anomenada línia germinal de reserva, dividint-se periòdicament per mitosi. D'aquestes mitosis algunes donarien lloc a cèl.lules Ad, renovant-se a elles mateixes, i d'altres divisions durien a terme la producció de cèl.lules del tipus A pàlid (Ap). La formació de les cèl.lules Ap seria un procés irreversible i no podrien tornar a donar espermatogònies Ad.

Aquestes espermatogònies tipus A pàlid, mitjançant una nova divisió mitòtica, donarien lloc a les espermatogònies tipus B. Com resultat de la divisió mitòtica de les espermatogònies B, es formen els espermatòcits primaris que queden en interfase.

Els espermatòcits primaris segueixen la seva diferenciació i entren en meiosi. La meiosi és un tipus especialitzat de divisió cel.lular, restringit a la formació de gamets, en la qual tenen lloc dues divisions cel.lulars successives amb una sola síntesi de DNA prèvia.

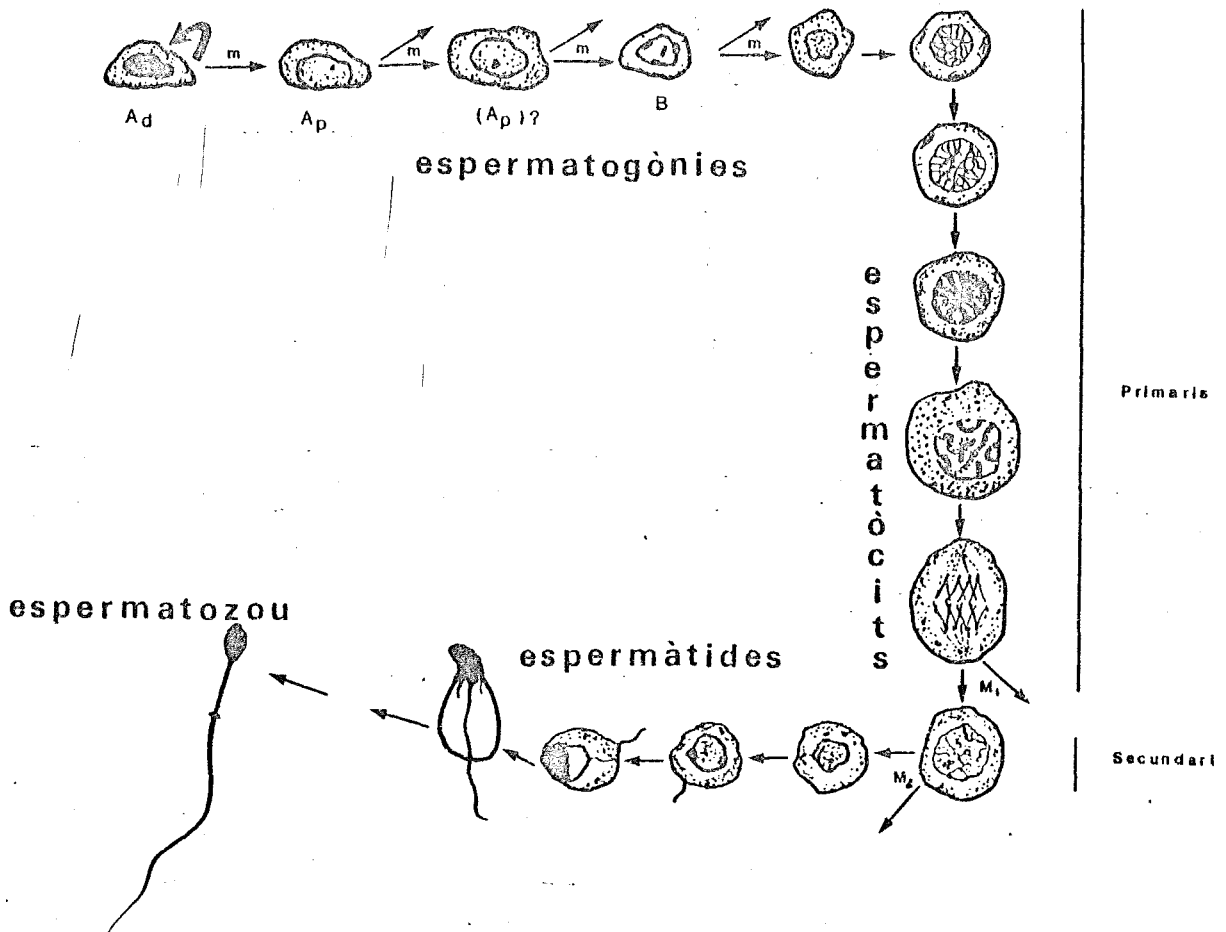


Figura 2.- Procés espermatogènic en l'home.

Ad: espermatogònies tipus A obscur;

Ap: espermatogònies tipus A pàlid;

B: espermatogònies tipus B;

m: divisió mitòtica;

M₁: primera divisió meiótica;

M₂: segona divisió meiótica.

Un cop ha tingut lloc la síntesi de DNA s'inicia la Profase de la primera divisió meiòtica. Aquest és l'estadi més llarg de tot el procés meiòtic, i segons Heller i Clermont (1964) tindria una durada de 23 dies. Al llarg d'aquest període té lloc l'aparellament cromosòmic, la recombinació gènica i la formació de quiasmes. Amb un microscopi òptic, podem diferenciar-ne 5 etapes:

- a) Leptotè: la cromatina adopta una textura filamentosa i els cromosomes comencen a observar-se, però en forma molt extensa, desespiralitzats i sense poder ser identificats.
- b) Zigotè: els cromosomes homòlegs comencen el seu aparellament i presenten les seves puntes o telòmers enganxats a una zona de la membrana nuclear, adoptant un aspecte anomenat en "ram". Els cromosomes sexuals es diferencien de la resta formant la denominada vesícula sexual. Al llarg de tota aquesta etapa els cromosomes es van condensant progressivament.
- c) Paquitè: segons Heller i Clermont (1964) aquesta és la etapa més llarga de tota la profase, la seva durada en l'home es considera que és de 16 dies.

Els cromosomes homòlegs apareixen completament aparellats, presenten un aspecte més compactat i poden arribar a ésser identificats utilitzant diferents criteris, com longitud relativa, posició del centròmer (Hungerford y col., 1972), associació d'acrocèntrics amb el nuclèol (Ferguson-Smith, 1964), nombre i distribució de cromòmers (Hungerford i col., 1971a i b) i més recentment la utilització de bandes G que permet identificar cada un dels 22 bivalents autosòmics i establir un patró de bandes (Luciani i col., 1975).

En aquesta etapa té lloc l'intercanvi genètic o "crossing-over" encara que aquest fenomen no es visible amb el microscopi òptic ni amb l'electrònic.

d) Diplotè: els cromosomes continuen la seva espirilització progressiva i comencen a desaparellar-se, i queden enganxats tan sols pels anomenats punts de quiasme. Cada quiasma vist a diplotè representaria un punt on ha tingut lloc un "crossing-over" a paquitè.

La vesícula sexual desapareix i es diferencien els cromosomes sexuals associats pels seus extrems.

d) Diacinesi: en aquesta etapa té lloc la terminalització de quiasmes (migració dels quiasmes cap als telòmers). (Darlington, 1932; Sybenga, 1975; Maguire, 1979). Actualment comença a posar-se en dubte si realment es dona aquesta migració o si és aparent i deguda tan sols a la condensació progressiva dels cromosomes (Hultén, 1974; Chandley y col., 1976; Laurent y col., 1977; Jones, 1978).

Després de l'etapa de diacinesi, la membrana nuclear comença a desaparèixer i s'arriba a l'estadi de Metafase I en el qual els cromosomes, en la placa equatorial, formen la típica imatge metafàsica. Durant l'Anafase I els cromosomes homòlegs migren cap als pols contraris de la cèl.lula i en la Telofase I es reconstitueixen els dos nuclis fills.

Com a resultat de la primera divisió meiótica s'obtenen dues cèl.lules filles o espermatòcits secundaris. Aquestes cèl.lules ja presenten una dotació haploide de cromosomes: 22 autòsomes i un cromosoma sexual X o Y.

Els espermatòcits secundaris poden presentar o no una curta interfase, sense síntesi de DNA, i inicien la segona divisió meiótica. Aquesta meiosi II és bàsicament una divisió mitòtica, amb les fases típiques de tota divisió cel·lular (pro-, meta-, ana- i telofase II).

Per tant, i com a conseqüència de la meiosi, d'una cèl·lula amb una dotació cromosòmica diploide (espermatòcit primari), n'obtenim quatre amb un nombre haploide de cromosomes (espermatides).

Tant els espermatòcits com les espermatides són situats molt més internament i més a prop de la llum del túbul que les espermatogònies. Clermont (1977) postula que són les cèl·lules de Sertoli les que aixequen els espermatòcits. Per tant, de certa manera condicionen l'ambient en què es diferenciaran les espermatides.

