

2.3.4.1.2. Fonaments

La interpretació que es suggereix (Moses i col., 1975; Pathak i Hsu, 1979; Jhanwar i Chaganti, 1980) és que la plata tenyeix selectivament els complexos sinaptinèmics, degut a la seva naturalesa proteica, i els fa diferenciables de la cromatina poc tenyida que els envolta. La tinció dels CS amb AgNO_3 seria deguda principalment a les preparacions de plata que es dipositen en les proteïnes que formen part dels elements laterals del complex.

2.3.4.2. Tinció convencional

Les preparacions obtingudes per la metodologia descrita en l'apartat 2.3.3.2. es tenyeixen segons la tècnica clàssica per a la identificació cromosòmica.

2.3.4.2.1. Metodologia

La tècnica consisteix a cobrir les preparacions amb solució de Giemsa, al 10% en tampó Sørensen, durant 10 min. Seguidament es renten amb aigua de l'aixeta.

Després d'aquest tractament els cromosomes meiótics queden tenyits homogèniament, cosa que ens permet estudiar-ne la morfologia, longitud, el nombre, etc.

2.3.4.2.2. Fonaments

Sembla que, degut a la càrrega positiva del colorant Giemsa, aquest interacciona amb els grups fosfòrics del DNA.

2.3.5. Tècniques fotogràfiques

2.3.5.1. Microfotografia

Les preparacions són analitzades i fotografiades amb el microscopi òptic.

Els nuclis a estudiar es localitzen a pocs augments i si es consideren interessants per a la seva anàlisi es fotografien amb l'objectiu d'immersió de 100x augments.

La font de llum és un llum de tungstè de 100 W.

En les ocasions en què calgui augmentar el contrast s'utilitzen filtres d'interferència de 560-570 nm.

El temps d'exposició, podem controlar-lo obrint o tancant el diafragma, segons el grau de tinció de les preparacions.

Les pel·lícules fotogràfiques utilitzades per nosaltres són de les dites "lentes".

COPEX PAN	12 DIN	AGFA-GEVAERT
PANATOMIC X	16 DIN	KODAK

2.3.5.2. Tècniques de revelat

Aquestes tenen lloc a la cambra fosca, i dintre de tancs de revelat.

Els reactius i temps utilitzats són els següents:

- Revelador Agfa 1:19 (revelador: aigua), temps de revelat: 7-10 min, segons la temperatura ambient.
- Bany d'atur (acètic al 5%), temps: 1 min, a fi i efecte d'aturar les funcions del revelador.
- Fixador Agfa 1:4 (fixador: aigua), temps de fixació: 10 min.
- Rentat amb aigua corrent durant 30 min.
- Rentat amb humectant Photofló (Kodak) a 1'1% en aigua durant 5 min.
- Assecat a l'aire o amb assecador.

2.3.5.3. Tècniques de positivat

Es duen a terme a la càmera fosca i en cubetes de revelat.

El temps d'exposició, així com l'obertura del diafragma en el positivat, dependrà de la qualitat del negatiu, de la seva sensibilitat i també de la sensibilitat del paper a utilitzar.

El temps de revelat (revelador Agfa 1:9) té un mínim (1min) i un màxim (2 min) al voltant del qual s'ha d'aconseguir

la imatge buscada.

La resta de la tècnica és mecànica i consisteix en:

- 1 min de bany d'atur
- 30 min de rentat amb aigua corrent
- 5 min de rentat amb humectant Photofló (Kodak)
- assecat i esmaltat.

Els papers fotogràfics que s'han fet servir en aquest treball són:

AGFA-GEVAERT	Brovira-BS1	no 2
AGFA-GEVAERT	Brovira-BN1	no 3
AGFA-GEVAERT	Brovira-BH1	no 4.

3. RESULTATS

3.1. Caracterització dels nuclis profàsics i cinètica dels complexos sinaptinèmics

3.1.1. Identificació dels estadis de la profase

A partir dels individus-control estudiats (normozoospermics de fertilitat coneguda) i dels individus infèrtils amb comportament meiòtic normal, s'ha dut a terme la descripció i caracterització dels estadis de la profase meiòtica, mitjançant l'anàlisi amb microscopi òptic de la formació, morfologia i evolució dels complexos sinaptinèmics.

