

MORFOLOGIA I FORMACIÓ DEL COMPLEXE SINAPTINÈMIC A ESPERMATÒCITS I OÒCITS DE *MUS MUSCULUS*

COLL, M.D.^{1,3}, L. FREIXA¹, M. GARCIA^{2,3}, M. GUITART¹
M. PONSÀ^{1,3} i J. EGOZCUE^{1,3}

¹Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Ciències.

²Departament de Biologia, Facultat de Medicina.

³Institut de Biologia Fonamental "Vicenç Villar Palasi".
Universitat Autònoma de Barcelona.

Rebut 20 Gener 1983

SUMMARY

A method for the sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy has been used to characterize the synaptic process in mouse (*Mus musculus*) spermatocytes and oocytes. Pre- and post-synaptic figures can be easily identified.

INTRODUCCIÓ

El complex sinaptinèmic (CS), localitzat entre els dos cromosomes homòlegs, és una estructura formada per dos elements laterals densos als electrons i un element central (Fig. 1). El principal component d'aquests elements son proteïnes. La morfologia del CS és bàsicament la mateixa en totes les espècies estudiades: cranc, ratolí,

hamster, home, lemur, etc. (Moses, 1968, 1969; Solari i Tres, 1970; Wettstein i Sotelo, 1971; Solari i Moses, 1973; Solari, 1972, 1974).

S'ha discutit la seva funció però se'l reconeix com un component estructural regular i necessari dels bivalents paquitènics en organismes que presenten entrecreuament (Moses, 1968, 1969; Westergaard i Von Wettstein, 1972; Gillies, 1975).

Durant un temps, l'estudi del CS s'ha realitzat en talls nuclears seriatos a Microscòpia Electrònica (ME) (Wettstein i Sotelo, 1967; Moens, 1973) i amb mètodes citològics (Sheridan i Barnett, 1969; Esponda i Stocker, 1971) però les tècniques són difícils i els resultats molt limitats. L'any 1973 Counce i Meyer varen descriure un mètode d'extensió dels espermatòcits primaris de cranc que fou adaptat per Moses (1977a) a espermatòcits de mamífer. Aquesta tècnica permet obtenir preparacions que poden ésser estudiades al microscopi òptic i a l'electrònic (Moses, 1969, 1977, 1977b; Moses i col., 1977c; Fletcher, 1979; Pathak i Hsu, 1979; Tres, 1979; Solari, 1980).

L'estudi seqüencial dels C. S. al microscopi òptic i electrònic (Dresser i Moses, 1980) amb les modificacions introduïdes per Navarro i col. (1981), que permeten seleccionar les cèl·lules al microscopi òptic i estudiarles al microscopi electrònic, representen un avenç molt important per a l'estudi de la meiosi. El desenvolupament i comportament dels C. S. al microscopi òptic i microscopi electrònic ha estat descrit per diversos autors (Tres, 1977, 1979; Moses, 1977a; Solari i Counce, 1977; Dresser i Moses, 1980) en la població de cèl·lules testiculars que és heterogènea i asincrònica. La caracterització dels diferents estadis de la profase I es basa en la morfologia de diversos components nuclears tals com els eixos del parell XY, el comportament de les estructures nuclears, la presència d'elements axials senzills, etc. Encara que aquestes consideracions són vàlides, poden donar lloc a falses interpretacions.

Només hi ha un estudi que s'ha dut a terme en una població cel·lular relativament sincrònica (Dietrich i Mulder, 1981) al microscopi òptic. Aquesta sincronització la coneixen destruint les espermatogonies en fase S amb hidroxidreia. Encara

que aquest mètode permet l'anàlisi successiu dels diferents estadis de la meiosi no es descarta la possibilitat de que alguns espermatòcits també hagin sigut afectats.

Les diferències que existeixen entre els resultats de Dresser i Moses (1980) i els de Dietrich i Mulder (1981) consisteixen en la presència d'elements laterals sense aparellar (Dresser i Moses, 1980) o absència dels mateixos (Dietrich i Mulder, 1981) a l'estat presinàptic i en l'existència de diferències entre els elements axials a cigoté i diploté. Els últims autors comentaven al final del seu treball: "Serà necessari un estudi al microscopi electrònic per aclarir el problema...". Per intentar solventar el problema plantejat més amunt, hem dut a terme un estudi del C. S. en ratolins joves desde que començaven la meiosi fins a la maduració emprant mascles de 7 a 40 dies i femelles desde 17 dies de gestació a 1 dia d'edat.

Pel que es refereix als oòcits, els únics treballs realitzats fins el moment són l'estudi del nòdul de recombinació en talls d'oòcits humans (Stahl i Mirre, 1981) i l'anàlisi al microscopi òptic dels C. S. en oòcits de ratolí (Speed, 1982).

MATERIAL I METODES

Material

El material testicular s'ha obtingut d'espermatòcits de ratolins mascles (*Mus musculus*) sacrificats desde 7 fins a 40 dies d'edat.