A partir d'aquí les espermatides inicien una sèrie de transformacions cel·lulars fins a convertir-se en espermatozous. Durant aquest complicat procés, anomenat espermiogènesi, no hi ha cap tipus de divisió cel·lular; tan sols hi podem veure canvis de forma i mida que indiscutiblement són l'expressió morfològica dels complexos mecanismes bioquímics que tenen lloc a les cèl·lules.

La diferenciació de les espermatides té lloc en estreta associació amb les cèl·lules de Sertoli, encara que actualment no es coneix amb exactitud quin tipus d'efecte poden tenir aquestes cèl·lules sobre l'espermatogènesi.

1.2.2. Cicle del epiteli seminífer

En l'estudi de talls transversals de l'epiteli seminífer de mamífers, s'observa la aparició repetida de combinacions de cèl.lules en certes etapes de l'espermatogènesi (Clermont, 1963). Aquestes associacions cel.lulars tenen una composició fixa i coneguda per a cada espècie estudiada. Per exemple, les espermàtides són sempre associades amb el mateix tipus d'espermatòcit i d'espermatogònia.

Si analitzem una àrea d'un túbul seminífer, podem veure que les associacions cel.lulars són les etapes o estadis de un cicle anomenat cicle de l'epiteli seminífer. El cicle de l'epiteli seminífer és un procés histològic dinàmic, el nombre d'aquests estadis en un cicle és constant per a cada espècie estudiada i els estadis es succeïxen l'un a l'altre.

En l'home, s'han classificat les associacions cel.lulars en 6 estadis (fig. 3) (Clermont, 1963; Heller i Clermont, 1964).

1.2.3. Ona de l'epiteli seminífer

En la majoria d'animals estudiats, amb l'excepció de l'home, una associació cel.lular determinada ocupa una longitud o segment del túbul seminífer (Perey y col., 1961). Cada segment correspon a una etapa del cicle i els segments es disposen al llarg del túbul d'acord amb

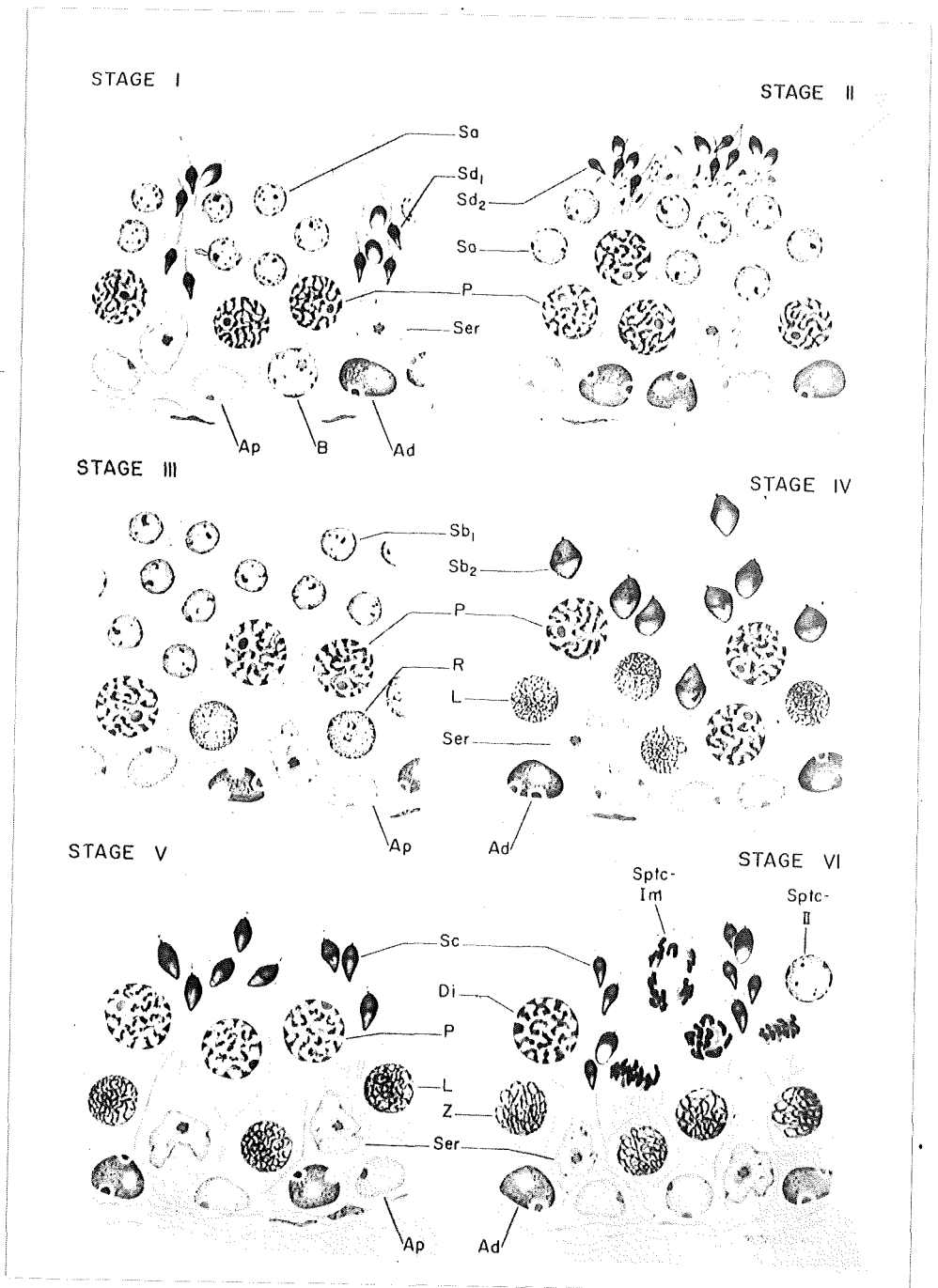


Figura 3.- Esquema que representa la composició cel·lular i les sis associacions cel·lulars en els túbuls seminífers humans. Aquestes associacions corresponen als diversos estadij del cicle, assenyalats per xifres romanes I - VI. Ser: nucli de Sertoli; Ap i Ad: espermatogònies pàlides i obscures tipus A; B: espermatogònies tipus B; R: espermatòcits en interfase; L: espermatòcits primaris en leptotè; Z: espermatòcits primaris en zigotè; P: espermatòcits primaris en paquitè; Di: espermatòcits primaris en diplotè; Sptc-Im: espermatòcits primaris en divisió; Sptc-II: espermatòcits secundaris en interfase; Sa, Sb, Sc, Sd, espermatides en diferents estadij de l'espermioquèsi (Clermont, 1963).

un ordre successiu i aquesta ordenació dels estadis cel·lulars rep el nom d'ona de l'epiteli seminífer.

En l'home, sembla no existir aquesta distribució especial (Heller i Clermont, 1964). Els segments no són marcats amb tanta exactitud i el trobar 3 o més estadis en una secció transversal d'un túbul acostuma a ésser freqüent. Podríem doncs, afirmar que els estadis formen un mosaic, on cada segment ocupa només una porció de la circumferència del túbul (fig. 4), i per tant que en l'home no existeix una ona de l'epiteli seminífer propiament dita.

1.2.4. Durada de l'espermatogènesi

Heller i Clermont (1964), mitjançant marcadors radiactius i mètodes autoradiogràfics, varen determinar la durada de cada un dels sis estadis del cicle de l'epiteli seminífer humà (fig. 5). Cada estadi té una durada determinada, alguns tan sols hores i d'altres dies sencers, i aquestes dades són constants per a les espècies fins ara estudiades.

La durada d'un cicle complet s'obté sumant la durada de cada un dels estadis que el formen. Perquè tingui lloc un cicle complet de l'epiteli seminífer humà fan falta 16 ± 1 dies.

La durada de l'espermatogènesi és l'interval entre l'aparició d'unes espermatogònies determinades i l'alliberació dels espermatozous que es produeixen a partir d'elles.

En l'home, són necessaris aproximament 4.6 cicles; per

tant es considera que la durada de l'espermatogènesi és de 74 ± 4 dies (Heller i Clermont, 1964).

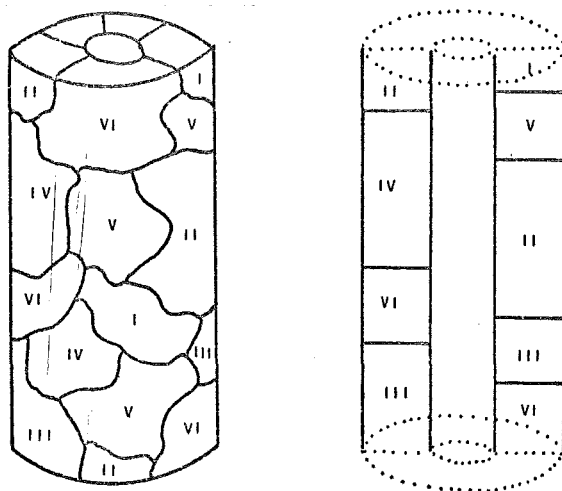


Figura 4.- a) Representació esquemàtica d'una porció de túbul seminífer humà. b) en un tall longitudinal. Podem veure la distribució a l'atzar i tipus mosaic de les 6 diferents associacions cel·lulars descrites. (Heller i Clermont, 1964).