3.1.1.1. Leptotè

Les cèl.lules en aquest estadi presenten un nucli d'aspecte dens, mida relativament petita i forma arrodonida. A l'interior del nucli s'observen dipòsits de plata sense cap distribució específica i la presència de fragments petits i discontinus. La longitud d'aquests fragments és variable en totes les cèl.lules estudiades, però en cap cas no corresponia a complexos sencers (fig. 17). El nombre exacte de fragments per nucli era impossible de determinar, degut a la seva petita mida, però és sempre superior a 23, cosa que implica que els inicis de formació se rien a diferents zones, i no tan sols un dels extrems. L'aspecte general dels nuclis corresponia a un inici de

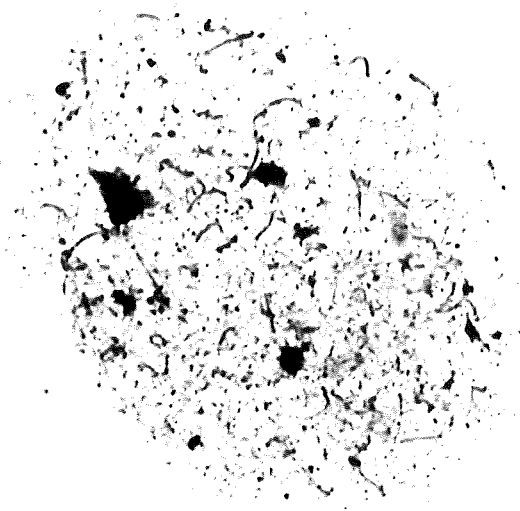


Figura 17.- Espermatòcit humà en estadi de leptotè.
Els fragments de CS a l'interior del nucli
són perfectament visibles al microscopi òptic.

l'aparició dels elements laterals, fins i tot en algunes ja es veurien petits troços de CS formats, que respectivament serien representats pels fragments primis i més gruixuts observats a l'interior dels nuclis en aquest estadi.

3.1.1.2. Zigotè

Les cèl.lules en aquest estadi presenten el seu nucli més engruixit que les leptotèniques i tenen un aspecte menys dens.

En un estadi zigotènic primerenc (fig. 18), a l'interior del nucli trobem fragments, més llargs i generalment aliniats, però a mida que l'estadi avança, els fragments apareixen més ben formats i el nucli presenta l'aspecte de un cabdell d'elements laterals junt amb troços de CS. Es pot observar una polaritat cap a una zona de la membrana, així com la formació asincrònica dels complexos: elements laterals que encara no estan del tot formats i presència de troços de CS.

En els zigotès tardencs ja són visibles alguns CS sencers (fig. 19), però també hi trobem d'altres amb zones on els elements laterals són continus però sense completar el seu aparellament; aquestes zones es van reduint a mida que l'estadi de zigotè avança.

En general, els CS presenten, doncs, un aspecte incomplet però ja estan individualitzats i ben estructurats.

El parell XY no pot ésser diferenciat de la resta d'elements; en alguns nuclis s'observa una zona més densament

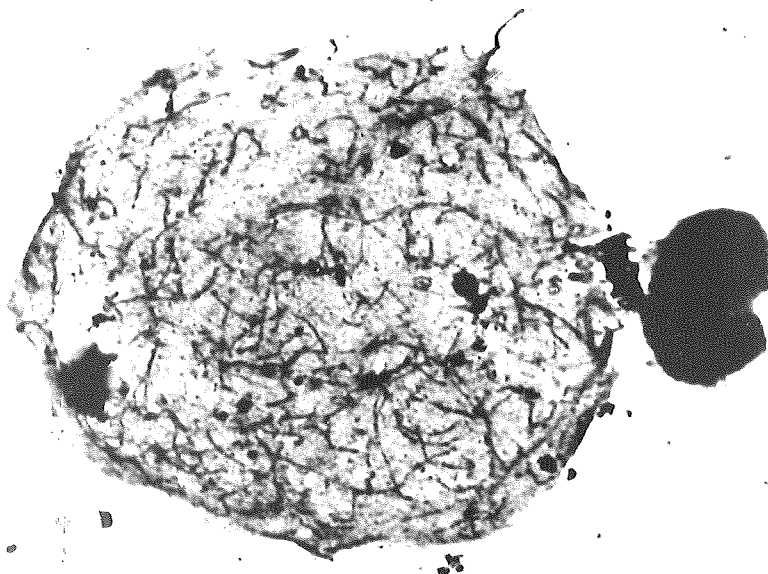


Figura 18.- Nucli zigotènic primerenc d'espermatòcit humà vist amb microscopi òptic. S'observa la polaritat dels CS, encara incomplets, a la zona inferior-dreta del nucli. Els CS presenten aspecte de cabdell.