Els oòcits s'obtenen d'ovaris de fetus de 17 a 19 dies d'edat i de nounats, considerant com a dia 0 de gestació el dia que apareix el tap vaginal. Les femelles prenyades es sacrifiquen per dislocació cervical, s'extrauen els fetus i es determina el sexe segons l'aspecte morfològic del tracte genital.

Preparació dels portaobjectes

Els portaobjectes es sumergeixen en una solució de sabó alcali, es deixen secar i es netejen bé amb un drap de cotó. S'introdueixen en una solució de Formvar 0,5 % en cloroform (Felluga i Martinucci, 1976), i es deixen secar en posició vertical lacant les voreres amb laca d'angles. Els portes es sumergeixen en una solució de citocrom 0,01 % en aigua destil·lada i es deixen secar (Navarro i col., 1981).

Suspensió cel·lular d'espermatoïts i oòcits

Els testicles s'extrauen, es recullen en medi F-10 i es trituren els túbuls amb tisores per deixar lliures els espermatoïts. Els ovaris s'extrauen, es recullen en medi F-10, es neteja el teixit periovaric i s'alliberen els oòcits mitjançant unes agulles fines.

Extensió i fixació de les cèl·lules

Un cop obtinguda la suspensió d'espermatoïts i oòcits el procés a seguir és el mateix en ambdós casos.

En un porta previament tractat amb plàstic es col·loca una gota de la suspensió cel·lular i s'hi afegeixen 2 gotes de CINA 0,5 %. L'hipotònic es deixa actuar durant 15 minuts en una atmosfera humida a temperatura ambient, l'exces d'hipotònic s'elimina amb una micropipeta i s'afegeixen 4 gotes de fixador (paraformaldehid 4 %, ajustat a pH 9-10 amb NaOH 1N i tampó borat). Després de 10 minuts, també en cambra humida, es treu el fixador, es renten els portes amb photoflo 0,4 % durant 30 segons i es deixen secar.

Tinció

Els portes es tenyeixen amb una solució de AgNO_3 50 % en aigua destil·lada amb 3 gotes de formalina (3 %) per ml de solució de nitrat de plata. Es tiren sobre el porta de 2 a 4 gotes d'aquesta solució, es col·loca un cubre i es deixa actuar en una atmosfera humida a 65 °C, el temps necessari per aconseguir una tinció correcta.

Observació al M.O. i M.E.

Les preparacions s'observen al M. O., es seleccionen i fotografien les cèl·lules d'interès anotant la posició. L'oli d'immersió utilitzat per la fotografia es renta amb xilol ben net.

Amb una agulla sota el M. O., a pocs augments (4X), es retalla el film de Formvar amb les cèl·lules seleccionades. Amb molt de compte s'aixeca la pel·lícula retallada mitjançant unes pinces de rellotger i amb l'ajut d'una gota d'aigua de tal manera que la pel·lícula quedi flotant sobre la gota un cop despresa. Es recull la pel·lícula amb una reixeta de 400 mesh per M. E.

RESULTATS

L'observació dels nuclis profàsics obtinguts de testicle de ratolí mascle i d'ovari de fetus femella ens ha permès definir el procés de formació del complex sinaptinèmic fins a paquitè i la seva posterior desestructuració.

Els primers indicis de formació del C. S. els observem en ratolins mascle de 11 a 14 dies i en cèl·lules ovàriques apareixen per primera vegada avans dels 17 dies, doncs a partir d'aquesta edat s'observen sempre amb baixa freqüència. Avans d'aquestes edats no hem observat cap estructura que pogues ésser relacionada amb el C. S.

En nuclis profàsics observem fragments que corresponen a troços d'elements laterals del C. S. Aquests fragments observats al M. E. es veuen a vegades dobles i altres vegades com un sol filament; per tant, corresponen a troços aparellats o sense aparellar. Son més fins que els filaments que s'observen en estadis més avançats (paquitè) i la longitud total és també més gran. En els mascles no es distingeixen els eixos dels cromosomes sexuals. En la Figura 1 podem veure l'estructura típica que nosaltres definim com corresponent al leptoté.

Una de les característiques del leptoté és que la síntesi dels elements laterals no és completa (Fig. 2) en canvi en cigoté els elements laterals estan ja practicament formats en tota la seva longitud, però l'aparellament encara no és complet. Les nostres dades ens permeten deduir que l'aparellament comença principalment per zones intersticials o per un dels extrems; d'aquesta manera s'expliquen les formes en X i en Y que observem (Fig. 3). A mida que avança el cigoté cada cop es veuen més elements laterals aparellats formant la típica estructura del CS. El procés d'aparellament no és sincrònic ni en mascles ni en femelles, doncs en un mateix nucli podem trobar CS totalment formats, altres formats parcialment i elements laterals sense aparellar, tal com ens indiquen les observacions fetes al M. E. Els eixos del bivalent sexual, en mascles, no es distingeixen clarament malgrat en algunes cèl·lules d'animals de 12-14 dies els hem pogut identificar.