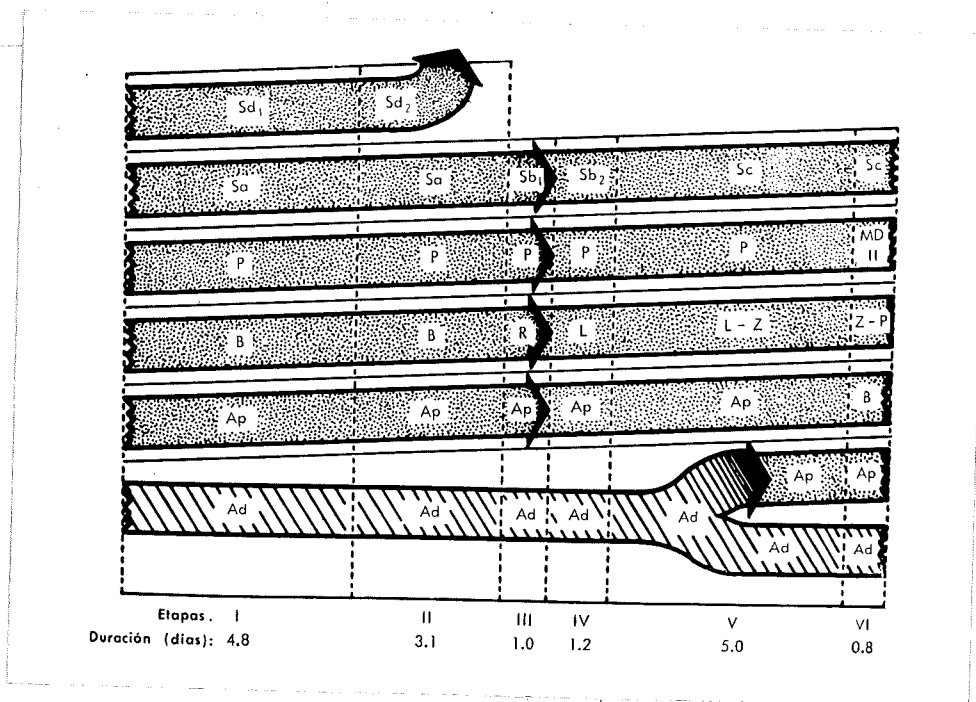


Figura 5.- Representació de la durada de l'espermatogènesi humana. Les fletxes inferior i superior representen l'inici i el final de l'espermatogènesi; les altres indiquen el sentit del desenvolupament cel·lular; Ad i Ap: espermatogònies tipus A obscur i A pàlid; B: espermatogònia tipus B; R: espermatòcit en interfase; L: espermatòcit en leptotè; Z: espermatòcit en zigotè; P: espermatòcit en paquitè; MD: divisió meiótica; II: espermatòcit secundari; Sa, Sb, Sc, Sd, Sd₂: espermàtides en diferents etapes de l'espermiogènesi. (Heller i Clermont, 1964).

1.3. Complex sinaptinèmic

La sinapsi cromosòmica, que té lloc al llarg de la Profase I, és una de les accions més importants observables microscòpicament en la meiosi.

La importància de l'aparellament cromosòmic en la formació de gamets equilibrats es posa de manifest en mutants asinàptics en els quals només en podem veure d'univalents a la metafase I (Baker i col., 1976; Solubovskaya, 1979) i per tant el resultat de la meiosi és la formació de gamets cromosòmicament anormals. Aquests gamets no equilibrats acostumen a ésser inviàbles, però en cas de ser-ho sempre provoquen una reducció en la fertilitat de l'individu afectat.

Per altra banda, la recombinació gènica, mitjançant l'intercanvi recíproc de segments de DNA, requereix la ruptura i reunió de cromàtides homòlogues que seria totalment impossible sense la sinapsi cromosòmica.

Tenint en compte la importància de l'aparellament cromosòmic en el procés meiótic, és lògica l'existència de mecanismes implicats a assegurar una correcta sinapsi de bivalents. Amb l'excepció dels organismes haploids i dels diploids amb comportament asinàptic (Drosophila mascle i altres dípters mascles), l'aparellament cromosòmic apareix lligat a una estructura anomenada complex sinaptinèmic (CS) i se'l considera la base estructural necessària perquè tinguin lloc la sinapsi de cromosomes homòlegs i la recombinació gènica.

Segons Stern i Hotta (1973), el complex sinaptinèmic funcionaria com una estructura estabilitzadora que facilitaria l'aparellament cromosòmic i, per tant, indirectament, seria el responsable que es portés a terme correctament la doble finalitat de la meiosi:

- a) la reducció a la meitat del nombre de cromosomes, a fi de mantenir constant el nombre cromosòmic en l'espècie, i
- b) l'intercanvi de material genètic entre cromosomes homòlegs per assegurar una certa variabilitat als individus.

El complex sinaptinèmic va ésser descrit per primer cop per Moses (1956) en espermatòcits de gambes i posteriorment s'ha demostrat que la seva presència és pràcticament generalitzada en la majoria d'espècies estudiades (Gillies, 1975).

En espermatòcits humans, el complex sinaptinèmic s'ha estudiat essencialment amb el microscopi electrònic. En un principi la majoria d'informació provenia de seccions seriades dels nuclis a estudiar i de la posterior reconstrucció tridimensional (Solari i Tres, 1970; Holm i Rasmussen, 1977; Rasmussen i Holm, 1978, 1980); més tard el desenvolupament per part de Counce i Meyer (1973) de tècniques d'extensió va permetre l'estudi de nuclis sencers d'espermatòcits humans (Moses i col., 1975; Moses, 1977a; Solari, 1980).

Recentment Fletcher (1979) i Pathak i Hsu (1979) han descrit tècniques per a l'observació de complexos sinaptinèmics amb microscopi òptic, encara que aquests estudis han estat fins ara molt limitats.

1.3.1. Estructura del complex sinaptinèmic

Diferents estudis amb microscopi electrònic de nuclis paquitènics han demostrat que la morfologia del complex sinaptinèmic és bàsicament la mateixa en totes les espècies estudiades (Moses, 1968, 1969; Solari i Tres, 1970; Wettsstein i Sotelo, 1971; Solari i Moses, 1973; Solari, 1974;).

El complex sinaptinèmic és una estructura tripartida, formada per dos elements laterals i un element central, que s'estèn al llarg de tot el bivalent cromosòmic (fig. 6).

Els elements laterals del complex, íntimament associades amb les fibres de cromatina dels cromosomes homòlegs, són estructures denses als electrons, amb un gruix que varia entre 300-400 Å, separats l'un de l'altre per una distància de 1100-1200 Å. L'element central, situat al mig d'aquesta regió té un gruix de 100-300 Å i és connectat als elements laterals mitjançant fibres transversals que donen un aspecte estriat a la zona central del complex.

L'element central acaba 500 Å abans de connectar amb la membrana nuclear (Holm i Rasmussen, 1977), mentre que els elements laterals són associats a la zona interna de l'embolcall nuclear formen expansions anomenades plaques terminals (Moses, 1977).

Els cinetocors dels bivalents es veuen fusionats en una sola regió i apareixen com una modificació dels elements laterals, de forma arrodonida i una mida aproximada de 0.3-0.4 µm (Counce i Meyer, 1973; Moses i col., 1975).

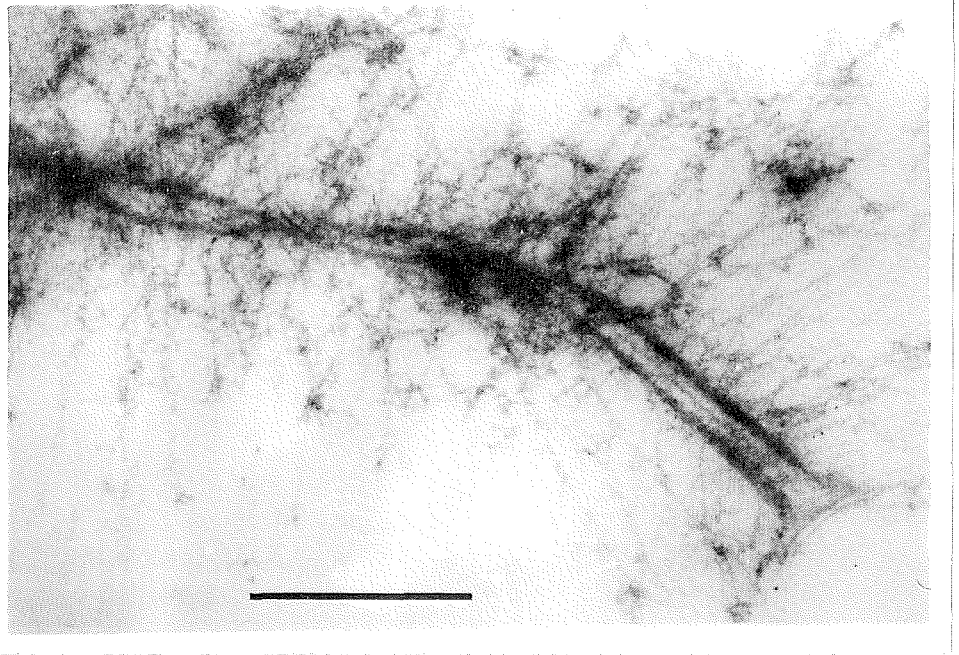


Figura 6.- Complex sinaptinèmic, vist amb microscopi electrònic, de hamster siri. Les fibres de cromatina irradien dels elements laterals del CS. Podem diferenciar clarament l'element central, els filaments transversals i la placa terminal adossada a la membrana nuclear. (Moses i Solari, 1976).