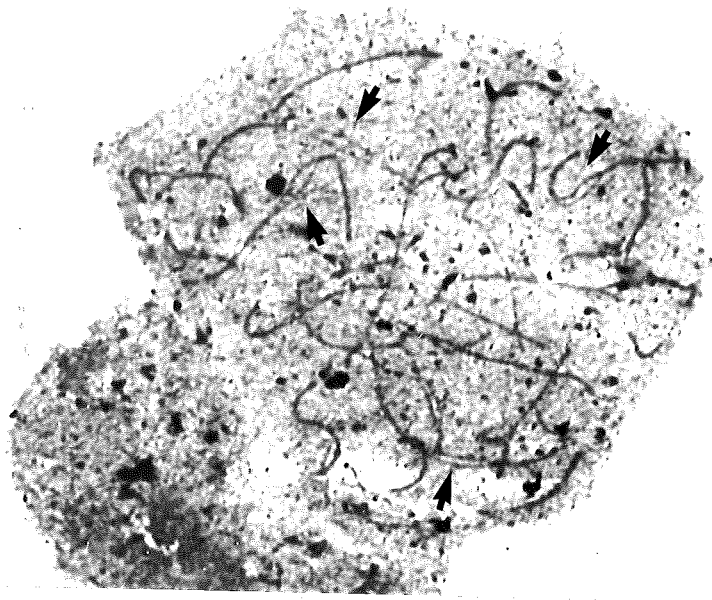


Figura 19.- Espermatòcit humà en zigotè tardenc. Les fletxes assenyalen les zones amb elements laterals dels complexos sinaptinèmics sense aparellar. Cap formació peculiar no distingeix el parell XY.

tenyida, però no es pot afirmar que sigui la regió de la vesícula sexual.

L'aspecte general dels nuclis zigotènics, podem definir-lo com el que correspon al desenvolupament dels elements laterals fins a la seva total formació i alhora el seu aparellament fins a formar el complex sinaptinèmic com a tal.

3.1.1.3. Paquitè

Aquest estadi es caracteritza pel total aparellament dels elements laterals dels complexos sinaptinèmics; per tant, les cèl.lules paquitèniques presenten al seu nucli els complexos sinaptinèmics totalment formats (figs. 20, 21). Apareixen com un element únic, ja que la resolució del microscopi òptic no permet observar la presència de l'element central i dels filaments transversals, però el seu gruix permet identificar-lo com a doble.

En espermatòcits humans paquitènics podem observar-hi 23 CS corresponents a l'aparellament dels 22 bivalents autosòmics i el parell XY.

Els 22 CS autosòmics apareixen individualitzats, poden ésser seguits en tota la seva longitud i són fàcilment mesurables. Ocasionalment presenten una modificació dels elements laterals, amb l'aspecte d'un punt més densament tenyit, que s'interpreta com la regió del cinetocor (figs. 20, 21), cosa que permet realitzar el cariotipat dels CS

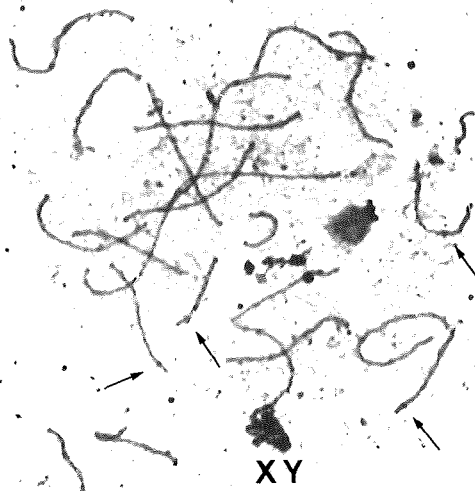


Figura 20.- Espermatòcit paquitènic humà vist amb microscopi òptic. Poden ésser identificats 23,XY elements i en alguns d'ells són visibles els cinetocors (fletxes).