En mascles d'edat més avançada, 17-25 dies, trobem que el 36 % dels nuclis estan en leptoté-cigoté i la resta de nuclis en paquitè. A mida que els animals es fan més grans la proporció varia a favor d'augmentar el tant per cent de paquitens. Els CS autosòmics estan completament formats (Fig. 4) i el bivalent sexual X-Y es perfectament identificable amb una regió apare-

llada (la zona d'homologia) (Fig. 5). La morfologia d'aquests bivalents és variable al llarg del paquitè (Fig. 6), i els eixos no aparellats, a vegades, s'observen dobles o triples; també es presenten modificacions laterals d'aquests elements. En femelles el bivalent X-X no presenta cap característica que permeti distingir-lo dels altres bivalents (Fig. 4).

El diploté ens apareix als 26-28 dies; en mascles d'aquesta edat el 9 % dels nuclis estan en leptoté-cigoté, el 44 % en paquitè i el 47 % en diploté. En aquesta fase, caracteritzada per el procés de desaparellament dels cromosomes homòlegs, es veu com els elements laterals es comencen a separar. El punt d'inici del procés de desaparellament no és constant, pot ésser intersticial, centromèric o a partir de la placa terminal. Es característic d'aquesta fase un engruïment de les regions centromèriques (Fig. 7 i 8). Al llarg d'aquesta fase els elements axials van progressant en el seu desaparellament; això també passa amb el bivalent X-Y que pot trobar-se associat terminalment o completament desaparellat; a finals de diploté es poden trobar elements axials totalment independitzats.

Després de 31 dies d'edat el procés d'espermatogènesi està complet, doncs ja trobem espermatozous a les preparacions. Fins als 40 dies la proporció de nuclis en leptoté-cigoté és 19 %, en paquitè 53 % i en diploté 38 %.

En femelles el procés s'atura en dictioté i no es veuen estructures relacionades amb el complexe un dia després del neixement.

En mascles hem estimat els percentatges mentres que en femelles els resultats que tenim de moment encara no ens ho permeten.

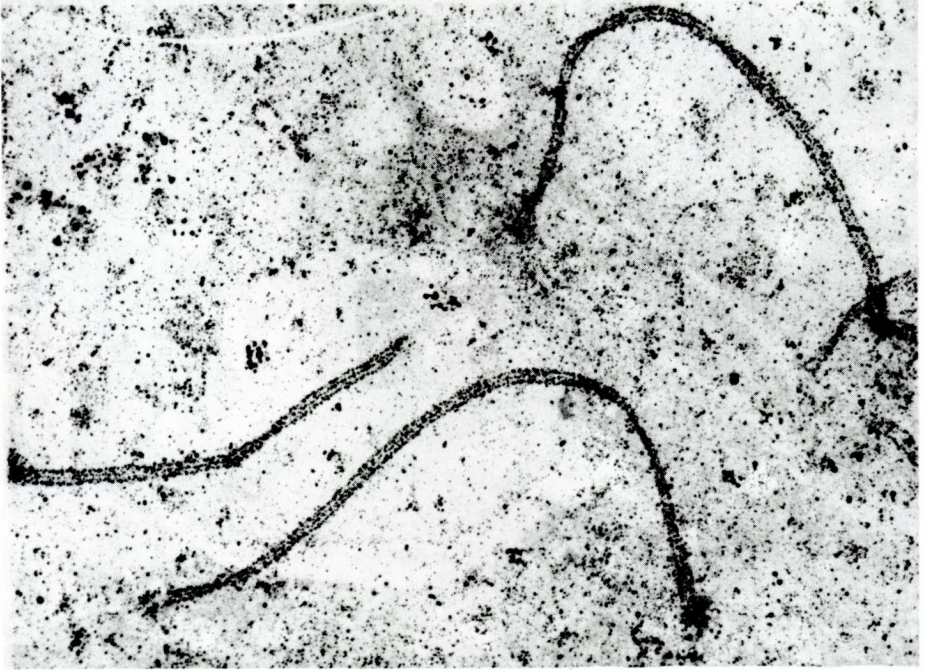


Fig. 1. Detall de l'estructura del CS a paquité; es poden distingir els dos elements laterals i l'element central.

