

TESIS DOCTORAL

REVERSION SEXUAL EN ESPECIMENES XX DE LA
ESPECIE Talpa occidentalis (INSECTIVORA,
MAMMALIA). CARACTERIZACION MEDIANTE ESTUDIOS
GENETICOS, SEROLOGICOS E HISTOLOGICOS.

por

RAFAEL JIMENEZ MEDINA

Departamento de Biología Animal, Ecología
y Genética. Universidad de Granada.



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Departamento de Biología Animal
Ecología y Genética

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha **17 MAR. 1989**
SALIDA NUM. 299

17/55

BIBLIOTECA	
FACULTAD DE CIENCIAS	
GRANADA	
Estante	<u>T</u>
Tabla	<u>17</u>
Núm.	<u>55</u>

TESIS DOCTORAL

TITULO: reversión sexual en especímenes xx de la especie Talpa occidentalis (Insectivora, Mammalia). Caracterización mediante estudios genéticos, serológicos e histológicos.

POR: RAFAEL JIMENEZ MEDINA

DEFENDIDA el día 11 de Febrero de 1989 ante el **TRIBUNAL** compuesto por:

PRESIDENTE: Prof. Dr. D. Antonio Rodero Franganillo. Catedrático de Genética. Universidad de Cordoba.

VOCALES:

Prof. Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz. Catedrático de Parasitología. Universidad de Granada.

Prof. Dr. D. Luis Caballero López-Lendínez. Profesor Titular de Biología Celular. Universidad de Granada.

Prof. Dr. D. Diego Llanes Ruiz. Profesor Titular de Genética. Universidad de Córdoba.

SECRETARIO: Prof. Dr. D. Juan Pedro Martínez Camacho. Prof. Titular de Genética. Universidad de Granada.

del que obtuvo la **CALIFICACION** de APTO cum laude.



BIBLIOTECA	UNIVERSITARIA
GRANADA	
Nº Documento	26967
Nº Copia	26990

REVERSION SEXUAL EN ESPECIMENES XX DE LA ESPECIE

Talpa occidentalis (INSECTIVORA, MAMMALIA).

CARACTERIZACION MEDIANTE ESTUDIOS GENETICOS,

SEROLOGICOS E HISTOLOGICOS.

por

Rafael Jiménez Medina

Departamento de Biología Animal, Ecología y Genética

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD DE GRANADA

--1989--

REVERSION SEXUAL EN ESPECIMENES XX DE LA ESPECIE

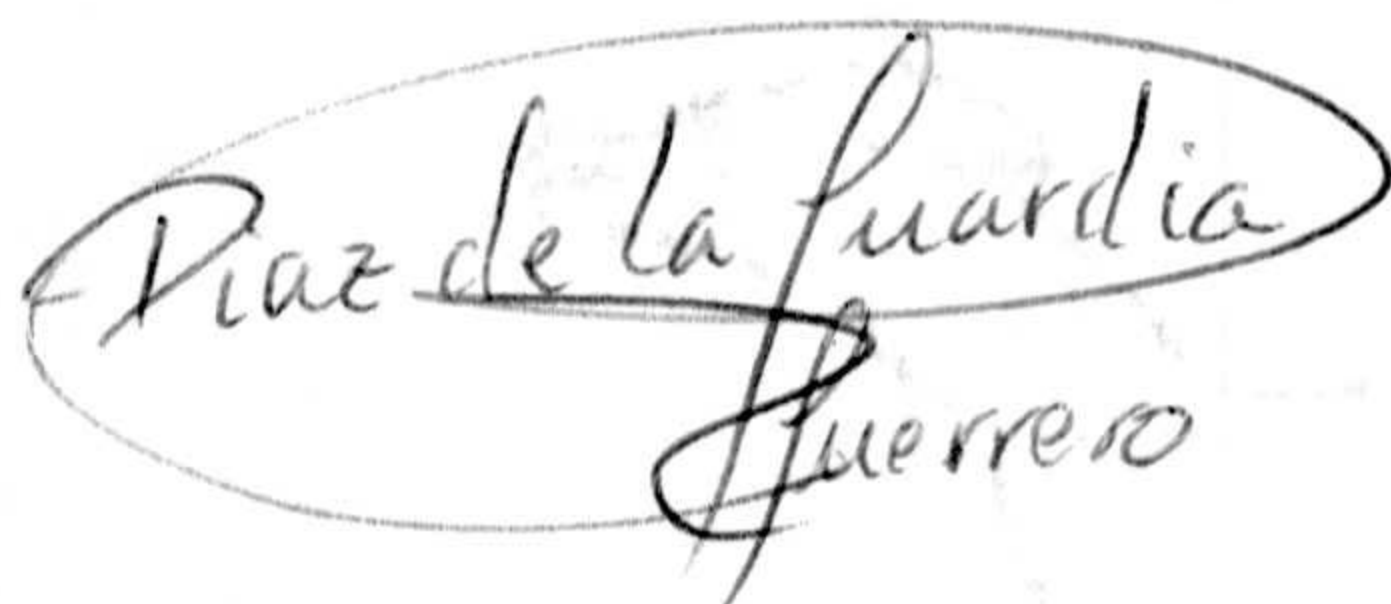
Talpa occidentalis (INSECTIVORA, MAMMALIA).

CARACTERIZACION MEDIANTE ESTUDIOS GENETICOS,

SEROLOGICOS E HISTOLOGICOS.

Dirigida por los Doctores

D. Rafael Díaz de la
Guardia Guerrero

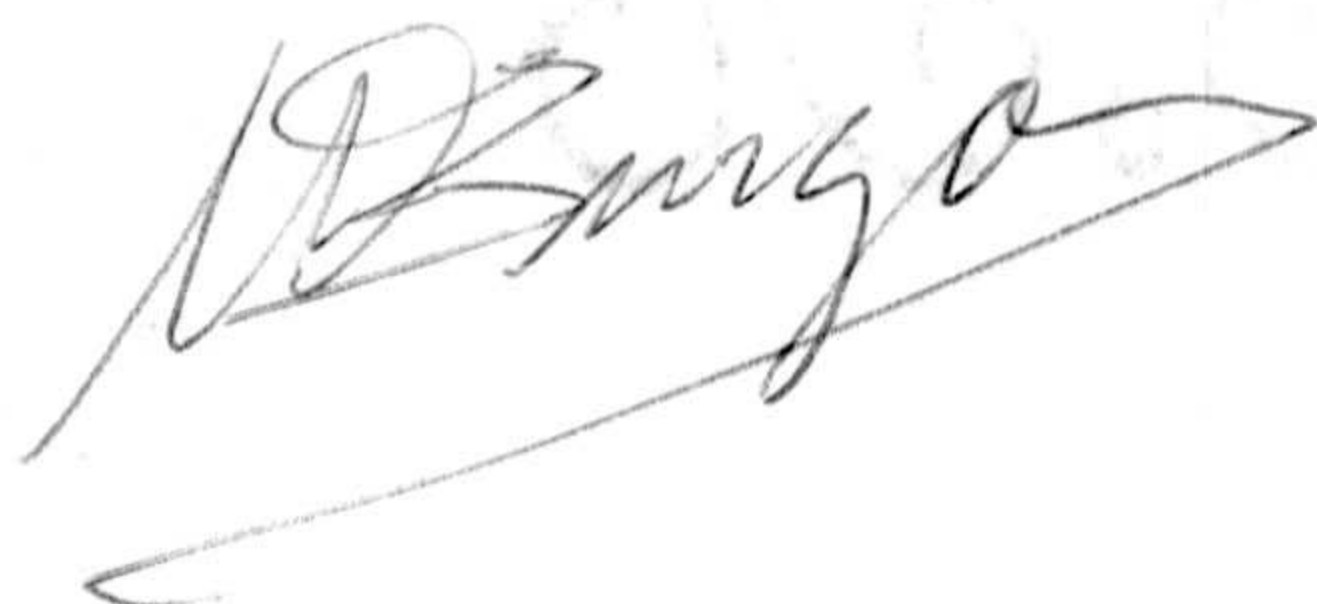
Handwritten signature of Rafael Díaz de la Guardia Guerrero, enclosed in an oval.

Memoria que, para aspirar
al grado de Doctor en Cien-
cias, presenta el Licencia-
do Rafael Jiménez Medina.
Departamento de Biología
Animal, Ecología y Genéti-
ca. Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.

Febrero 1989

Handwritten signature of Rafael Jiménez Medina.