Figura 21.- Espermatòcit paquitènic humà vist amb microscopi òptic. En la major part dels 22 elements autosòmics es diferencien els cinetocor (fletxes).

atenent-nos a la longitud i posició del cinetocor (veure 3.3.).

Tenint en compte que, com hem definit, l'estadi de paquitè és aquell en el qual l'aparellament cromosòmic es completa i la formació dels CS és total, qualsevol alteració en el comportament meiótic que afecti l'aparellament cromosòmic serà detectable en aquest estadi, degut a la presència d'anomalies en els CS.

En l'espècie humana, el paquitè és l'estadi de més llarga durada (16 dies, Heller i Clermont, 1964), i per tant cal tenir en compte que en aquest estadi té lloc tota una seqüència d'esdeveniments que queden reflectits a les morfologies dels CS.

A mida que el paquitè progressa, els CS autosòmics es condensen; i per tant en un paquitè tardenc els CS apareixen més densos, més curts i tenyits més foscos que en estadis anteriors.

A qualsevol estadi de paquitè la vesícula sexual apareix clarament diferenciada de la resta de CS ja que els eixos del parell XY són molt més gruixuts en comparació amb els autosòmics i presenten disposicions característiques que els identifiquen. Al microscopi òptic és difícil avaluar la mida de la regió de complex sinaptinèmic entre XY; malgrat tot, sembla que és màxima en els estadis de paquitè primerenc.

Tot al llarg del paquitè, el parell XY va presentant canvis progressius, s'observen estructures associades als seus eixos i disposicions característiques similars a les descrites al microscopi electrònic per Solari (1980). Bà-

sicament, amb la resolució que ens ofereix el microscopi òptic es poden agrupar les conformacions XY observades en quatre tipus:

Tipus A: Es caracteritza per presentar els eixos no aparellats amb aspecte lineal, ben definits i amb poques i petites modificacions. Podem identificar el petit fragment de CS entre X i Y; aquesta regió acostuma a aparèixer menys tenyida i sense modificacions dels elements laterals.

En algunes cèl.lules, la regió terminal del X es situa prop de la terminal del Y i dóna com a resultat una configuració en anell (fig. 22a).

Tipus B: Les excrecències dels eixos no aparellats són molt més accentuades i abundants, i són més nombroses a l'eix del X. La regió del CS és molt més curta i difícil d'identificar. També són freqüents les estructures anellades similars a les descrites en el tipus A (fig. 22b).

Tipus C: Els eixos comencen a fendre's, les excrecències tenen aspecte d'haver-se desintegrat, cosa que dóna lloc a petites partícules que encobreixen els eixos i en fan difícil la identificació. No és visible tampoc cap CS entre X i Y i en general tota la vesícula té l'aspecte d'un cabdell dens i embullat (fig. 22c).

Tipus D: Aquesta conformació es caracteritza per l'absència total d'excrecències als eixos, que apareixen completament esfilagarçats i fesos però d'aspecte nítid. Tampoc no es distingeix cap tipus de formació de CS entre els eixos.

En general presenta l'aparença d'una formació en xarxa (fig. 22d).

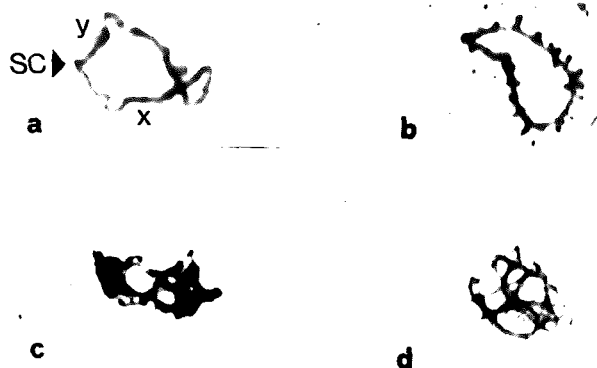


Figura 22.- Configuracions successives del parell XY al llarg de paquitè observades amb microscopi òptic:

- a) tipus A: paquitè primerenc, diferenciem l'eix X i el Y i el petit fragment de complex sinaptonèmic entre ells (CS)
- b) tipus B: paquitè mitjà, els eixos presenten excrescències i comencen a fendre's
- c) tipus C: paquitè mitjà-tardenc, els eixos apareixen entortolligats sobre ells mateixos
- d) tipus D: paquitè tardenc, eixos completament fesos, prims i també amb aspecte entortolligat.