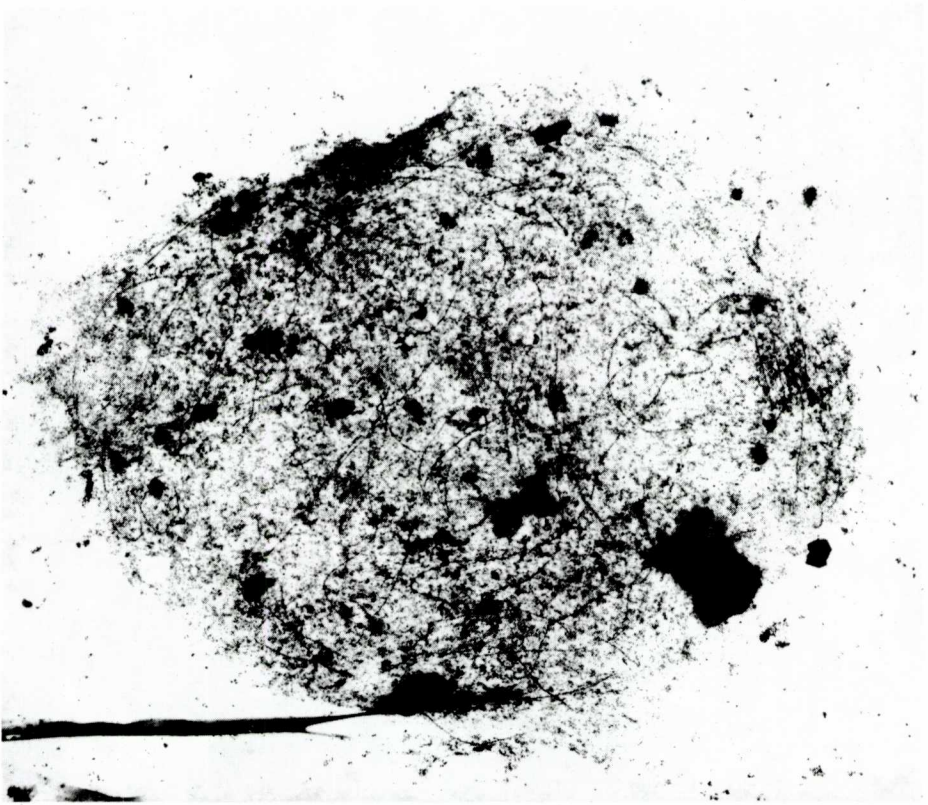


Fig. 2. Leptoté de ratolí femella. Es diferencien els elements laterals entortolligats sense aparellar.

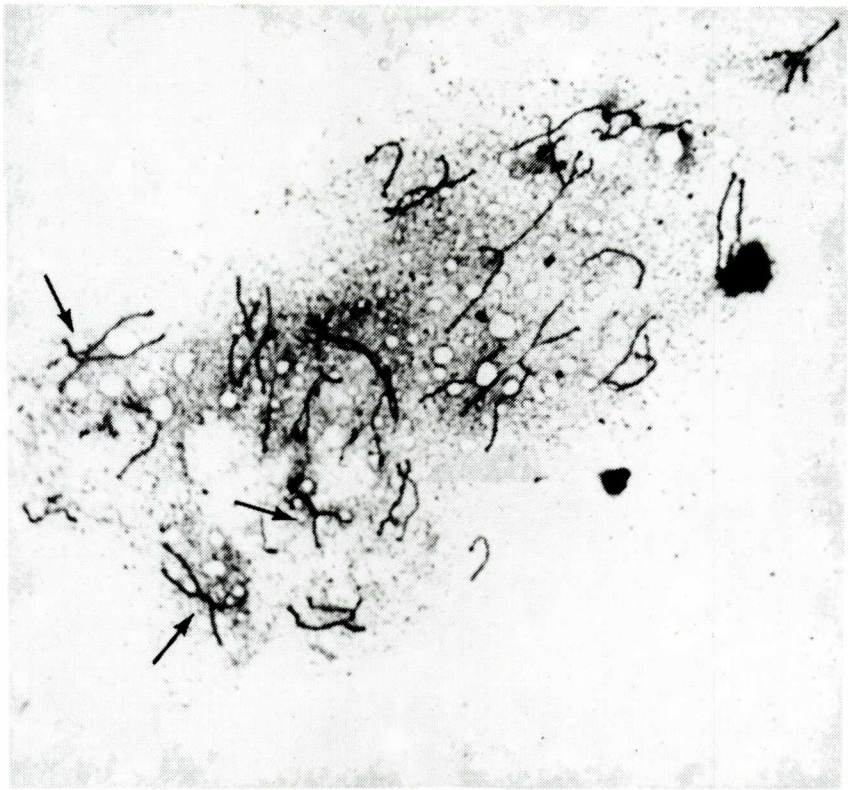


Fig. 3. Cigoté de ratolí mascle; l'aparellament comença per zones intersticials o per un dels extrems donant formes en X i en Y (fletxes).



Fig. 4. Imatge seqüencial d'un paquet de ratolí femella al M.O. i M.E. S'observen 20 CS i el bivalent sexual no es identificable. En femelles es presenta una alta freqüència d'associacions entre CS (fletxa).