D. Miguel Burgos Poyatos

Handwritten signature of Miguel Burgos Poyatos.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Animal, Ecología y Genética de la Universidad de Granada durante los años 1983-1988. En la actualidad el doctorando disfruta de una beca del Plan de Formación del Personal Investigador, concedida por la Junta de Andalucía en la convocatoria de 1986, dentro del área de Producción Animal del Programa Complementario.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en las XIX, XXI, XXII y XXIII Jornadas Luso-Españolas de Genética, celebradas en Coimbra (1983), Vila Real (1985), Oviedo (1986) y Lisboa (1987) respectivamente. Otros han sido publicados en revistas tales como *Heredity* (1988) y *Genetical Research* (1988).

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento

a los Doctores D. Rafael Díaz de la Guardia y Gorrero y D. Miguel Burgos Poyatos por el elevado valor científico de su labor en la dirección de éste trabajo y por su constante apoyo en los momentos difíciles del mismo y, sobre todo, por su profunda amistad,

al Doctor D. Luis Caballero López-Lendínez por facilitar mi iniciación en las técnicas histológicas, así como a D. Juan José Marín López por su colaboración en estas tareas,

al Doctor D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz por poner a mi disposición su laboratorio, lo que me ha permitido el aprendizaje de las técnicas de cultivos de tejidos y serología,

a D. Antonio Sánchez Baca por su sincera amistad y por su valiosa colaboración en diversos aspectos de este trabajo

y finalmente, al resto de miembros de este Departamento, en especial a los Doctores D. Juan Pedro Martínez Camacho, D^a Esther Viseras Alarcón y D^a Josefa Cabrero Hurtado y a D. Sebastián Cuadros Plata por su constante aliento.

Amoroso
y
caro
padre

A Irma

A mis padres y hermanos

INDICE

INTRODUCCION

Determinismo genético del sexo en animales	1
Mecanismos de diferenciación sexual en mamíferos	3
La diferenciación sexual primaria o gonadal	4
Reversión sexual de machos XX en mamíferos	17

OBJETIVOS	23
-----------	----

MATERIAL Y METODOS

Material analizado	24
Métodos utilizados	
Métodos de captura	28
Estudio de la mitosis	29
Animales colchicinados in vivo	30
Animales tratados con levaduras	31
Cultivos de médula ósea	32
Cultivos de fibroblastos	33
Cultivos de leucocitos	36
Soluciones y medios de cultivo	37
Fijación	40
Extensiones	41
Estudio de la meiosis en machos	41
Técnica I	42
Técnica II	43
Bandeo G	44
Bandeo C	46
Tinción argéntica de las NORs	46
Tinción secuencial NOR-Giemsa	47
Técnicas de fluorescencia	48
Tinción con CMA	48
Tinción triple	49

Complejos sinaptonémicos para M.E.T	50
Suspensión de espermatoцитos	51
Portas plastificados	52
Soluciones	53
Microextensión	53
Tinción	55
Montaje de las rejillas	56
Recuento de espermatozoides	58
Estimación de las edades	59
Técnicas histológicas	59

RESULTADOS

Estudios citogenéticos	
Cariotipo	60
Bandas G	61
Bandas C	61
NORs	62
Fluorocromos	64
Meiosis	65
Complejos sinaptonémicos	69
Subdivisión de la profase I	70
Evolución del bivalente sexual	77
Estudios anatómicos y de fertilidad	
Machos normales	80
Machos XX	89
Hembras	89
Intersexos	90
Estudios histológicos de las gónadas	
Machos normales	95
Machos XX	98
Hembras	99
Intersexos	100
Niveles de antígenos masculinos (SDM)	103

DISCUSION

Variabilidad de la expresión NOR	106
Estudio de la meiosis	110
Reversión sexual	123

CONCLUSIONES	141
--------------	-----

BIBLIOGRAFIA	144
--------------	-----



INTRODUCCION

INTRODUCCION

DETERMINISMO GENETICO DEL SEXO EN ANIMALES

Aunque la presencia de sexos separados en las especies animales y su relación con la procreación son fenómenos que el hombre ha conocido desde el principio de su existencia, fué Mendel, en 1870, quien sugirió por primera vez que el carácter "sexo" podría estar determinado genéticamente, de forma similar a otros caracteres.

Por "determinismo genético del sexo" se entiende el conjunto de factores y mecanismos genéticos que determinan el carácter "sexo" en un individuo, siendo la "diferenciación sexual", la expresión fenotípica de dicha constitución genética. A partir del descubrimiento de los cromosomas sexuales, a los que se denominó X e Y (McClung, 1901, 1902; Wilson, 1905; Stevens, 1905), y de su relación con el sexo, fué tomando consistencia la idea de considerar a éste como un carácter mendeliano más, aunque pronto se comprobó que su expresión era mucho más compleja de lo que hasta entonces se pensaba.

En 1939, Hartmann planteó la teoría básica de la determinación genética del sexo a la que llamó "ley de la potencia bisexual de ambos sexos", según la cual, determinados "realizadores sexuales" (F y M) son los encargados de inducir al organismo (con capacidad para diferenciarse en ambos sexos) a adquirir las características de uno de ellos (dando lugar a un macho o a una hembra) o de ambos simultáneamente (originando un intersexo o un hermafrodita).

Como señala Westergaad (1958), la expresión del sexo es un

fenómeno cuantitativo en el que la masculinidad o la feminidad se expresan en gradación variable (lo cual tiene su máxima expresión en los intersexos), cosa que resulta difícilmente conciliable con la clara separación cualitativa que muestran ambos sexos. La solución a esta controversia se encontró al reconsiderar y admitir el dualismo que estableció Muller (1932) quien postulaba la existencia de dos tipos de genes sexuales: los "genes que deciden el sexo", localizados en los cromosomas sexuales (X o Y o ambos) y los "genes básicos para el sexo" con loci en los autosomas y en los cromosomas sexuales.

Darlington (1931, 1932) sugirió la necesidad de la heterocigosis estructural del sexo heterogamético, concepto según el cual entre ambos cromosomas sexuales debe de existir un segmento diferencial (no apareante), dentro del cual no pueda llevarse a cabo la recombinación, hipótesis que ha sido demostrada posteriormente en muy diversos grupos de organismos.

A partir de sus observaciones en *Drosophila melanogaster*, Bridges (1925, 1932) desarrolló el concepto de "equilibrio génico" según el cual el fenotipo sexual final depende no sólo de la presencia de los cromosomas sexuales, sino también del equilibrio entre éstos y los autosomas, de modo que alteraciones en este equilibrio originan en *Drosophila* la aparición de formas intermedias (intersexos) o extremas (metahembras y metamachos). Bridges demostró también que el cromosoma Y era inerte respecto a la determinación del sexo, puesto que los individuos XO eran machos, aunque estériles. En otras especies sin embargo, el cromosoma Y es realmente determinante del sexo, tal como ocurre en mamíferos, en los cuales está claramente demostrado un determinismo sexual del tipo XX/XY en donde el sexo masculino corresponde a la forma heterogamética y el femenino a la homogamética.



En relación con el origen y evolución de los cromosomas sexuales, Ohno (1967, 1969) llegó a la conclusión de que los cromosomas sexuales de los vertebrados proceden originariamente de un par de autosomas, basándose en una serie de hechos tales como la ausencia de determinismo sexual cromosómico en ciertos teleosteos, la ausencia de cromosomas sexuales citológicamente detectables en los vertebrados inferiores, la posibilidad de intercambio de la condición heterogamética entre los sexos masculino y femenino, y la homología parcial entre el X y el Y (o entre el Z y el W).

Mecanismos de diferenciación sexual en mamíferos

En general, la dotación de cromosomas sexuales constituye en cada organismo lo que podemos considerar como sexo genético. En un patrón normal de desarrollo, esta información genética origina una diferenciación gonadal o diferenciación sexual primaria, la cual a su vez determina y dirige el desarrollo de los órganos sexuales secundarios, produciéndose finalmente la diferenciación sexual del organismo, entendida ésta como la expresión fenotípica de los caracteres sexuales propios de cada sexo.