Els quatre tipus descrits de morfologies de l'aparellament XY es desenvolupen de forma seqüencial tot al llarg del paquitè. Així doncs, al microscopi òptic, la formació del complex sinaptinèmic entre X i Y es detecta com màxima en les primeres etapes del paquitè (tipus A) i posteriorment es dona una desinapsi progressiva del parell XY (tipus B i C) fins arribar al final del paquitè en què ja no existeix CS entre els cromosomes sexuals, o és mínim, i els eixos apareixen esfilagarçats però clarament associats formant la típica vesícula sexual (tipus D).

El grau de condensació observat en els CS autosòmics i el tipus de conformació que presenta el parell XY, poden ésser utilitzats com a índex de valoració temporal, cosa que permet deduir acuradament l'estadi de qualsevol nucli paquitènic (primerenc, mitjà o tardenc); dada que tindrà importància a l'hora de valorar les possibles formacions anormals de CS en individus infèrtils.

3.1.1.4. Diplotè

Les cèl·lules en estadi de diplotè es caracteritzen per presentar al seu nucli complexos sinaptinèmics amb aspecte fragmentat (fig. 23). El nombre i mida dels fragments és molt variable però, a mida que el diplotè avança, es fan més nombrosos i més petits.

Als inicis del diplotè, on la fragmentació no és total, podem veure-hi encara CS llargs, individualitzats i ben formats. No hi ha vesícula sexual però sí uns elements

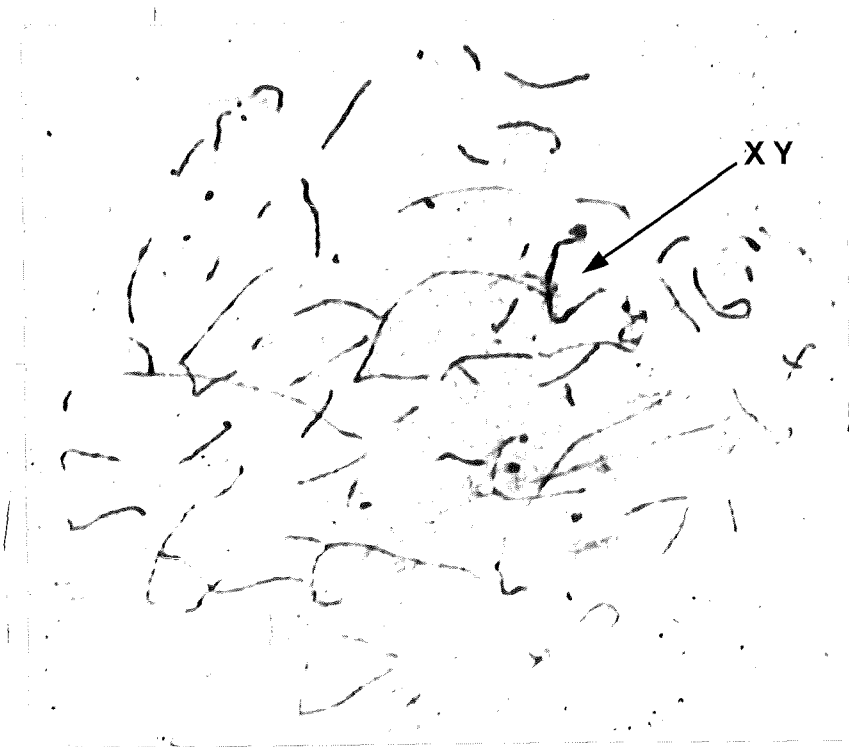


Figura 23.- Espermatòcits humans a l'estadi de diplotè.
Els fragments correspondrien a la disgregació
dels CS.

tenyits de forma més intensa i que podien correspondre a les restes dels eixos del parell XY.

Els nuclis diplotènics més avançats ja tan sols presenten petits fragments de CS en el seu interior i el nucli apareix amb aspecte granulós. En certa manera aquests nuclis en els estadis finals de diplotè recorden els leptozigotènics, però la seva mida és més gran, l'aspecte de la cromatina és menys granulosa i presenten menys dipòsits de plata al seu interior.