Recents estudis de Walmsley i Moses (1981), mitjançant l'aïllament de complexos sinaptinèmics de hamster, han demostrat que els elements estructurals del CS (elements laterals, element central, filaments transversals, regió del cinetocor, plaques terminals, etc ...) es mantenen intactes. Això ens demostra que el complex sinaptinèmic és una estructura estable i durable encara que l'aïllem de la matriu nuclear, i que realment aquestes estructures en són part integral.

1.3.2. Composició química del complex sinaptinèmic

El complex sinaptinèmic és compost principalment per proteïnes: Els elements laterals per proteïnes no histones riques en arginina (Moses, 1968) i l'element central per altres components proteics de diferent solubilitat i sensibilitat enzimàtica (Solari, 1972; Solari i Moses, 1973).

De Martino i col. (1980), mitjançant tècniques immunoquímiques, han descrit la presència de proteïnes contràctils, tipus actina-miosina, com a constituents del complex sinaptinèmic. La miosina es detecta a la regió central del complex, incluent els microfilaments transversals i l'element central, mentre que l'actina es localitza a la zona interna de la membrana nuclear. El punt de contacte de les dues proteïnes donaria lloc a la placa terminal del complex.

No s'ha detectat la presència de DNA al complex sinaptinèmic (Coleman i Moses, 1964; Moses, 1968; Comings i Okada, 1970; Westergaard i Wettstein, 1972; Solari i Moses, 1973).

però sí un component sensible a la DNasa, de 65 Å de gruix, localitzat en els elements laterals (Solari, 1972).

Es contradictori el contingut en RNA del complex. Alguns autors el descriuen com a component dels elements laterals i central (Esponda i Stockert, 1971), mentre d'altres estudis demostren que no es detecta cap tipus d'àcid nucleic en el complex (Coleman i Moses, 1964; Mòses, 1969) i que aquest és inalterable mitjançant el tractament amb RNasa (Comings i Okada, 1970).

1.3.3. Cicle sinàptic

La formació del complex sinaptinèmic al llarg de la profase meiótica és molt similar en totes les espècies estudiades. En espermatoïcits humans, la formació seqüencial del complex ha estat estudiada amb microscopi electrònic per diferents autors (Moses i col., 1975; Holm i Rasmussen, 1977; Moses, 1977a; Rasmussen i Holm, 1978; Rasmussen i Holm, 1980) i s'ha intentat caracteritzar cada estadi de la profase per una determinada estructura del complex sinaptinèmic. En els apartats següents s'estudia la profase meiótica sota el punt de vista de l'evolució del complex sinaptinèmic en cada un dels estadis.

1.3.3.1. Leptotè

L'estadi de leptotè es caracteritza per l'inici de formació dels elements laterals del complex sinapinèmic entre les cromàtides de cada cromosoma homòleg (fig. 7) (Holm i Rasmussen, 1977; Rasmussen i Holm, 1978). Aquests elements laterals són d'aspecte difús, difícils d'observar i impossibles d'identificar individualment.

Alguns dels telòmers es veuen enganxats a la membrana nuclear i distribuïts a l'atzar. Possiblement l'organització dels elements laterals comença per aquesta zona telomèrica, però aquest és un procés molt ràpid i difícil de seguir.

Segons Rasmussen i Holm (1980), en l'espècie humana no existeix un "leptotè ple" on es veurien tots els elements laterals formats sense que s'iniciï la formació del CS, sinó que els elements laterals es completen en l'estadi de zigotè.

1.3.3.2. Zigotè

Al microscopi electrònic aquest estadi es caracteritza per la presència de fragments de CS ja formats, elements laterals que s'estan formant i elements laterals individualitzats (Moses i col., 1975). A mida que avança aquest estadi el nombre de complexos formats va augmentant i els elements laterals no aparellats van apareixent continus i

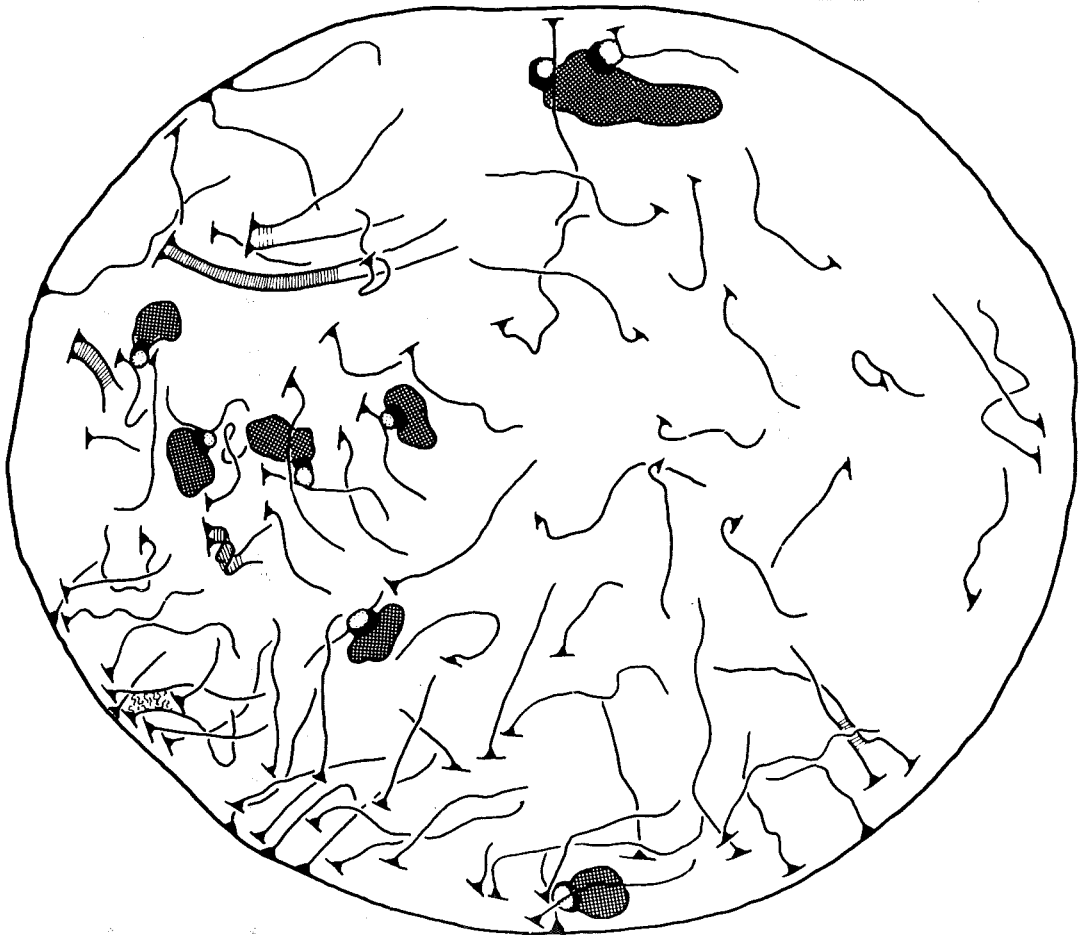


Figura 7.- Reconstrucció d'un nucli d'espermatòcit primari a l'estadi de leptotè. La formació del complex sinaptinèmic s'ha iniciat en 5 cromosomes. Els elements laterals apareixen incompletament formats i alguns telòmers apareixen ancorats a la membrana nuclear. (Rasmussen i Holm, 1978).

fàcilment distingibles. La designació de zigotè primerenc o tardenc depèn del predomini d'elements laterals individualitzats o de complexos complets respectivament (figs. 8,9). Podem per tant definir aquest estadi com un aparellament incomplet.

Els telòmers, ancorats a la membrana nuclear, estan situats preferencialment en una zona determinada de la membrana, formant una típica figura del zigotè anomenada "en ram" (figs. 8, 9).

Sembla ser que en algunes espècies s'ha demostrat una associació o alineació dels cromosomes homòlegs, abans de la formació del CS (Riley i Law, 1965; Maguire, 1977). En espermatòcits humans estudiats a la transició entre leptotè i zigotè, els telòmers homòlegs, així com els organitzadors nucleolars, estan distribuïts a l'atzar en el nucli (Rasmussen i Holm, 1978); fins i tot a zigotè tardenc no es veu cap tipus d'associació. Per tant, sembla que la idea de una aliniació prèvia de cromosomes homòlegs, si més no en l'espècie humana, no és dóna.