Tal como había postulado Hartmann (1939), los embriones de mamíferos mantienen, hasta una determinada fase de su desarrollo, una potencia bisexual que les permite iniciar la diferenciación masculina o femenina. Así, en el primordio gonadal están presentes los conductos de Wolff (precursores de las estructuras masculinas del tracto urogenital tales como epidídimo y vesícula seminal), junto con los conductos de Muller (precursores de los oviductos y el útero), de modo que el proceso de diferenciación sexual consistirá en el desarrollo de uno de estos tipos de conductos y la regresión

de los alternativos. La capacidad de reversión de las características sexuales de los órganos del tracto urogenital fué puesta de manifiesto por Jost (1947, 1960). Este autor observó en sus experiencias con conejos que tras la extirpación de los testículos, los embriones macho desarrollaban oviductos y útero, pero si a estos embriones castrados se les inyectaba testosterona (hormona sexual masculina producida por los testículos), se restauraba parcialmente el sexo masculino. Contrariamente, si a embriones hembra se les extirpaban los ovarios, mantenían el desarrollo de los caracteres propios del sexo femenino. Es obvio pues, que la presencia de los testículos es necesaria para un perfecto desarrollo de los caracteres sexuales masculinos, es decir, de la diferenciación de los conductos de Wolff (gracias a la testosterona testicular producida por las células de Leydig) y la regresión de los de Muller (a consecuencia de la AMH u hormona antimulleriana, producida por las células de Sertoli). Por el contrario, la diferenciación de los conductos de Muller en el desarrollo femenino (o más concretamente del sexo homogamético), no necesita inducción hormonal para llevarse a cabo.

Estos experimentos venían a demostrar que el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, y en consecuencia, de la diferenciación sexual, está en función de los productos hormonales gonadales, por lo que previamente es necesaria la diferenciación del primordio gonadal hacia testículo u ovario.

La diferenciación sexual primaria o gonadal

El primer avance digno de mención en el estudio del proceso de la diferenciación sexual primaria se produjo a principios de siglo con los trabajos de Lillie (1917) y de Keller y

Tandler (1917) acerca del fenómeno conocido como "freemartin". Con este nombre se designó a terneras que nacían sexualmente anormales y eran hermanas gemelas de terneros normales. Estas presentan fenotipo externo femenino, pero internamente tienen ovotestes y son consecuentemente estériles. Este fenómeno se produce cuando existe anastomosis vascular entre las placentas de ambos hermanos gemelos (dicigóticos). En una primera interpretación, estos autores sugirieron que la anomalía era consecuencia del trasvase hormonal del macho a su hermana. Posteriormente se ha comprobado que la testosterona tiene la capacidad de producir un completo desarrollo de las características masculinas en embriones hembra, pero no de alterar el desarrollo ovárico de los mismos. Actúa por tanto sólo a nivel de la diferenciación sexual secundaria, pero no tiene capacidad para alterar los caracteres sexuales primarios, es decir, el tipo de gónada presente en el organismo. Cosecuentemente, había que admitir la existencia de otro tipo de sustancia relacionada con el sexo que estuviera presente en los machos y no en las hembras y que, en contacto con el feto femenino, fuese capaz de alterar su organogénesis ovárica.

Eichwald y Silmser (1955) descubrieron que las hembras de ratón rechazaban transplantes de piel precedentes de los machos, pero no de las hembras, en una línea consanguínea. También fueron observados fenómenos similares de rechazo de transplantes de machos a hembras en líneas consanguíneas de ratas (Billingham y Silvers, 1959) y de aves (Gilmore, 1967). Estos rechazos se atribuyeron al antígeno conocido como H-Y (Histocompatibility-Y-Antigen)(Eichwald y Silmser, 1955) puesto que tal antígeno se sabe que está presente en los machos y en los individuos "freemartin" y ausente en las hembras. Del mismo modo, numerosos autores postularon que el antígeno H-Y era responsable de la diferenciación masculina

del primordio gonadal (Wachtel y col., 1975 a y b; Ohno, 1976; Wachtel, 1977; Koo y col., 1977; Silvers y Wachtel, 1977).

Varias evidencias experimentales apoyaban esta idea. Así, Ohno y col. (1978) en ratones y Zenzes y col. (1978) en ratas, comprueban que la ausencia de antígeno H-Y induce a las células testiculares a organizarse en estructuras semejantes a folículos ováricos, proceso que revierte al restaurar de nuevo los niveles de antígeno. Otra experiencia semejante fué la llevada a cabo por Ohno y col. (1979). Estos autores mantuvieron en cultivo, durante cinco días, gónadas indiferenciadas provenientes de embriones XX comprobando que si a dicho cultivo se le añadía antígeno H-Y, se diferenciaba hacia testículo.

A la vista de éstos y otros resultados, varios autores han admitido que el antígeno H-Y era el determinante principal de la diferenciación gonadal masculina (Ohno y col., 1979; Wolf y col., 1980 y 1981; Wachtel, 1982).

Una vez admitido esto, surgieron cuestiones como ¿bajo qué control genético se produce el antígeno H-Y?, ¿por qué se produce en machos y no en hembras?. En mamíferos, los cariotipos de macho y hembra son fácilmente discernibles gracias a los cromosomas sexuales. La correlación entre la existencia del cromosoma Y y del antígeno H-Y sólo en machos llevó a la interpretación de que éste estaba determinado por un gen o familia de genes situados en el cromosoma Y (Wachtel y col., 1975b). A partir de aquí, surge otra interrogante: ¿se trata de genes estructurales o de genes reguladores?. Para abordar esta cuestión se llevan a cabo, aún en la actualidad, numerosos estudios de mutantes con una dotación anormal de cromosomas sexuales, o con una expresión fenotípica del sexo no acorde con su constitución

cromosómica.

De sus experiencias, Celada y Welshous (1963) concluyen que la expresión del antígeno H-Y no depende del cromosoma X puesto que ratones XXY tienen iguales niveles antigénicos que los normales XY, mientras, que en los especímenes XO, el antígeno no existe. En el mismo sentido, Hildemann y col. (1970) defienden que el antígeno H-Y no solo está determinado por un gen del cromosoma Y, sino que puede tener diferentes formas alélicas en machos de diferentes razas.

Según Bennett y col. (1975), el cromosoma Y es el portador del gen o genes estructurales del antígeno H-Y, idea compartida también por Wachtel (1977) al comprobar que, en leucocitos humanos, existe una correlación entre el número de cromosomas Y de la dotación cromosómica y la cantidad de antígeno H-Y. Sin embargo, varias observaciones tanto en humanos como en otras especies contradicen esta hipótesis puesto que, en estos casos, la presencia de H-Y serológicamente detectable no está asociado con la existencia de cromosoma Y o bien, no siempre su presencia determina el sexo masculino.

Así, en la especie *Ellobius lutescens* ($2n=17$), tanto los machos como las hembras son 16,XO (Matthey, 1964; Castro-Sierra y Wolf, 1968), aunque los machos son H-Y positivos mientras que las hembras no lo son. Por otra parte, el antígeno H-Y se ha detectado en hembras fértiles (de la Chapelle y col., 1978), en pacientes con síndrome de Turner 45,XO (Wolf y col., 1980b; Wachtel y col., 1980), en hembras XO de ratón (Engel y col., 1981) y en yeguas fértiles con constitución XY (Sharp y col., 1980).

Para explicar la presencia de antígeno H-Y en individuos en desarrollo sexual femenino, se ha sugerido que la

diferenciación testicular no solo requiere la presencia del antígeno sino que, además, es necesario que éste se encuentre a unos determinados niveles de concentración, por debajo de los cuales se lleva a cabo la diferenciación ovárica. Para explicar la presencia de niveles bajos de antígeno H-Y, Wolf y col. (1980b) sugieren que el gen estructural del mismo es probablemente autosómico y su expresión está regulada por la acción de un gen con efecto represor situado en el cromosoma X y la de un gen activador situado en el Y. El gen regulador del cromosoma X escaparía al efecto de inactivación (Lyonización), por lo que en hembras XX el efecto represor es mayor que en hembras XO, lo que facilita que en estas últimas se produzcan ciertos niveles de antígeno. Este modelo de regulación por genes antagónicos había sido propuesto con anterioridad por Polani (1962), Hamerton (1968) y Boczkowski (1971). Sharp y col. (1980) sugieren que el desarrollo ovárico en presencia de antígeno H-Y puede producirse como consecuencia de un fallo en el reconocimiento antígeno-receptor en las membranas celulares ya que el antígeno H-Y no es constitutivo de la membrana, sino que se une a ella mediante un receptor específico. Además, estos autores mantienen que los niveles bajos de antígeno se pueden comprender incluso aunque el gen estructural esté en el cromosoma Y, pues basta con admitir que no se trata de un solo gen, sino de una "familia" de genes. Así, la supresión por mutación o pérdida de una parte considerable de estos genes, originaría antígeno H-Y en pequeña concentración.

Un caso especialmente interesante en cuanto a anomalías en el determinismo del sexo se refiere, es el del roedor *Myopus schisticolor*, en el que se ha descrito la existencia de machos normales XY, hembras normales XX, hembras fértiles XY y hembras XO (Fredga y col., 1976).