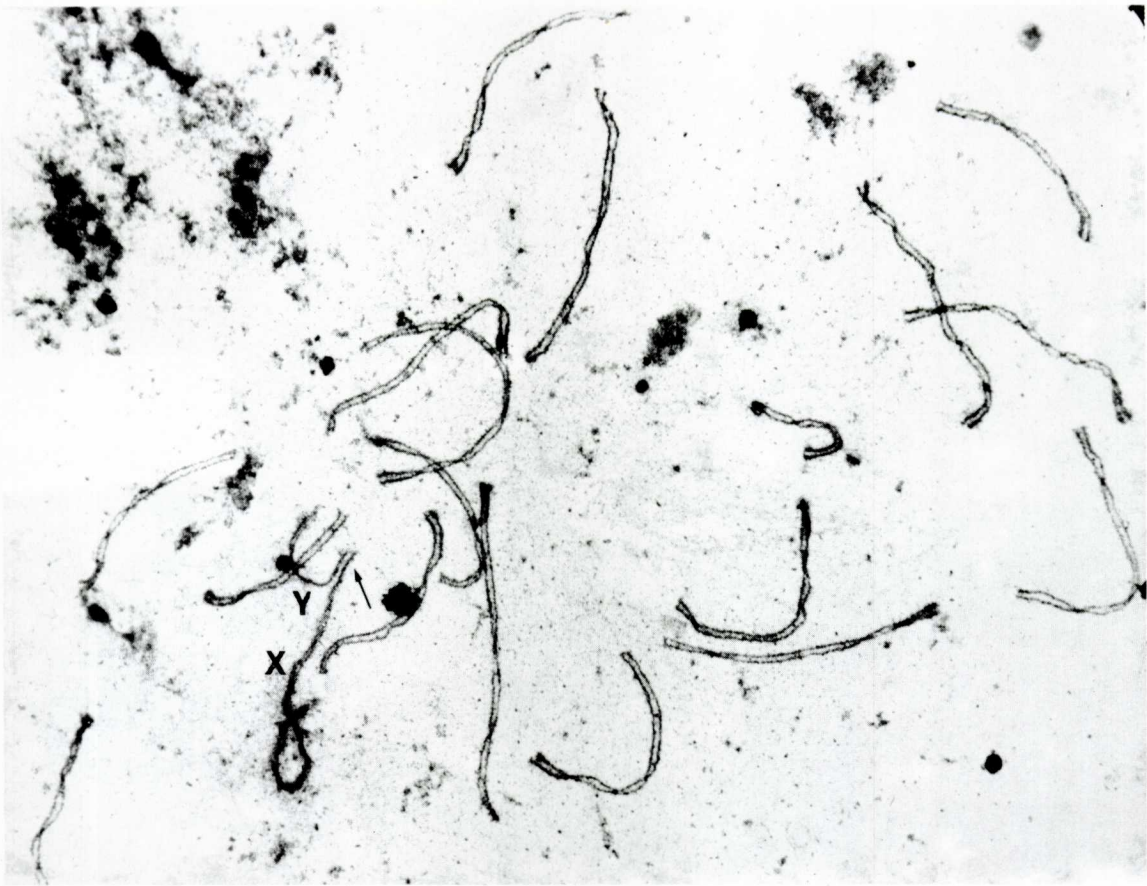


Fig. 5. Paquíte de ratolí mascle. Els bivalents autosòmics estan perfectament aparellats, l'estructura del CS es la típica de paquíte. El bivalent XY es distingeix per la seva morfologia: la zona homòloga aparellada (fletxa) i els eixos no aparellats s'observen dobles o triples.

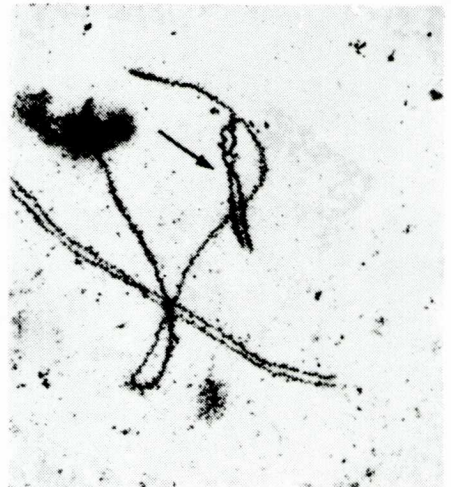
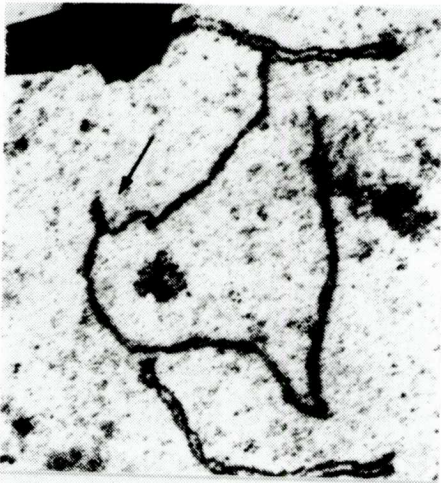
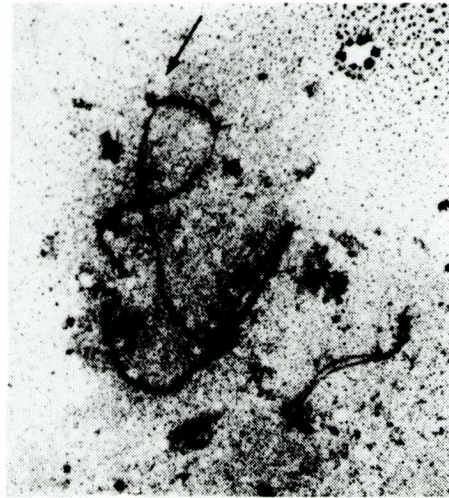


Fig. 6. Diferents formes que presenta el bivalent XY a paquí. La fletxa senyala la zona d'aparellament, el tamany d'aquesta varia al llarg de paquí.