El nombre de punts d'inici de formació del complex per bivalent, en espermatòcits humans, varia entre 1 i 2. Aquest inici té lloc en les regions telomèriques i tan sols en algun cop es veu algun inici de formació intersticial (Rasmussen i Holm, 1978).

El primer pas per a la formació del complex sinaptinèmic seria l'aliniació dels telòmers homòlegs, probablement deguda a moviments de l'embolcall nuclear (Solari, 1971; Comings i Okada, 1972), seguit de l'inici de formació dels elements laterals i l'aparició d'un agregat fibrillar entre ells. Aquest agregat fibrillar és considerat el pre

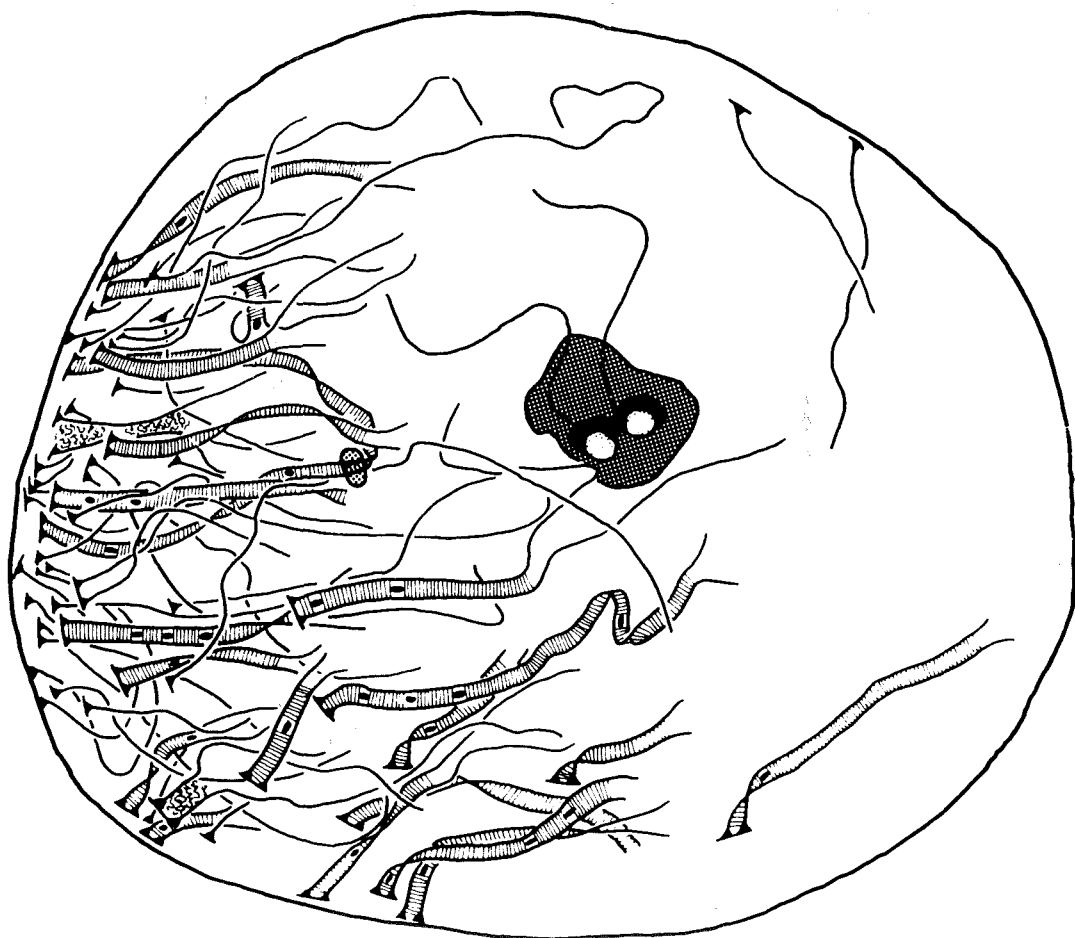


Figura 8.- Reconstrucció d'un nucli en zigotè primerenc. Podem veure-hi l'aparellament asincrònic i la distribució en "ram" dels CS. Dos telòmers de dos organitzadors nucleolars estan al mig del nucli. Els elements laterals que encara no han començat a aparellar-se presenten els seus telòmers ancorats a la membrana nuclear i propers. Els nòduls de recombinació són representats pels punts negres a la zona interior del CS. (Rasmussen i Holm, 1978).

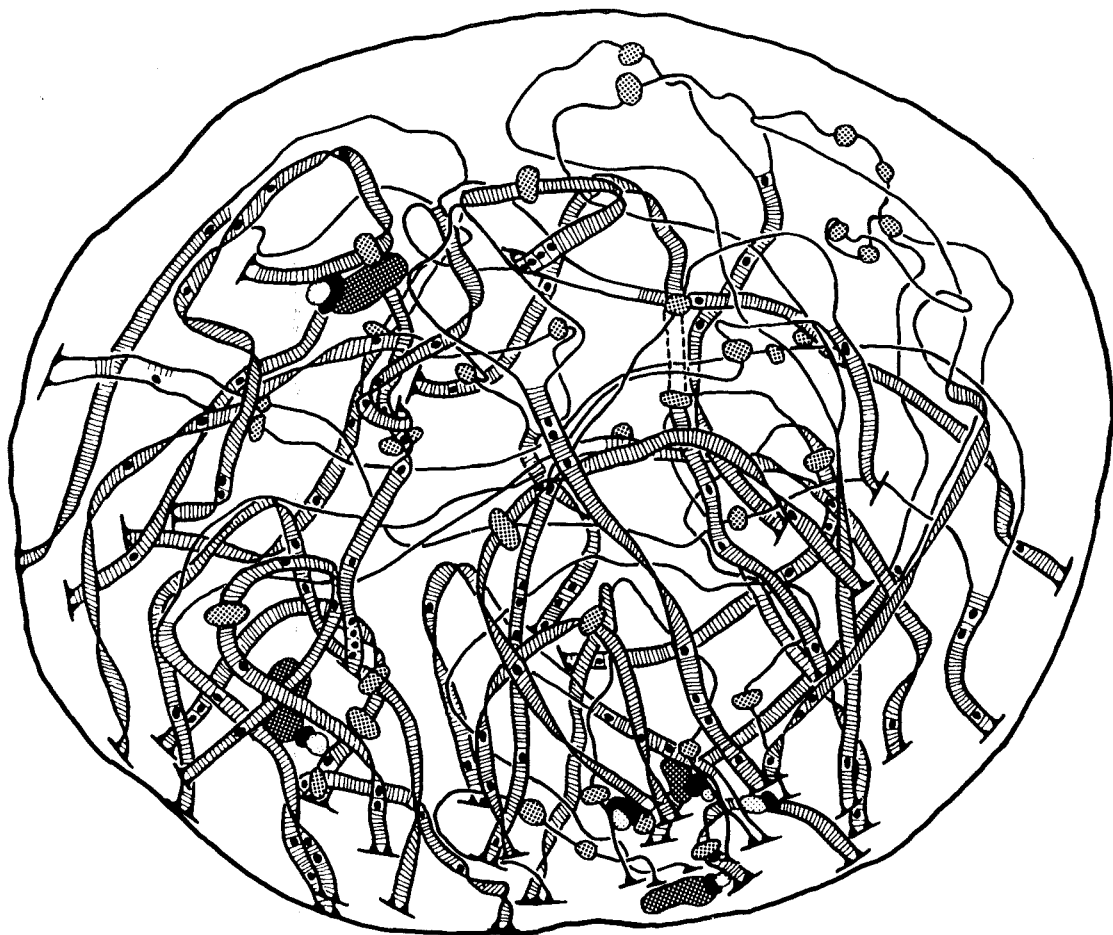


Figura 9.- Reconstrucció d'un nucli en zigotè tardenc. La majoria dels complexos sinaptinèmics són formats. Continua la disposició en "ram" i els nòduls de recombinació són molt nombrosos. La cromatina centromèrica és representada per les zones puntejades d'intensitat intermèdia. (Rasmussen i Holm, 1978).

cursor de l'element central i comença a formar-se quan els elements laterals es troben separats per aproximadament 2000-3000 Å. L'element central comença a fer-se visible en el moment en què la distància entre elements laterals passa a ser de 1000-1200 Å (Gillies, 1975; Rasmussen i Holm, 1978).

L'aparellament cromosòmic i la formació del complex sinap-tinèmic és un procés totalment asincrònic i en un zigotè tardenc podem trobar-hi complexos íntegrament formats i d'altres que encara s'estan iniciant.