Wachtel y col. (1976) llegan a la conclusión de que las hembras XY de *M. schisticolor* son H-Y negativas, resultados que no concuerdan con los de Wiberg y col. (1982), quienes encuentran que el antígeno H-Y no solo está presente en los machos XY, sino también en las hembras XY, en las XO y en algunas XX, si bien en estas últimas se encontraba en niveles más bajos. Con objeto de dar una explicación lógica a estas observaciones, los autores postulan que al menos son necesarios cuatro genes para controlar la diferenciación del primordio gonadal (Figs. 1a y 1b):

-a) Un gen estructural para el antígeno H-Y no localizado en el cromosoma Y.

-b) Un gen regulador con efecto represor, localizado en el cromosoma X.

-c) Un gen regulador con efecto activador situado en el cromosoma Y (la activación puede ser consecuencia del bloqueo o neutralización del represor).

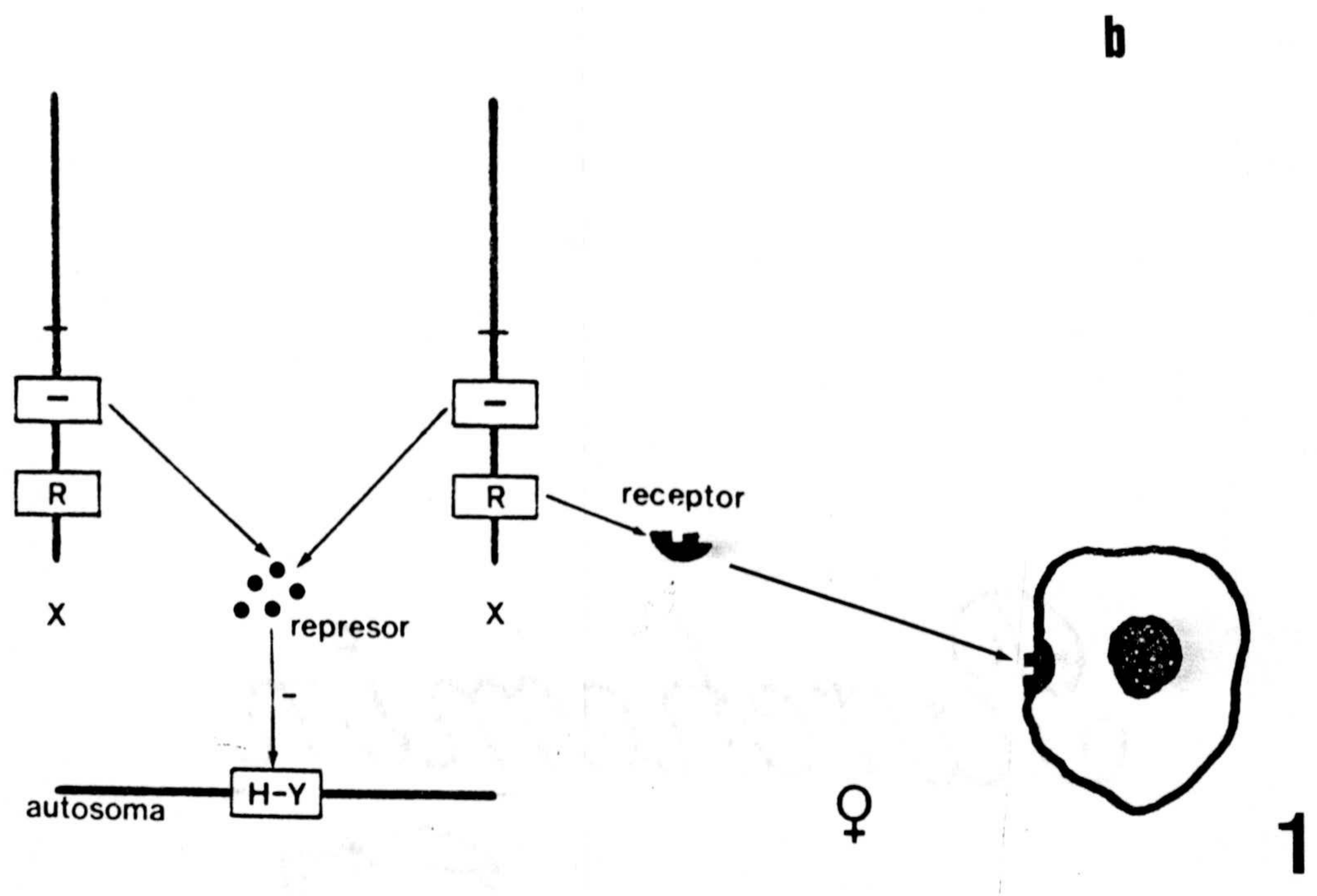
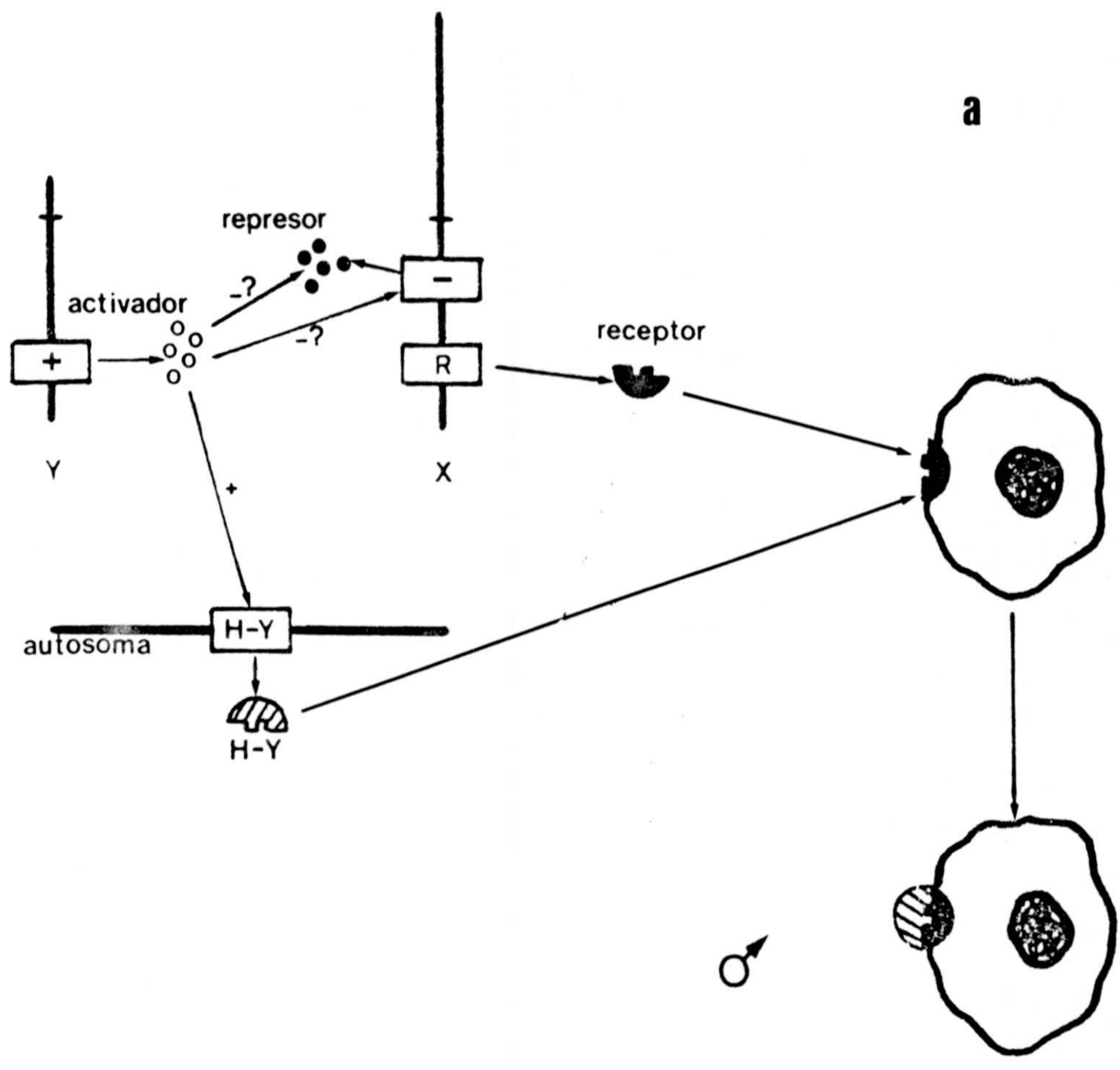
-d) Un gen o genes ligados al cromosoma X e implicados en la producción del receptor específico de membrana.

De acuerdo con este modelo, las hembras con niveles altos de antígeno H-Y no desarrollan testículos debido a un supuesto fallo en el reconocimiento del antígeno por parte del receptor celular específico.