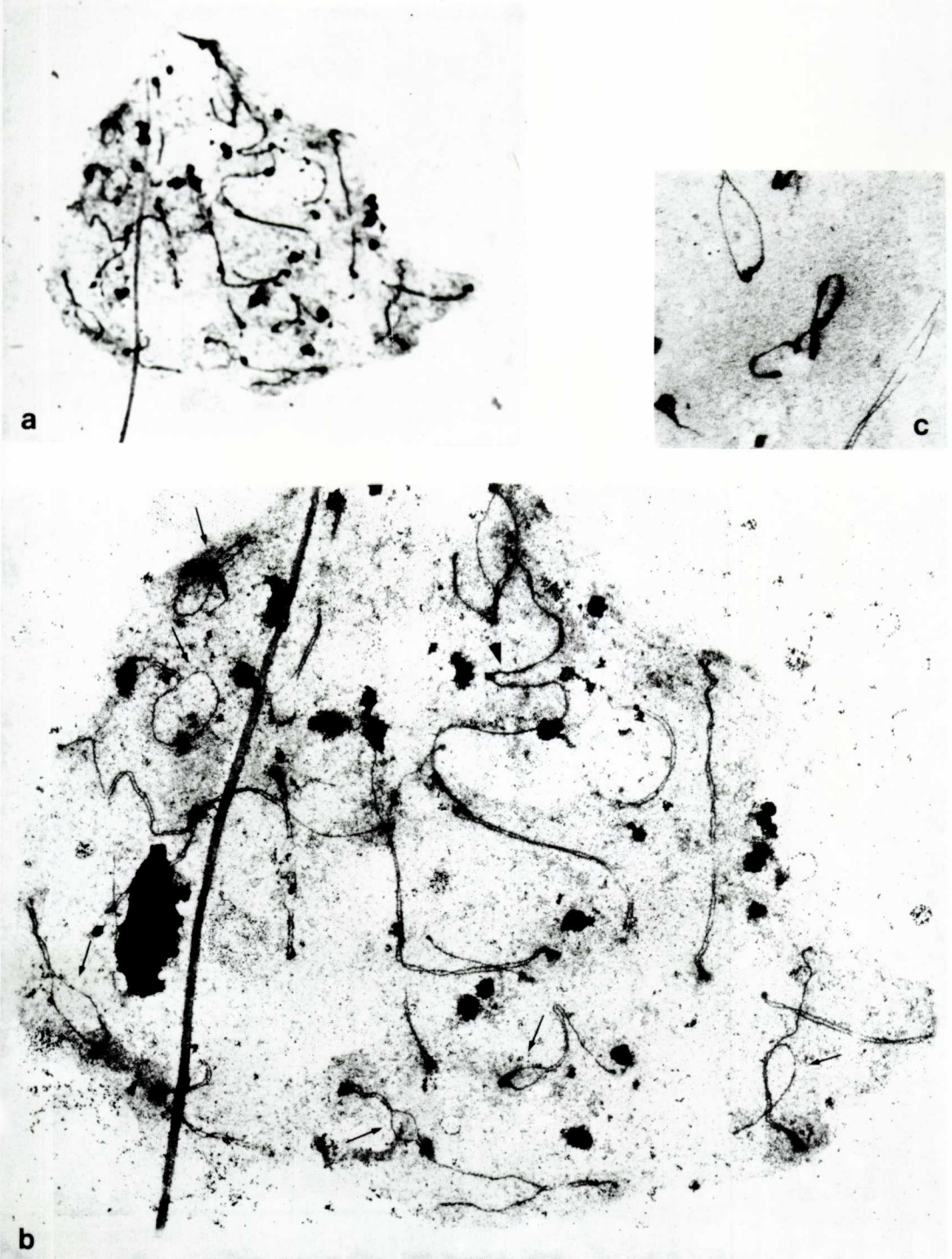


Fig. 7. Diploté d'espermatoцит de ratolí al M.O. i al M.E. a,b). Els elements laterals es separen terminalment o intersticialment. En un dels extrems dels CS s'observa un engruïment que correspon a les regions centromèriques. El bivalent X-Y (cap de fletxa) està aparellat per l'extrem. c) Un altre estructura típica del bivalent X-Y en diploté, els eixos no aparellats estan molt engruïxits.