Segons Rasmussen i Holm (1980) els primers a aparellar-se són els cromosomes curts no acrocèntrics, possiblement perquè els moviments dels seus telòmers en la membrana nuclear són més fàcils per la seva mida que els dels llargs. Per altra banda quasi sempre els últims a formar CS són els braços curts dels acrocèntrics i les regions centromèriques dels cromosomes no acrocèntrics. En aquest estadi s'observen nombrosos elements laterals no homòlegs enllaçats. El percentatge de nuclis que presenten un o més CS enllaçats és del 60% (Rasmussen i Holm, 1980). Per contra, el nombre d'entrellaçaments a paquitè varien entre 4.8% - 9.5% (Rasmussen i Holm, 1978; Holm i Rasmussen, 1977), per la qual cosa cal suposar que hi ha algun tipus de mecanisme fins ara desconegut que durant la transició de zigotè a paquitè resol aquests enllaçaments.

En tot l'estadi de zigotè, els eixos dels cromosomes sexuals XY, no poden ésser diferenciats de la resta d'elements laterals no aparellats ni pel seu gruix ni cap aspecte especial (Moses i col., 1975; Rasmussen i Holm, 1978; Solari, 1980). Entre ells no es veu cap complex,

estan separats però encarats l'un amb l'altre final amb final (Solari, 1980) (fig. 10).

1.3.3.3. Paquitè

En aquest estadi els complexos sinaptinèmics apareixen completament formats al llarg dels bivalents autosòmics (Moses i col., 1975; Holm i Rasmussen, 1977; Moses, 1977a; Rasmussen i Holm, 1978; Solari, 1980) presentant l'estructura definida a 1.3.1. (figs. 6 i 11).

Es, doncs, en aquest estadi on qualsevol anomalia de l'aparellament cromosòmic (desinapsi i asinapsi) pot ésser fàcilment detectada analitzant a fons l'engalzament dels CS.

Cal tenir en compte, malgrat tot, que en les primeres etapes de paquitè, alguns nuclis presenten regions específiques, sense completar els CS. Aquestes regions estan limitades a les zones paracentromèriques dels bivalents 1 i 9 (Solari, 1980). El bivalent número 9 és el que presenta amb més freqüència una zona no sinapsada i la seva mida és més gran que la del bivalent número 1.

Cal remarcar que la presència d'aquestes regions no aparellades està limitada a les primeres etapes de paquitè i, a mida que aquest estadi avança, l'aparellament dels bivalents és total. Per tant, qualsevol error en la formació del CS detectat a partir de paquitè mitjà ha d'ésser considerat com una anomalia.

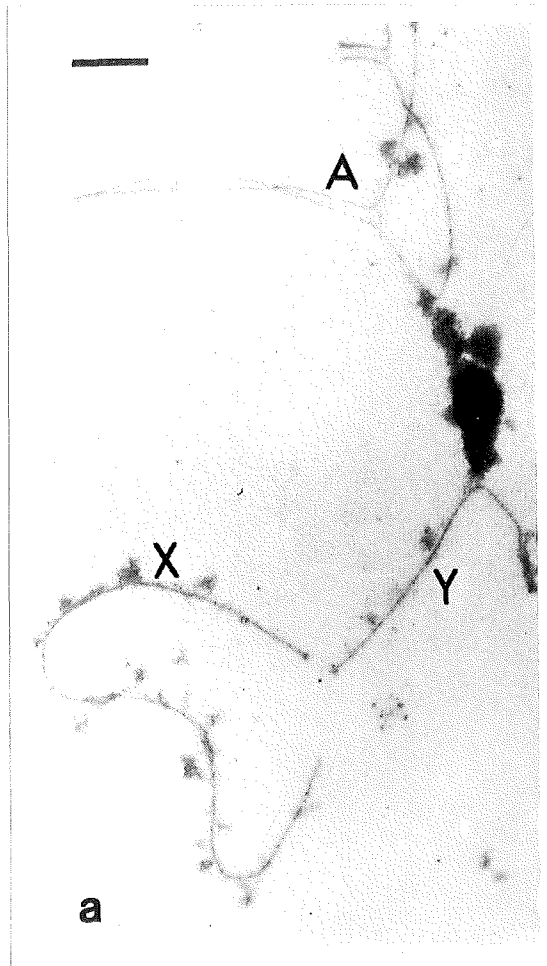


Figura 10.- Fotografia al microscopi electronic del parell XY en un nucli en zigotè tardenc. Els eixos X, Y són associats pels seus extrems però no hi ha CS format entre ells. A la part superior de la figura s'observa un bivalent autosòmic (A) amb el CS encara no completat. (Solari, 1980).

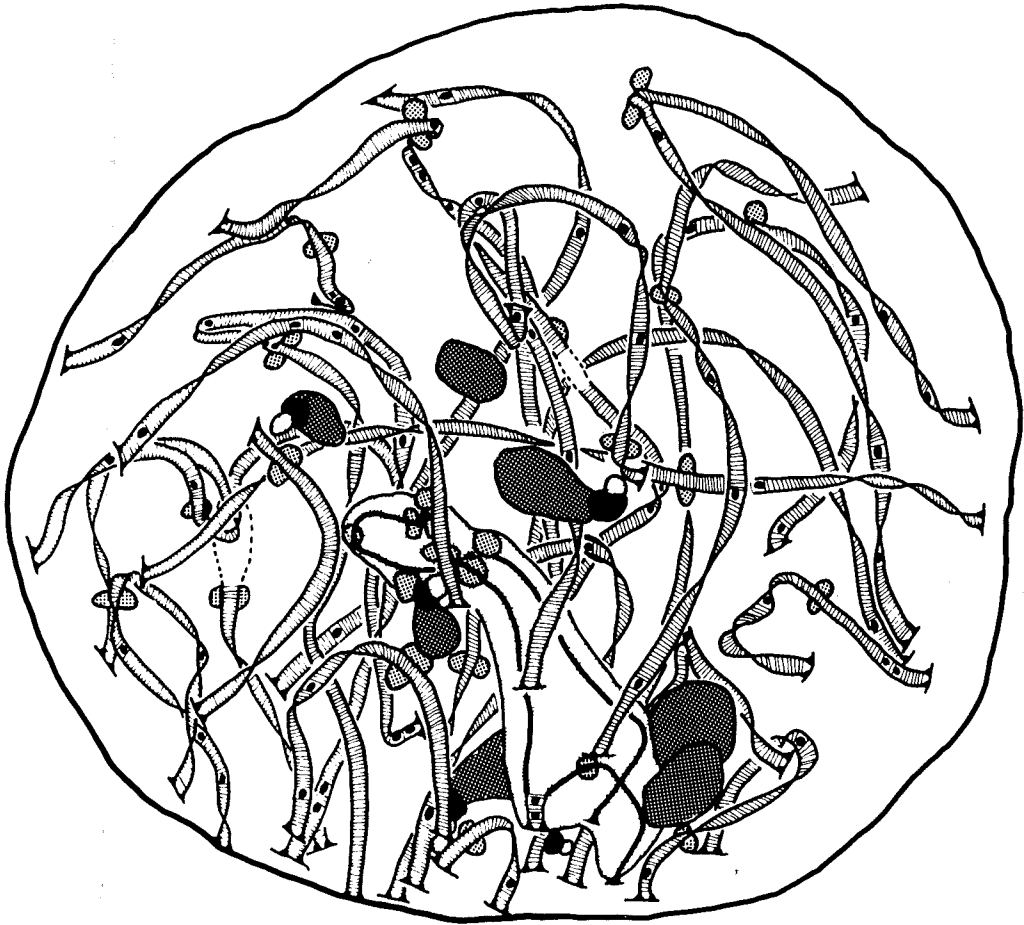


Figura 11.- Reconstrucció d'un nucli en paquitè primerenc. Amb l'excepció de les constriccions secundàries dels bivalents 1 i 9, tots els bivalents autosòmics presenten CS completament formats. Les línies puntejades indiquen els elements laterals discontinus dels bivalents 1 i 9. El parell XY presenta un CS curt i es troben formant la vesícula sexual. (Rasmussen i Holm, 1978).

Alguns complexos sinapteinèmics acrocèntrics es poden veure associats a zones NOR; el que acostuma a ésser més gran i més fàcilment visible és el del CS número 21.

Els cromosomes XY apareixen condensats formant la típica vesícula sexual. A nivell de complex sinapteinèmic el parell XY és fàcilment identificable i diferenciable de la resta de complexos autosòmics. En nuclis paquitènics primerencs s'observa la presència de un petit CS entre els dos cromosomes sexuals. A mida que el paquitè avança, el parell XY adopta diferents morfologies i els elements laterals no aparellats comencen a aparèixer amb modificacions: excrescències, multibranques, engrossaments, etc.... (Solari i Tres, 1970; Moses i col., 1975; Rasmussen i Holm, 1978; Solari, 1980). Aquests canvis progressius serveixen en certa manera com a cronologia de l'estadi de paquitè i són característics de cada espècie.

Solari (1980) va descriure 5 tipus diferents de morfologies del parell XY en paquitè atenent-se a les diferenciacions associades amb els eixos no aparellats i comparant-los amb el comportament dels CS autosòmics.

Tipus I: Es caracteritza per la presència d'un fragment de complex sinapteinèmic entre els eixos del X i del Y. Moses i col., (1975), calculant la posició del cinetocor, va deduir que els braços implicats en la formació del CS eren els curts d'ambdós cromosomes.