Adinolfi y col. (1982) modifican posteriormente este modelo sugiriendo la existencia de un locus autosómico específico para la producción de un precursor del antígeno H-Y, al que denominan H-Yp (Figs. 2a y 2b), el cual puede dar respuesta positiva en los tests serológicos para la detección del antígeno H-Y, pero no posee la capacidad, por sí solo, de

Fig. 1.- Modelo de Wachtel y col. (1976) para el determinismo genético del sexo. El modo de actuación de los distintos componentes genéticos está explicado en el texto.





inducir la diferenciación testicular. El H-Yp es madurado a H-Y por la acción del producto de un gen localizado en el cromosoma Y en los machos XY, mientras que otro gen, situado en el X, convierte al H-Yp en H-Yr, el cual carece de la capacidad para inducir la diferenciación testicular y no da reacción serológica positiva. Mediante este modelo, los autores consiguen explicar la existencia de hembras H-Y positivas (H-Yp). En el proceso de regulación, el producto del gen del cromosoma Y debe inactivar al gen del cromosoma X o neutralizar la acción de su producto. En ausencia del cromosoma Y, el producto del gen del cromosoma X transforma al precursor H-Yp en H-Yr, impidiendo así la diferenciación testicular primaria y propiciando por tanto la diferenciación ovárica femenina.

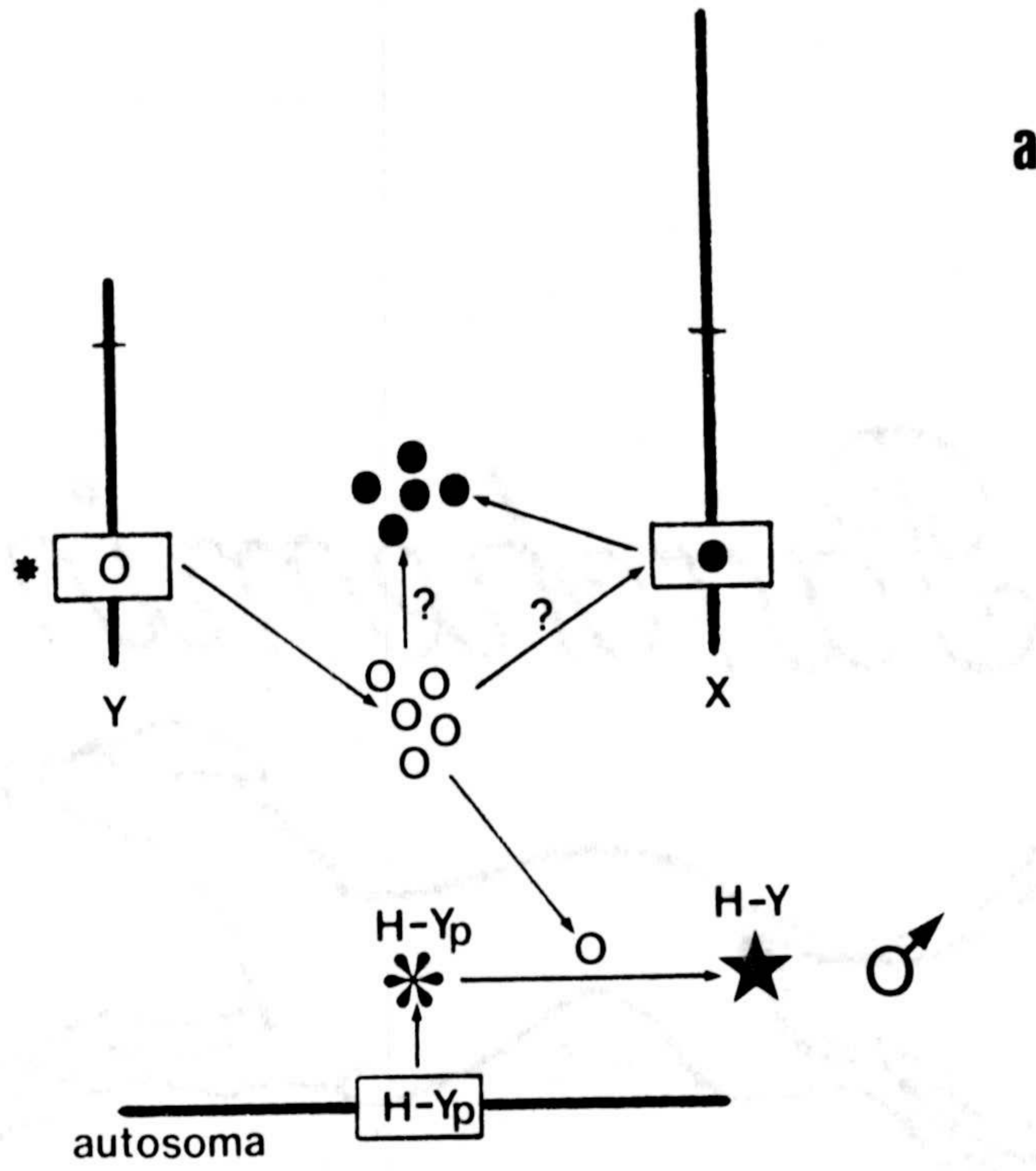
Todos estos trabajos se realizaron bajo la asunción de que el antígeno H-Y es el determinante primario del sexo en mamíferos, o más ampliamente expresado, el determinante del sexo heterogamético (Mittwoch, 1983). Sin embargo, investigaciones realizadas por distintos autores en los últimos años, han puesto en tela de juicio esta afirmación.

Así, Shapiro y Erickson (1981) demuestran que el determinante serológico del antígeno H-Y no es una proteína, sino un hidrato de carbono. Células de bazo tratadas con enzimas proteolíticos, tales como tripsina, α -quimotripsina o termolisina, muestran siempre los mismos niveles de antígeno H-Y detectable serológicamente, que las células no tratadas con estos enzimas, mientras que la respuesta serológica se altera cuando el tratamiento se hace con β -galactosidasa y galacto-oxidasa.

Estos resultados llevaron a la conclusión de que el antígeno H-Y, o al menos el componente del mismo capaz de dar tal respuesta serológica, no puede ser, lógicamente, el

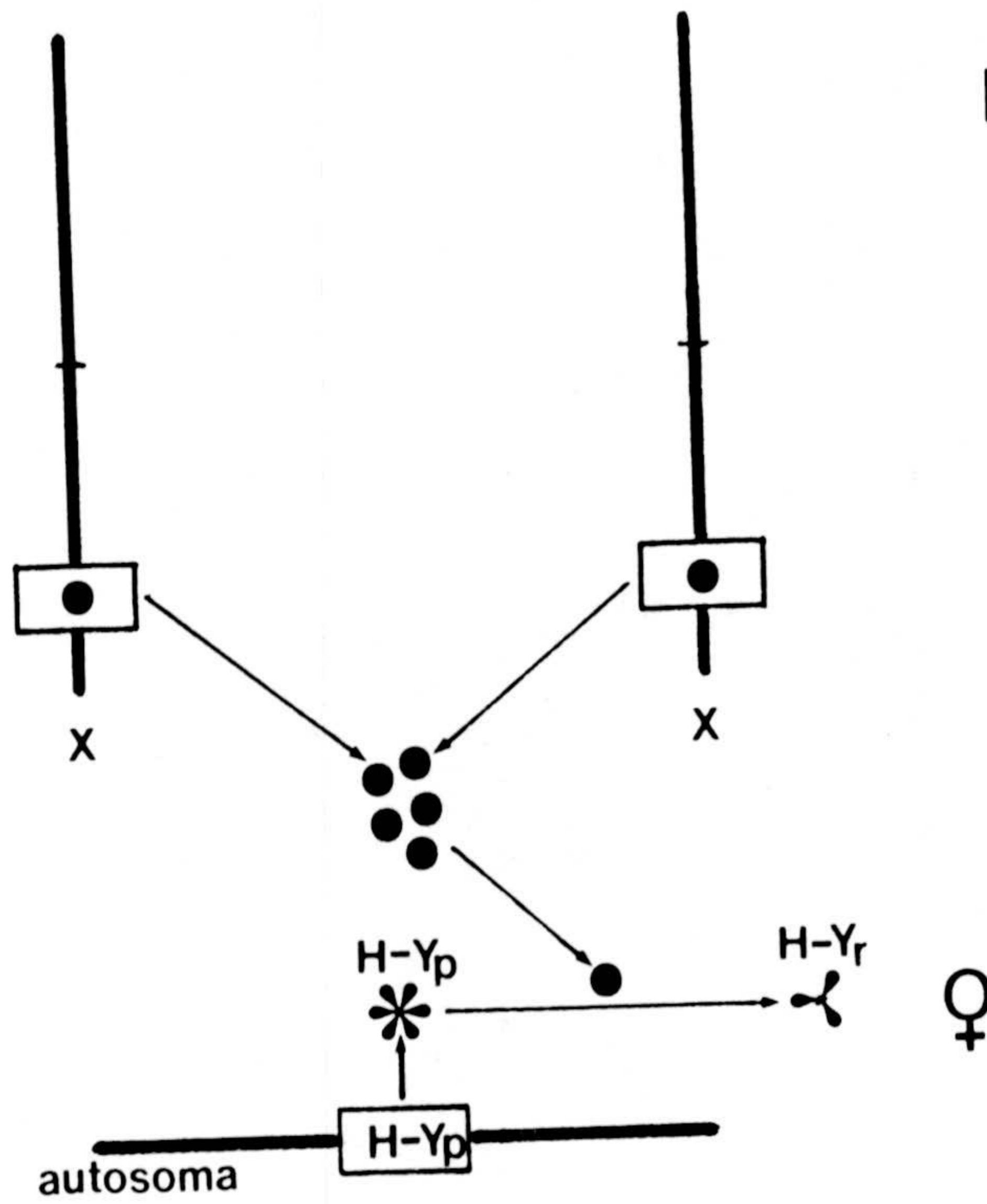
Fig. 2.- Modelo de Adinolfi y col. (1982) para el determinismo genético del sexo (ver texto).