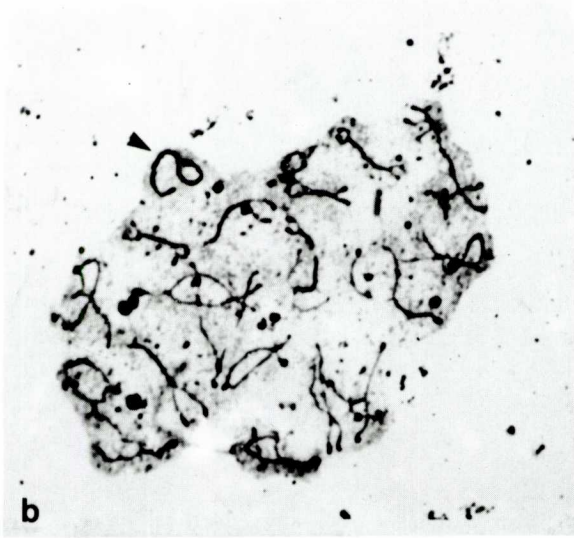
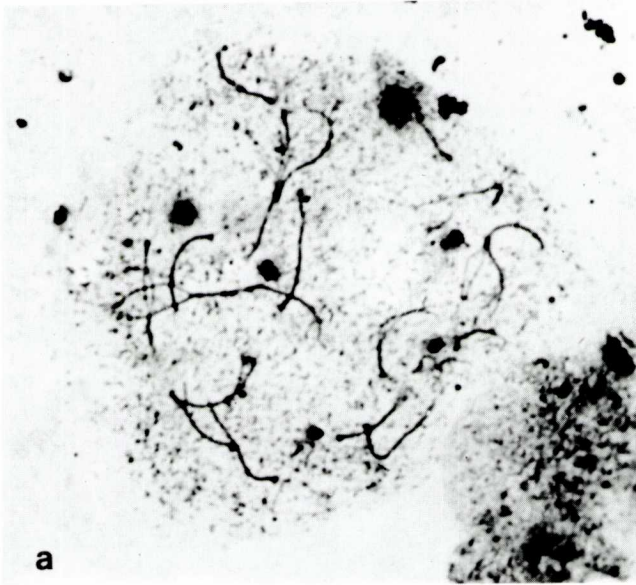


Fig. 8. a,b) Diploté d'un ratolí femella i mascle al M.O.; el cap de fletxa senyala el bivalent sexual XY.

DISCUSSIÓ

Característiques del cycle sinàptic

L'estudi dels C.S. a espermatòcits s'ha realitzat en animals de 7 a 40 dies d'edat. En oòcits s'han estudiat en fetus femenins a partir de 17 dies de gestació (avans el tany és massa petit). Els C.S. no s'observen en els animals de més d'un dia d'edat.

A oòcits i espermatòcits de ratolí els C.S. representen les mateixes característiques al M.O. i també al M.E., amb l'excepció del bivalent sexual que no s'identifica en les preparacions d'oòcits.

Leptoté: Els nostres resultats estan d'acord amb els de Fletcher (1977), Moses (1977), Dresser i Moses (1980) i Speed (1982). Els elements axials son incomplets i estan desaparellats. L'aparellament dels elements axials comença avans de que la seva formació sigui completa.

Cigoté: Moses (1968) i Solari (1970) mitjançant talls fins amb M. E. varen descriure que l'aparellament presinàptic comença a les regions telomèriques. El fet de que trobem figures en X vol dir que l'aparellament també pot ésser intersticial, encara que no es pot estimar la possibilitat de que les figures en X siguin degudes a girs dels elements axials. Per altra banda, les figures en Y i les el·líptiques poden correspondre a llocs d'iniciació del aparellament per un o dos extrems.

A cigoté, l'aparellament dels elements axials és completament asincrònic. Aquesta observació està d'acord amb les dades de Fletcher (1977), Tres (1977, 1979) i Moses (1977a, 1980).

L'aparellament dels eixos dels cromosomes sexuals XY comença a finals de cigoté tal com varen descriure Rasmussen i Holm (1978) i Solari (1980). La longitud de la regió aparellada va augmentant progressivament fins a la meitat de paquité (Solari, 1980).

Paquité: Tots els C.S. estan completament formats. Les regions centromèriques es fan més gruixudes i visibles. A oòcits s'observa una associació terminal del C.S. en un 30 % de les cèl·lules i en un 5 % hi ha una polarització formant una estructura en "bouquet" d'acord amb Speed (1982).

Diploté: Aquest estadi es caracteritza per les configuracions postsinàptiques; els elements axials comencen a separar-se per les regions centromèriques, per les plaques, ó intersticialment. Els centròmers son perfectament visibles (Solari, 1970; Moses, 1977a; Tres, 1977; Dietrich i Mulder, 1981).

D'aquesta informació es pot concloure que a cigoté es dona l'estadi presinàptic i que la morfologia presinàptica dels C.S. és completament diferent de la que s'observa a diploté, estadi postsinàptic.

Diferències entre presinapsi i postsinapsi

Finalment passem a resumir les característiques que, al nostra entendre, defineixen i distingeixen els estats pre i postsinàptics.

Presinapsi: Els eixos dels cromosomes sexuals no s'identifiquen. Hi ha moltes figures en X i Y. Els elements laterals son incomplets. El gruix dels elements laterals es variable. Els elements laterals son atenuats a certes regions. Les regions centromèriques no s'identifiquen.

Postsinapsi: S'identifiquen els eixos dels cromosomes sexuals a espermatòcits. Hi ha moltes figures el·líptiques o circulars. Els elements laterals son més fins pero el gruix és constant. Les regions centromèriques es fan paleses.