En cap dels nuclis estudiats hem vist la separació del complex en elements laterals individualitzats i la seva posterior degradació. Degut a la curta durada de l'estadi de diplotè en l'espècie humana, sembla ésser que té lloc la disgregació progressiva i asincrònica dels complexos sinaptinèmics sencers sense veure's la prèvia separació dels elements laterals.

3.1.2. Freqüència d'estadis profàsics

En els individus normozoospermics estudiats com a control es podien observar figures meiotiques en tots els estadis de profase (veure 3.1.1.), però amb proporció molt diferent.

Un total de 346 profases d'aquest grup d'individus varen ésser estudiades en detall (taula IV). L'estadi de paquitè era, en general, el més nombros (47,4%) seguit del de zigotè (31,8%). Molt més escassos eren els nuclis que es presentaven en l'estadi de leptotè (18,8%) i tan sols en

<u>Total cèl.lules</u>	<u>Leptotè</u>	<u>Zigotè</u>	<u>Paquitè</u>	<u>Diploè</u>
346	65	110	164	7
	18,8%	31,8%	47,4%	2%

Taula IV: Distribució d'estadis de profase en els individus control estudiats.

rars ocasions s'observaren figures diplotèniques (2%). Per terme mitjà la relació entre els estadis de zigotè/paquità era de 1/1.5.

Totes les cèl·lules estudiades en estadi de paquità en els individus control presentaven els complexos sinaptinèmics ben formats; en cap cas no s'ha detectat la presència d'anomalies d'aparellament, multivalents o univalents i el parell XY apareixia sempre associat adoptant qualsevol de les disposicions característiques descrites (3.1.1.3.).

3.1.3. Identificació i cariotipat dels complexos sinaptinèmics

Tal com hem indicat en apartats anteriors, en els nuclis en estadi de paquità els complexos sinaptinèmics es presenten de forma individualitzada, permetent-nos la seva identificació i cariotipat.

Mitjançant la tècnica d'extensió i tinció argèntica emprada per nosaltres en aquest treball, els CS paquitènics presenten una tinció de tipus uniforme. Les regions del cinetocor apareixen com una petita modificació dels elements laterals i en alguns casos poden també identificar-se les plaques terminals d'alguns CS.

Els criteris emprats per l'ordenació dels CS en un cariotip són la mida dels complexos i la posició relativa del cinetocor. La identificació individual dels complexos és difícil i els cariotips així obtinguts ens ofereixen una informació similar a la dels cariotips mitòtics obtinguts

amb tècniques clàssiques de tinció, sense bandes.

Tenint en compte aquests criteris, els complexos poden ésser ordenats en diferents grups (fig. 24). Per a cada grup, les dades considerades són:

- Grup A: Comprèn els CS número 1, 2 i 3. Format pels tres complexos sinaptinèmics de més longitud ordenats segons la seva mida.
- Grup B: Inclou els CS 4 i 5. Presenten longitud menor que l'anteriorment considerat com a número 3 i la posició del cinetocor és clarament submetacèntrica en tots dos.
- Grup C: Format pels CS 6 al 12. Grup de difícil caracterització que no permet quasi mai la total identificació en particular de cada CS. Es presenten ordenats en funció de la seva longitud i quasi sempre s'obtenen per eliminació dels altres grups.
- Grup D: Comprèn els CS 13, 14 i 15. Són complexos de mida intermèdia, fàcilment detectables per la posició acrocèntrica del cinetocor i ordenats en funció de la seva mida.
- Grup E: Format pels CS 16 al 18. Són els tres CS metacèntrics i submetacèntrics, de mida gran respecte a la resta dels no identificats encara.
- Grup F: Comprèn els CS 19 i 20. Són complexos quasi metacèntrics i de mida petita.
- Grup G: Inclou els CS 21 i 22. Són fàcilment identificables, en ser els dos únics complexos de mida petita i amb el cinetocor en posició acrocèntrica.

Parell XY: Indiscutiblement l'element de més fàcil caracterització en qualsevol nucli paquitènic. Presenta qualsevol de les disposicions típiques descrites a 3.1.1.3.