* Posibles formas de actuación:

- Actuación sobre H-Y_p antes que el localizado en el X.^p
- Actuación sobre H-Y_p y bloqueo del gen del X.
- Neutralización del gen del X.



producto primario de un gen.

Como fué referido antes, el antígeno H-Y se detectó como consecuencia de unas experiencias de transplante de piel entre ratones macho y hembra de una misma estirpe consanguínea, y se consideró de forma general que el antígeno detectable por métodos serológicos, coincidía con el antígeno H-Y. Sin embargo, Melvold y col. (1977) pudieron demostrar que un ratón macho portador de pequeños testículos, y que además daba reacción positiva en los tests serológicos, no inducía el rechazo de sus transplantes de piel a sus hermanas consanguíneas. Esto llevó a los autores a sugerir que ambas técnicas llevan a la detección de antígenos diferentes, es decir, el antígeno responsable del rechazo de transplantes es distinto del que se detecta por métodos serológicos.

Esta misma opinión es defendida por Silvers y col. (1982), quienes sugieren que el término antígeno H-Y debería ser utilizado para designar solamente al antígeno responsable del rechazo de transplantes, mientras que el detectable serológicamente podría ser designado como antígeno "SDM" (Serologically Detectable Male antigen), para diferenciarlo claramente del anterior. Estos autores además ponen en duda que cualquiera de estas sustancias sea el responsable primario de la diferenciación gonadal del sexo heterogamético.

Aún más significativos son los resultados obtenidos por McLaren y col. (1984). Estos autores demuestran, utilizando ratones mutantes "Sxr" (sex reversal), que el antígeno H-Y está ausente en ciertos ratones que desarrollan testículos y que presentan un indiscutible fenotipo macho. Al hilo de estas investigaciones, Burgoyne y col. (1986) demuestran que los ratones machos H-Y negativos, además de perder la

información genética que codifica para el antígeno H-Y, también han perdido la necesaria para la espermatogénesis. Según los autores, estos resultados identifican un gen en el cromosoma Y de ratón, distinto del gen determinante de testículos, que es necesario para la espermatogénesis y propicia la posibilidad de que el producto de este "gen de la espermatogénesis" sea el antígeno H-Y.

Todas estas evidencias han inclinado a otros investigadores a proponer nuevos modelos teóricos para la diferenciación gonadal, que puedan explicar los distintos casos anómalos olvidándose del antígeno H-Y como determinante de la diferenciación testicular en mamíferos.

Uno de estos modelos es el sugerido por Eicher y Washburn (1983), según el cual, actuarían los siguientes componentes (Figs. 3a y 3b):

-a) Un gen denominado "Tdy" (testis determining gene), determinante de testículos y localizado en el cromosoma Y.

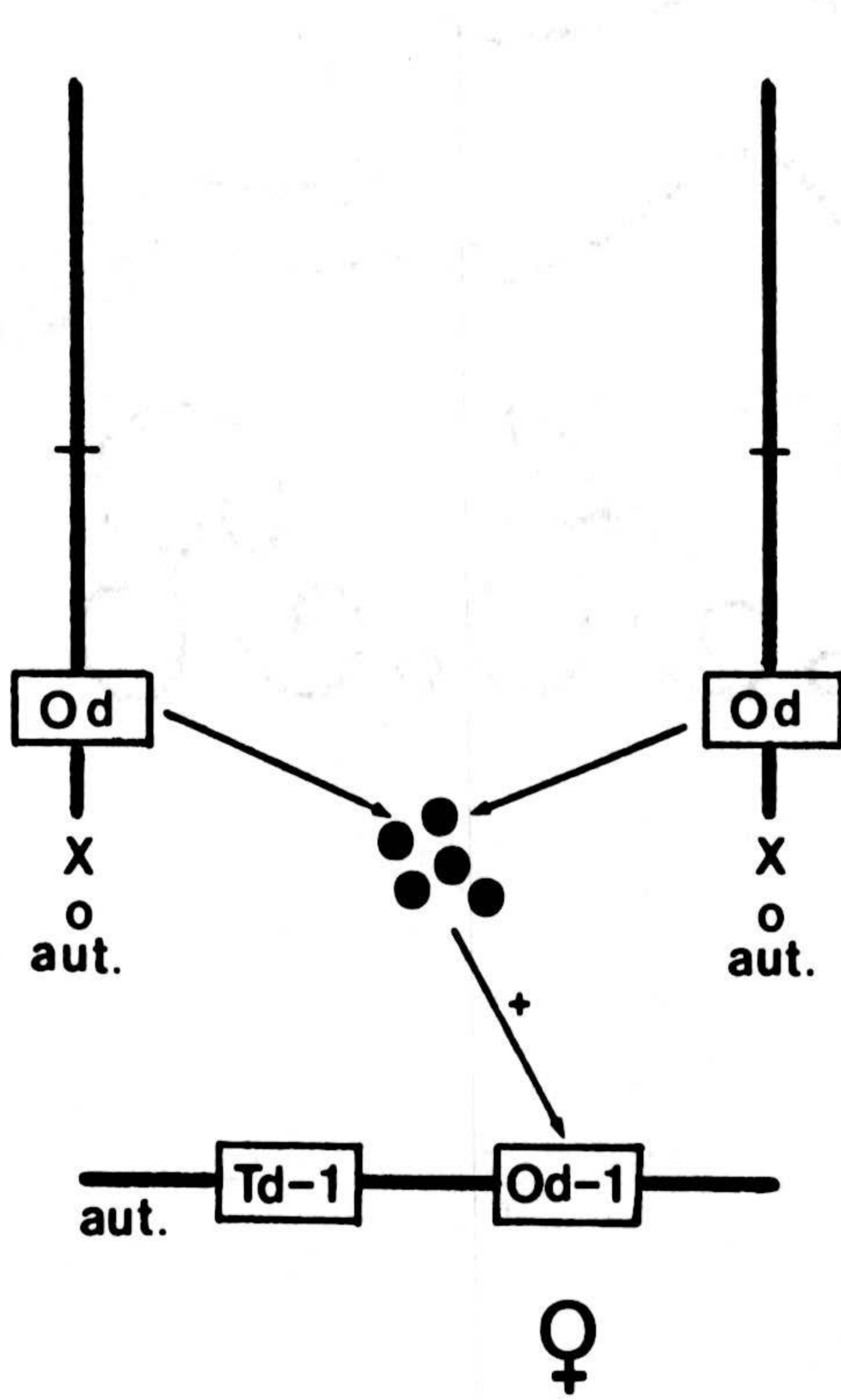
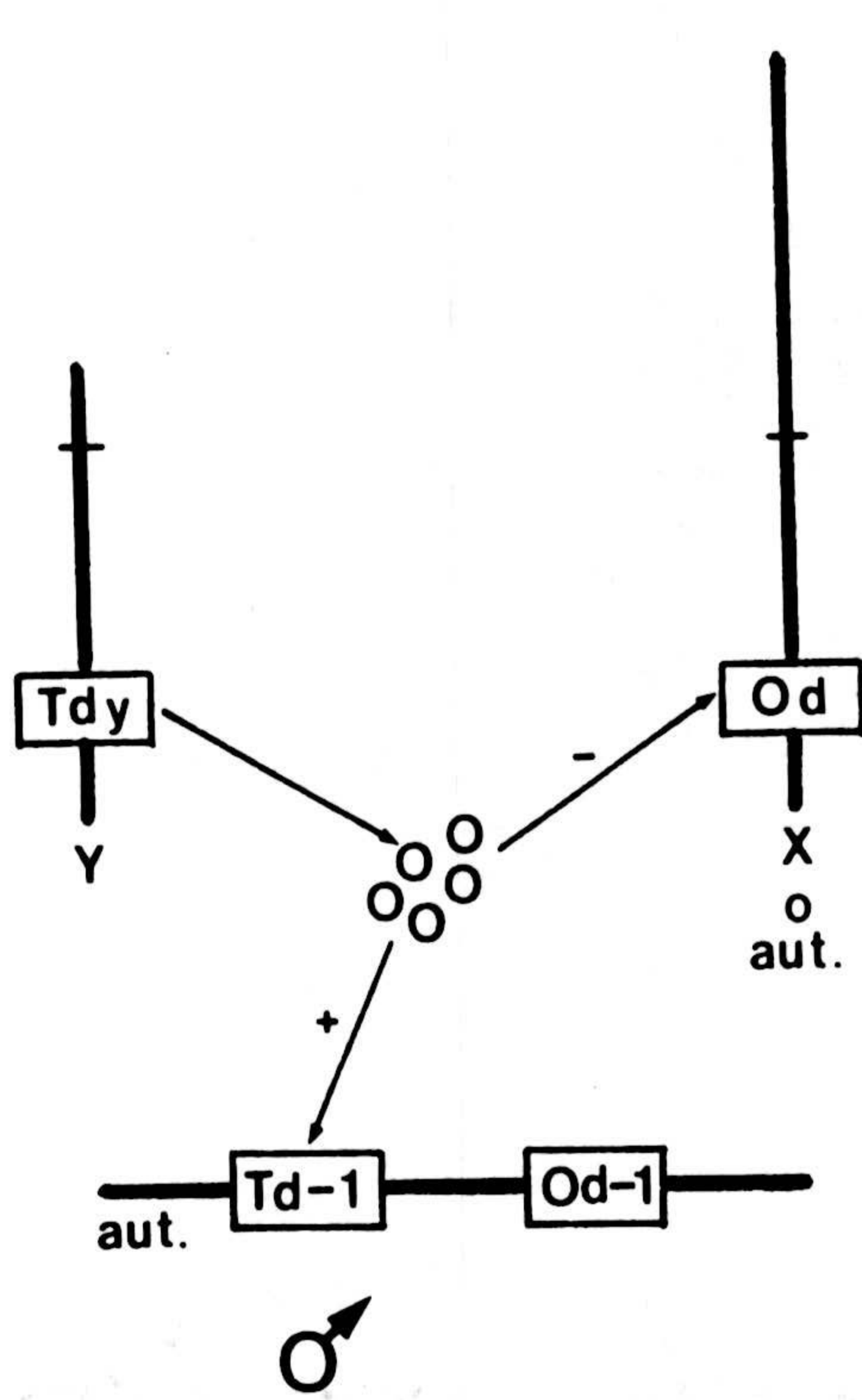
-b) Un gen determinante de ovarios "Od", localizado en el cromosoma X o en autosomas.