En aquest moment el CS-XY és el més llarg observable a tot el paquitè.

Els eixos no aparellats apareixen continus i poden veure's nombroses excrescències al llarg dels eixos laterals no aparellats (fig. 12a).

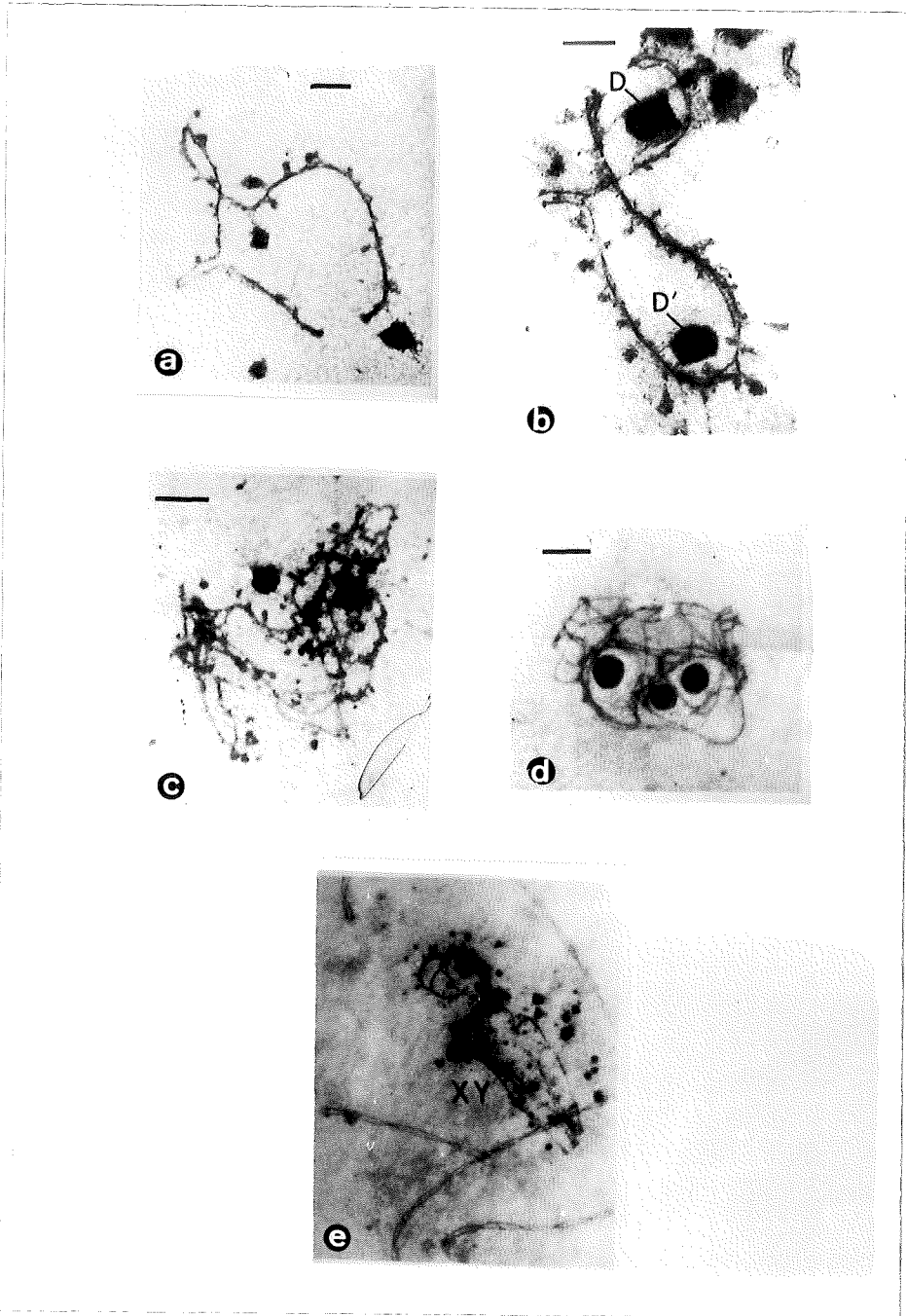


Figura 12.- Configuracions del parell XY a paquitè en espermatòcits humans vist al microscopi electrònic. 12a: tipus I; 12b: Tipus II; 12c: Tipus III; 12d: Tipus IV; 12e: Tipus V. D: cossos densos associats als eixos. N: nuclèol. (Solari, 1980).

Tipus II: El fragment de complex segueix éssent visible però amb una mida inferior que en el tipus anterior.

Les excrecències dels eixos no aparellats molt més engruixides i diverses regions dels mateixos presenten feses (fig. 12b).

Tipus III: Caracteritzat per la desaparició o l'escurçament de la regió d'aparellament, desapareixent a la vista el fragment de CS. Els eixos es presenten quasi totalment fesos, les excrecències es fragmenten i apareixen com partícules de petit tamany enganxades als eixos i donant-els hi un aspecte granulat (fig. 12c).

Tipus IV: No es veu cap CS, els eixos estan completament fesos, entortolligats entre ells, d'aspecte net i sense presentar cap excrecència. Dintre la xarxa que formen els eixos, hi podem veure dues o tres masses denses (fig. 12d).

Tipus V: L'aspecte entortolligat dels eixos és similar al del tipus anterior, però els cossos denses apareixen fragmentats en partícules que es troben escampades per l'interior i les proximitats del parell XY (fig. 12e).

A la taula nº I, podem veure la distribució i freqüència del tipus XY observats per Solari (1980) en un estudi dut a terme en espermatoïcits paquitènics al microscopi electrònic.

Al llarg del paquitè aquests cinc tipus de conformacions XY apareixen de forma seqüencial. L'estadi tipus I correspondria a un paquitè primerenc i representaria la formació del CS; els tipus II i III serien els típics d'un paquitè mitjà i correspondrien a la desinapsi del parell XY; i, a l'últim, els tipus IV i V serien els d'un paqui-

Zigotè		Paquitè			
Tipus: 0	I	II	III	IV	V
2	17	16	5	17	29
(2.3%)	(19.8%)	(18.6%)	(5.8%)	(19.8%)	(33.7%)

Taula I. - Freqüència de tipus de configuracions XY en 86 espermatoòcits humans. (Solari, 1980).

tè tardenc, en el qual el CS entre X i Y ja no és visible encara que tots els bivalents autosòmics romandrien del tot aparellats i amb els complexos sinaptinèmics intactes. Per tant, la sinapsi i desinapsi dels cromosomes sexuals es troba fora de fase respecte als autosòmics.

En l'estudi de paquitè, els CS poden ésser cariotipats (fig. 13). El criteri utilitzat per a la classificació es basa en la seva longitud relativa i en l'índex centromèric, i s'obté així una clara homologia amb els cariotips de cromosomes metafàsics, que ens permet l'identificació de cada complex sinaptinèmic (fig. 14).

1.3.3.4. Diplotè

Cromosòmicament es caracteritza per l'inici de la desinapsi dels bivalents. La cromatina es condensa i queda tenyida més densament; la qual cosa, afegida a la curta durada d'aquest estadi dificulta l'estudi del complex sinaptinèmic. Per tant, són molt poques les dades sobre el comportament dels complexos al llarg del diplotè i nul·les les que fan referència a la fase difusa.

En general, podem dir que en totes les espècies estudiades, a diplotè el CS es desorganitza al mateix temps que els bivalents se separen (Gillies, 1975; Moses i col., 1975; Moses, 1977a, 1977b; Rasmussen i Holm, 1978). A mida que aquest estadi va avançant, el CS va desintegrant-se. Les últimes estructures visibles són les plaques terminals i alguns petits fragments de CS intactes que podrien representar els punts de quiasma.