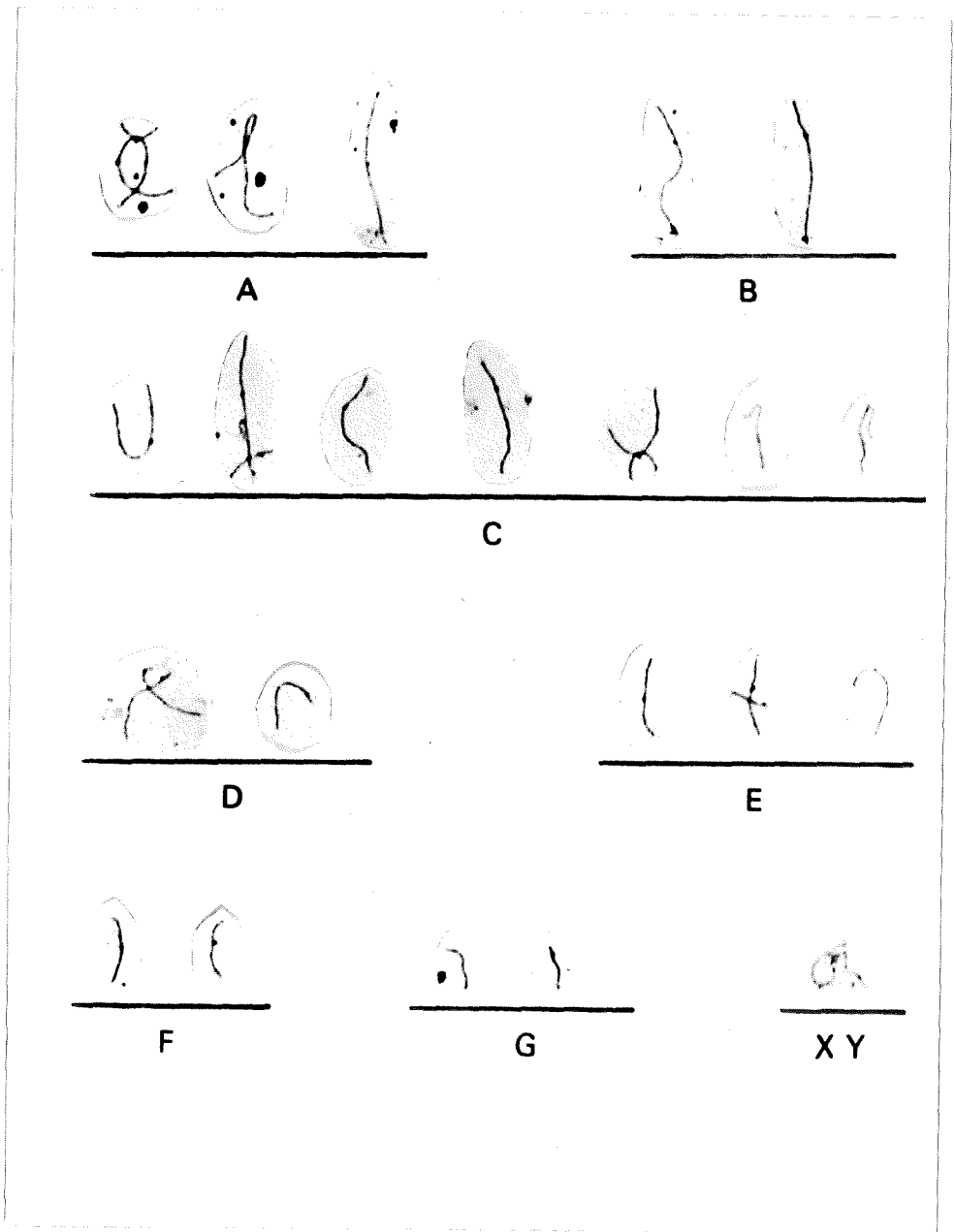


Figura 24.- Cariotip dels CS paquitènics humans analitzats amb microscopi òptic. Ordenats per grups atenint-nos a la posició del cinetocor i a la longitud relativa dels braços (compareu fig. 13 i 14).