-c) Un mínimo de dos genes autosómicos, "Td-1" y "Od-1", regulados por los productos de los genes Tdy y Od, respectivamente.

Según este modelo, los genes Tdy y Od actúan en distintos momentos del desarrollo. El producto del Tdy activa el gen o genes Id, los cuales actúan como genes estructurales codificando para el determinante primario de la diferenciación testicular e inactivando la expresión del gen Od.

Fig. 3.- Modelo de Eicher y Washburn (1983) para el determinismo genético del sexo (ver texto).

Handwritten text, likely bleed-through from the reverse side of the page. The text is illegible due to fading and is written in cursive.



Cuando el gen Tdy está ausente, por estarlo el cromosoma Y, o bien falla la activación de los Id o la represión de los Od por parte del producto del Tdy, se producirá el desarrollo de ovarios.

La principal novedad de este modelo es la consideración de un gen determinante de ovario, cuando en todos los modelos propuestos antes, se había considerado que el desarrollo ovárico se producía de forma no inducida, como consecuencia de un fallo o inhibición del desarrollo testicular.

Por su parte, Chandra (1984, 1985) propone un modelo para la determinación del sexo basado en la existencia de secuencias de ADN no codificadoras, entendiendo éstas como fragmentos de ADN que no contienen información genética para la síntesis de una proteína concreta determinante del sexo (Figs. 4a y 4b).

Este modelo teórico estaría constituido por los siguientes elementos:

-a) Un gen "Tdx" localizado en el cromosoma X, que codifica para un producto (TDX), esencial para la determinación testicular.

-b) Un gen autosómico que produce un represor del Tdx, aunque en cantidad limitada.