BIBLIOGRAFIA

- COUNCE, S. L., MEYER, G. F. (1973). Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount

- electron microscopy. *Chromosoma* (Berl.) 44:231-253.
- DIETRICH, A. J. J., MULDER, R. J. P. (1981). A light microscopy study of the development and behavior of the synaptonemal complex in spermatocyte of the mouse. *Chromosoma* (Berl.) 83:409-418.
- DRESSES, M. E., MOSES, M. J. (1980). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining. *Chromosoma* (Berl.) 76:1-22.
- ESPONDA, P., STOCKER, J. C. (1971). Localization of RNA in the synaptonemal complex. *J. Ultrastruct. Res.* 35:411-417.
- FELLUGA, B., MARTINUCCI, G. B. (1976). A simple method for karyotyping by transmission electron microscopy. *J. Submicrosc. Cytol.* 8:347-352.
- FLETCHER, M. L. (1977). Localised chiasmata due to partial pairing: A 3D reconstruction of synaptonemal complexes in male *Stethophyma grossum*. *Chromosoma* (Berl.) 65:247-269.
- FLETCHER, M. L. (1979). Light microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining. *Chromosoma* (Berl.) 72:241-248.
- GILLIES, C. B. (1975). Synaptonemal complex and chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 9:91-110.
- MOENS, P. B. (1973). Quantitative electron microscopy of chromosome organization at meiotic prophase. *Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* 38:97-107.
- MOSES, M. J. (1968). Synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 2:363-412.
- MOSES, M. J. (1969). Structure and function of the synaptonemal complex. *Genetics* (Suppl.) 61:41-51.
- MOSES, M. J. (1977a). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I. Morphology of the autosomal complement in spread preparations. *Chromosoma* (Berl.) 69:99-125.
- MOSES, M. J. (1977b). Synaptonemal complex Karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). II. Morphology of the XY pair in spread preparations. *Chromosoma* 60:127-137.
- MOSES, M. J. (1977). Microspreading and the synaptonemal complex in cytogenetic studies. In: *Chromosomes today*. Elsevier/North Holland Biomedical Press (eds.). Amsterdam, The Netherlands, p. 71-82.
- MOSES, M. J., SLATTON, G. H., BAMBLING, T. M., STARMER, C. F. (1977c). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). III. Quantitative Evaluation. *Chromosoma* 60:345-375.
- MOSES, M. J. (1980). Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). IV. Light and electron microscopy of synapsis and nucleolar development by silver staining. *Chromosoma* (Berl.) 76:1-22.
- NAVARRO, J., VIDAL, F., GUITART, M., EGOZCUE, J. (1981). A method for sequential study of synaptonemal complexes by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 59:419-421.
- PATHAK, S., HSU, T. C. (1979). Silver-stained structures in mammalian meiotic prophase. *Chromosoma* 70:195-203.
- RASMUSSEN, S. W., HOLM, P. B. (1978). Human meiosis. II. Chromosome pairing and recombination nodules in human spermatocytes. *Carlsberg. Res. Comm.* 43:275-327.
- SHERIDAN, M., BARNETT, R. J. (1969). Cytochemical studies on chromosome ultrastructure. *J. Ultrastruct. Res.* 27:216-229.
- SOLARI, A. J. (1970). Ultrastructure and histochemistry of the nucleus during male meiotic prophase. In: *The human Testis* (eds. E. Rosemberg and A. C. Paulsen). Plenum Press, New York, p. 127-138.
- SOLARI, A. J., COUNCE, S. J. (1977). Synaptonemal complex karyotyping in *Melanophus differentialis*. *J. Cell. Sci.* 26:229-250.
- SOLARI, A. J. (1980). Synaptonemal complexes and associated structures in microscopied human spermatocytes. *Chromosoma* 81:315-337.
- SPEED, R. M. (1982). Meiosis in the foetal Mouse Ovary. I. An Analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma* (Berl.) 85:427-437.
- STAHL, A., MIRRE, C. (1981). Présence de nodules de recombinaison dans les complexe synaptonemal de l'ovocyte humain au stade pachytene. *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 293:595-599.
- TRES, L. L. (1977). Extensive pairing of the XY bivalent in mouse spermatocytes as visualized by whole-mount electron microscopy. *J. Cell Sci.* 25:1-15.
- TRES, L. L. (1979). Side-by-side pairing of the XY bivalent in spermatocytes and the ubiquity of the H-Y locus. *Archives of Andrology*, vol. 2, p. 101-108. Elsevier/North Holland.
- WESTERGAARD, M., WETTSTEIN, D. von (1972). The synaptonemal complex. *Ann. Rev. Genet.* 6:71-110.
- WETTSTEIN, R., SOTELO, J. R. (1967). Electron microscope serial reconstruction of the spermatocytes I nuclei at pachytene. *J. Microscopi* 6:557-576.
- WETTSTEIN, R., SOTELO, R. J. (1971). The molecular architecture of synaptonemal complexes. *Adv. Cell. Molec. Biol.* 1:109-152.