3.2. Estudi de CS en individus infèrtils

L'estudi dels complexos sinaptinèmics al llarg de la profase I meiòtica s'ha dut a terme a fi i efecte d'obtenir informació acurada de l'aparellament cromosòmic en individus infèrtils, així com intentar detectar anomalies en la sinapsi de bivalents que podrien ésser directament implicades en certs tipus d'infertilitat masculina d'origen cromosòmic.

El nombre de divisions estudiades depenia dels individus analitzats, però el fet de treballar amb cèl.lules en estadi de profase ens ha ofert la possibilitat d'estudiar centenars de nuclis per preparació (fig. 25).

En tots els casos, les dades presentades són comparatives respecte a les descrites per als individus-control (veure 3.1.).

Els resultats obtinguts en la sèrie d'individus infèrtils estudiada per nosaltres queden reflectits a la taula V.

A efectes de descripció, hem dividit els individus infèrtils en dos grups:

- Individus infèrtils amb cariotip mitòtic normal
- Individus infèrtils portadors d'anomalies cromosòmiques

	<u>Formació normal</u> de CS	<u>Bloqueig meiòtic</u> pre-paquitènic	<u>Anomalies</u> dels CS	<u>Absència total</u> de CS
111 individus estudiats	38 (34.2%)	23 (20.8%)	32 (28.8%)	18 (16.2%)

Taula V: Sèrie de 111 individus infèrtils segons l'estudi de complexos sinaptinèmics amb microscopi òptic en biòpsia testicular.

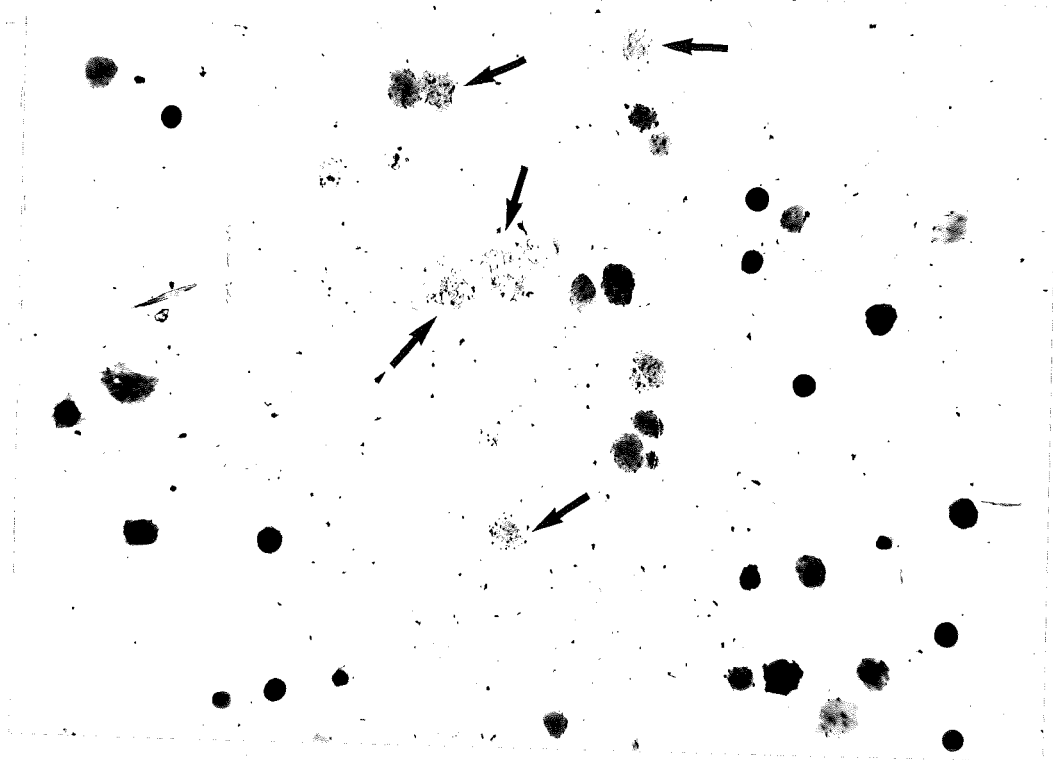


Figura 25.-- Aspecte que presenta una zona d'una preparació de biòpsia testicular humana tractada per a l'estudi de CS, observada amb microscopi òptic a petit augment (x10). Les fletxes assenyalen tots els nuclis paquitàtics que presenten complexos sinaptinèmics.