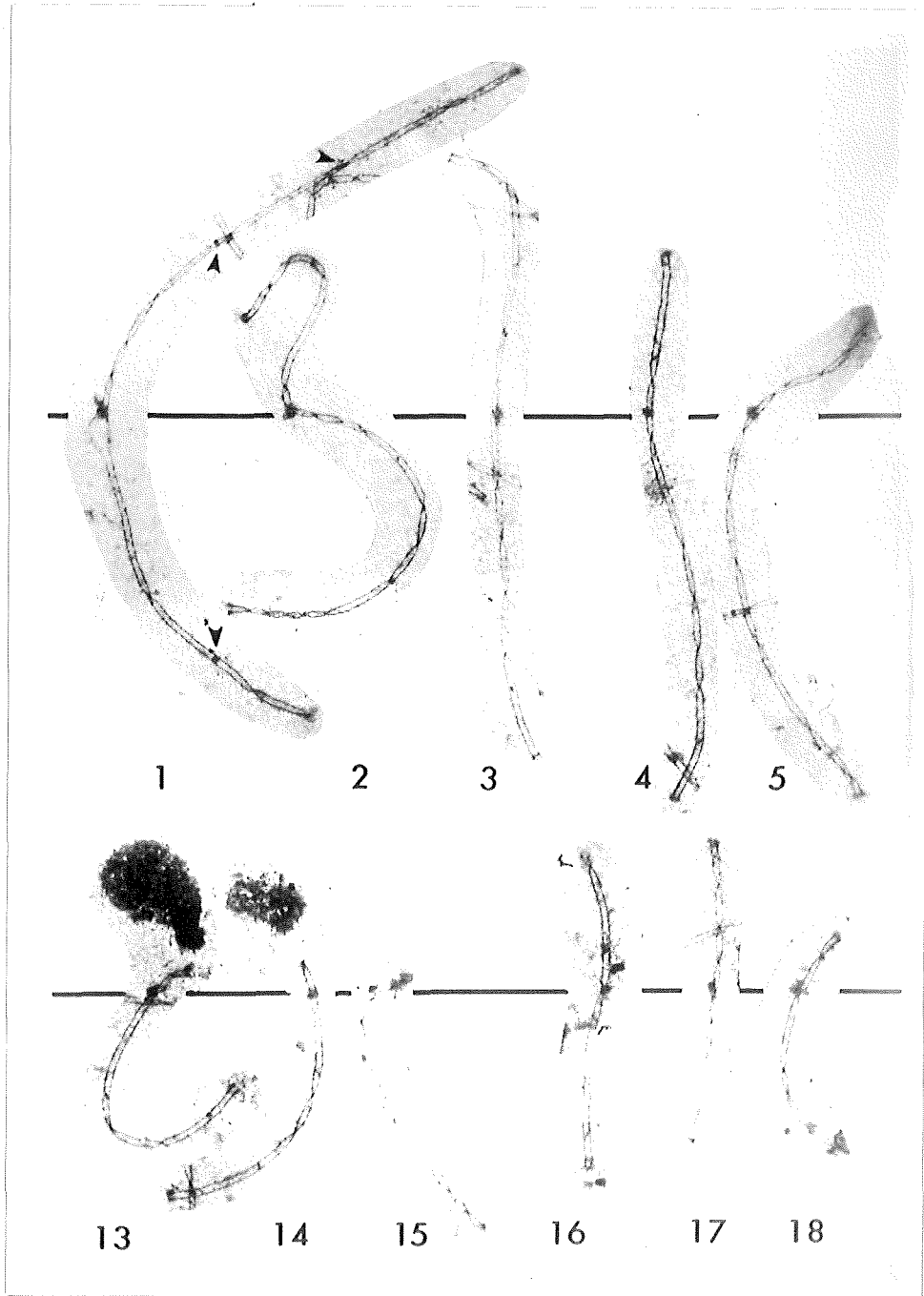


Figura 13.- a) Cariotip de complexos sinapteinèmics humans analitzats amb microscopi electrònic. Grups A, B, D i E. (Solari, 1980).

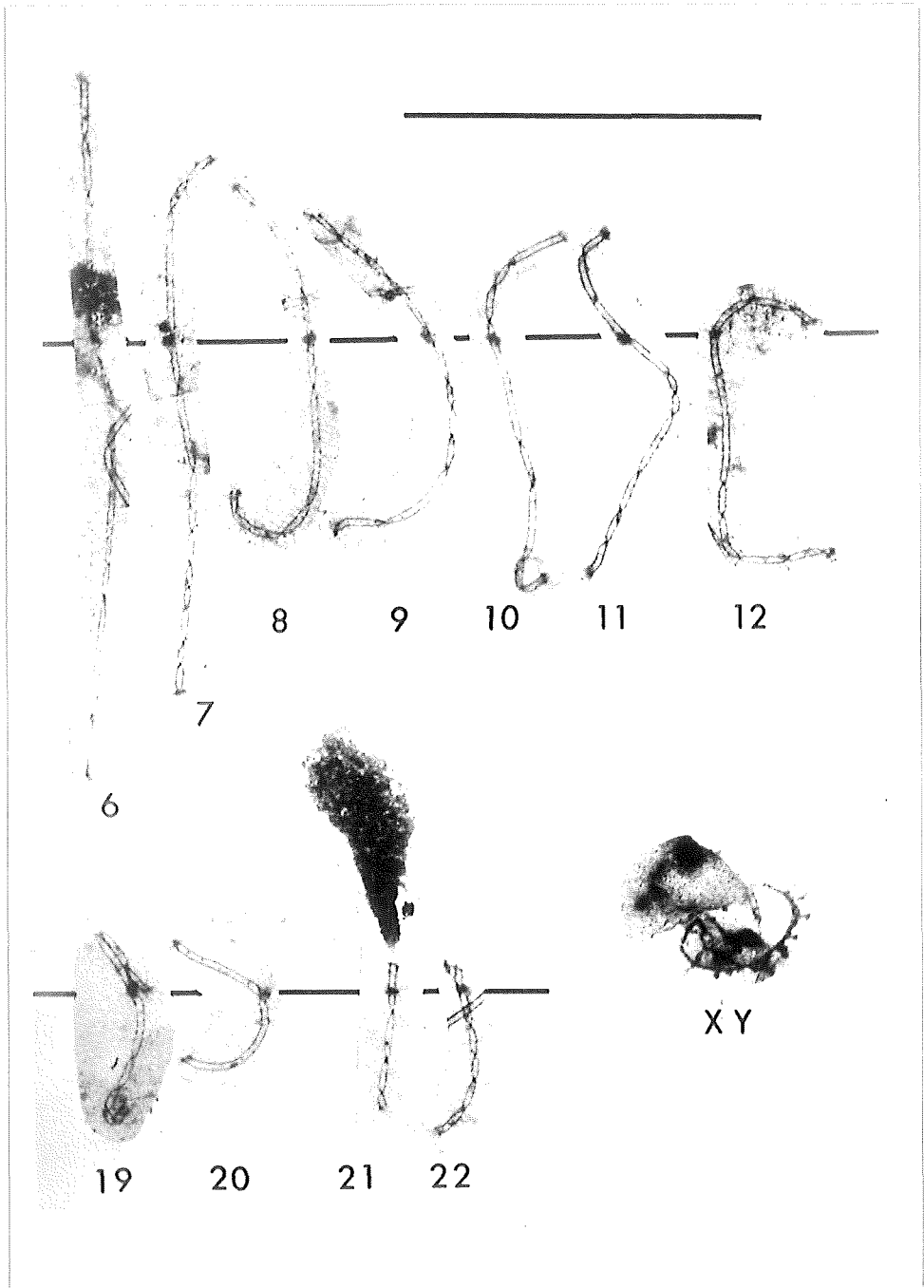


Figura 13.- b) Cariotip de complexos sinaptinèmics humans analitzats amb microscopi electrònic. Grups C, F, G i parell XY. (Solari, 1980).

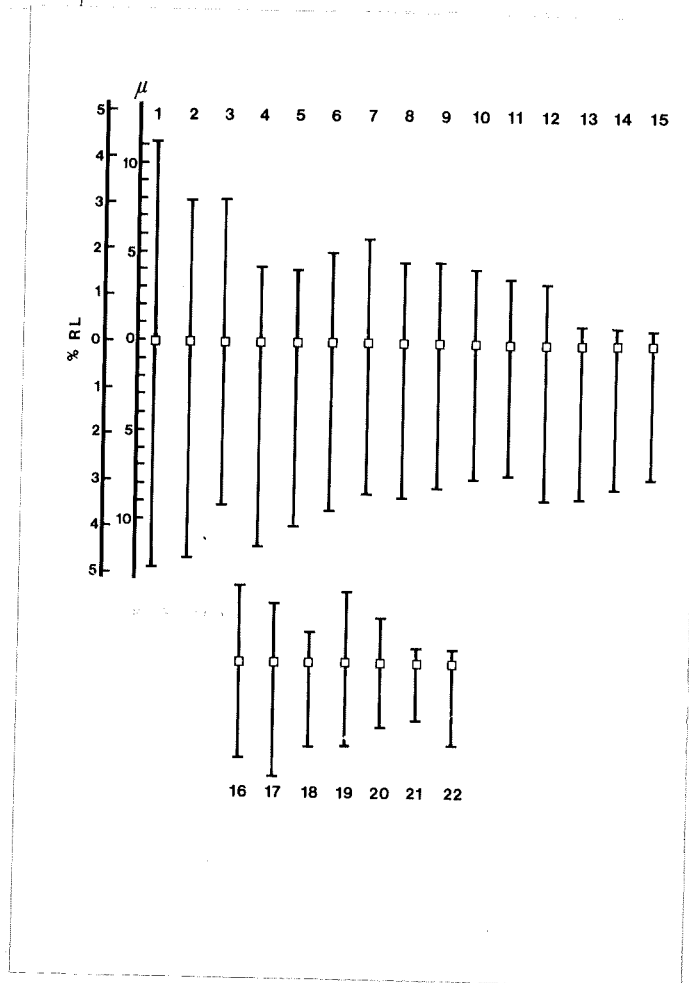


Figura 14.- Idiograma dels complexos sinaptinèmics humans estudiats amb microscopi electrònic en nuclis d'espermatòcits paquitèmics. (Solari, 1980).