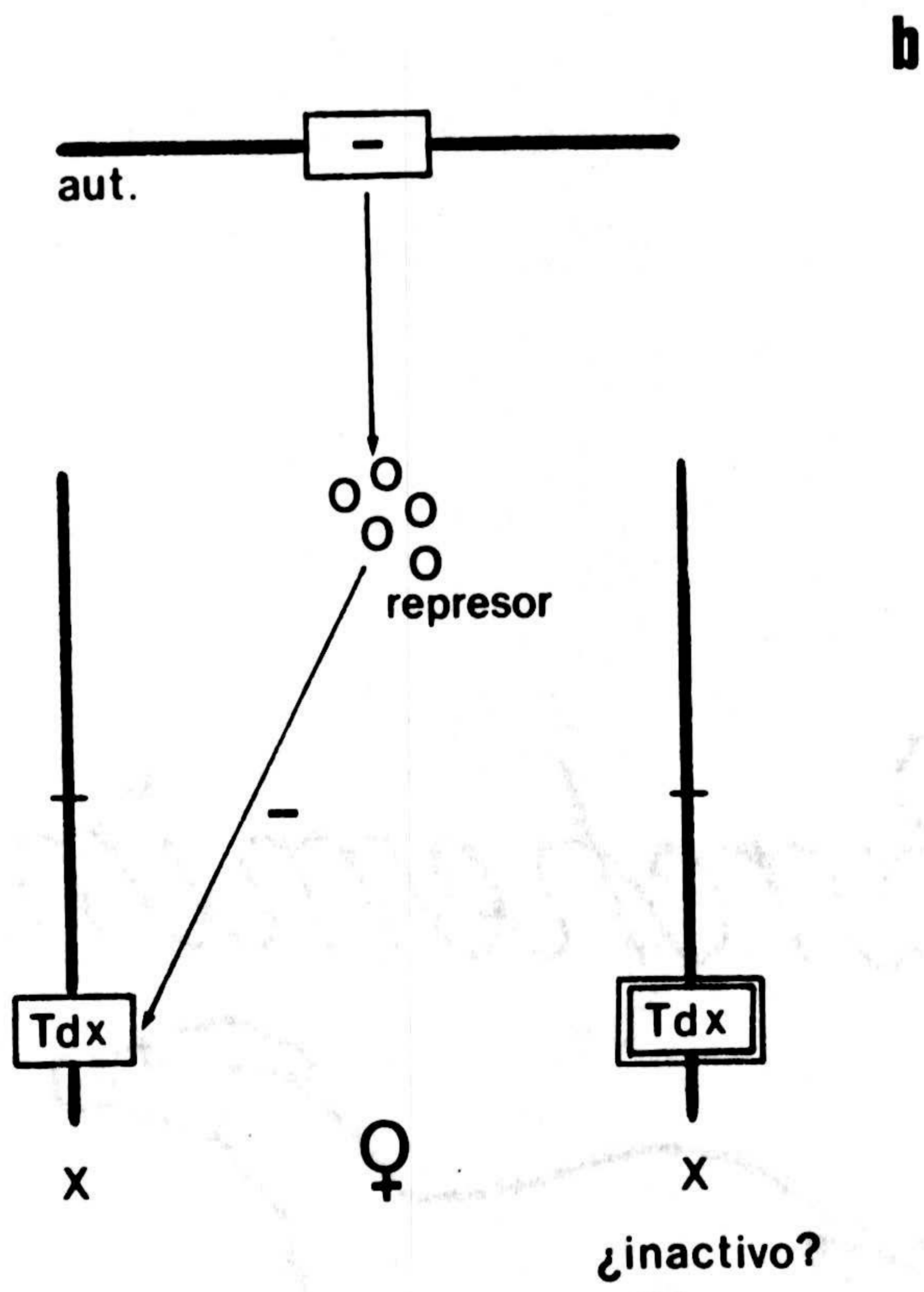
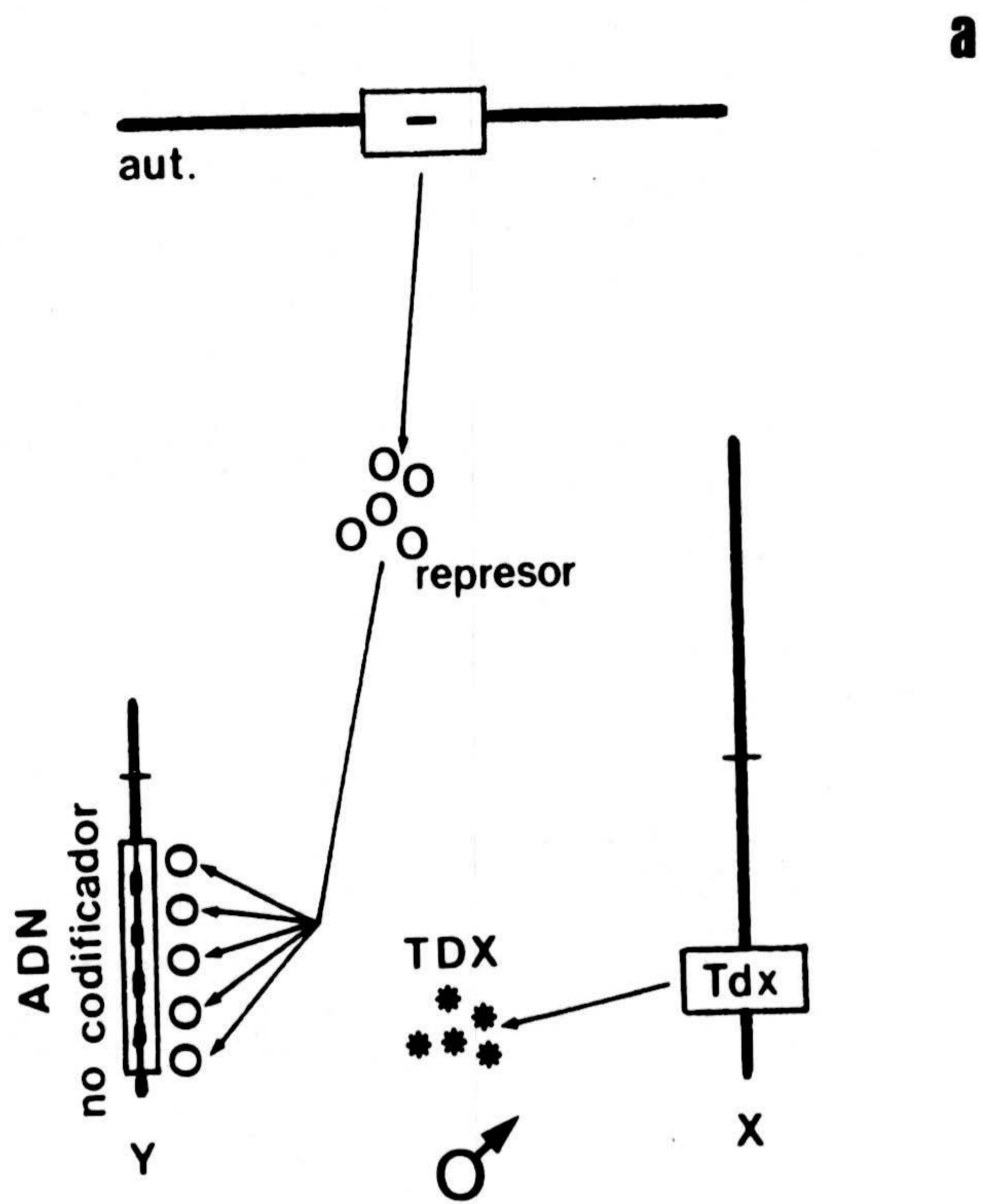
-c) Varias secuencias de ADN no codificantes, localizadas en el cromosoma Y, a las cuales se une el represor autosómico con mayor afinidad que al Tdx.

Según este modelo, en aquellos embriones portadores de cromosoma Y, el producto del gen represor sería captado por las secuencias mudas de este Y, por lo que el gen Tdx

2000000

Fig. 4.- Modelo de Chandra (1984, 1985) para el determinismo genético del sexo (ver texto).





produciría los niveles apropiados de TDX y, por consiguiente, se conseguiría la diferenciación testicular. Por el contrario, en embriones carentes de cromosoma Y, el represor bloquearía la síntesis de TDX y, en consecuencia, se desarrollarían ovarios de forma no inducida.

De este modo, la condición XO en ratones y en humanos implica el desarrollo de un fenotipo hembra, debido a la ausencia de secuencias no codificadoras. En el caso de las hembras fértiles XY de *M. schisticolor*, se sabe que en la línea germinal son XX, y que en su descendencia aparecen dos tipos de hijas, unas XX y otras XY, ambas fértiles (Fredga y col., 1976 y 1977).

De estos resultados se deduce que la mutación que origina el fallo en el desarrollo de testículos en estos individuos XY está localizada en el cromosoma X y, por lo tanto, según el anterior modelo de regulación, sería una mutación en el locus Tdx.

Un caso similar a éste ha sido descrito en el endemismo ibérico *Microtus cabreræ* aunque con etiología diferente (Díaz de la Guardia y col., 1984; Burgos y col., en prensa). Así, estas hembras XY lo son también en la línea germinal, sugiriendo los autores que, en este caso, la mutación causante de la reversión sexual se hereda a través del cromosoma Y. Según el modelo de Chandra, este caso podría explicarse por delección o enmascaramiento de las secuencias no codificantes del cromosoma Y.

La existencia de secuencias de ADN específicamente masculinas fué demostrada por Singh y col. (1980a) como un ADN satélite, componente estructural del cromosoma W de hembras de serpientes. Este ADN satélite, denominado Bkm (Banded krait minor satellite DNA) contiene secuencias de

nucleótidos ricos en repeticiones GATA y GACA (Singh y col., 1984; Schäfer y col., 1986) que se han conservado en un amplio número de especies de serpientes, aves y mamíferos (Singh y col., 1980b). Experiencias de hibridación *in situ* de secuencias Bkm marcadas, a cromosomas de aves y mamíferos demuestran que tanto el cromosoma W de aquellas como el Y de éstos, son Bkm positivos.

En 1984, Singh y col. encuentran que el ADN Bkm hibrida con el factor Sxr de ratón (causante de reversión sexual) y que, a diferencia de la mayoría de otras secuencias repetitivas, las repeticiones GATA contienen potencialmente zonas de lectura abiertas. Estas codifican principalmente para los aminoácidos leucina, serina, isoleucina y tirosina, pero con codones ocasionalmente variantes que difieren en función del origen de clonaje del ADN. La transcripción es exclusiva de la cadena GATA en diferentes tejidos del mismo organismo, así como en diferentes organismos muy alejados evolutivamente (ratón, *D. melanogaster*, serpientes). La cadena complementaria CTAT contiene codones de parada en todas las regiones de lectura. Sin embargo, el significado biológico de este fenómeno y el posible modo de actuación de los péptidos producidos a partir de las secuencias GATA permanecen aún desconocidos.

Los estudios de hibridación con secuencias Bkm han llevado, a la demostración de que mientras en algunas especies de mamíferos, como el ratón de laboratorio, existe una clara diferencia en cuanto a la cantidad de secuencias Bkm presentes en el X y en el Y, y por lo tanto, puede atribuírsele a éstas un papel preponderante en el proceso del determinismo primario del sexo (Singh y Jones, 1982), en otros, como en humanos, tales diferencias apenas existen. Lógicamente, en ambos casos, no se le puede atribuir el mismo papel a las secuencias Bkm, o al menos, el mismo modo

de actuación.

Esta observación llevó a Chandra (1985) a proponer que el proceso de inactivación de uno de los cromosomas X de los dos que portan las hembras de mamíferos, podría servir de base a un nuevo modelo de regulación del determinismo primario del sexo en éstos. Admitiendo que tanto las secuencias Bkm localizadas en el cromosoma X como las que se encuentran en el cromosoma Y poseen el mismo potencial masculinizante, de acuerdo con el modelo anteriormente propuesto por este mismo autor (Chandra, 1984, 1985), y suponiendo que tales secuencias Bkm pierden tal capacidad en estado heterocromático como consecuencias de la inactivación (lyonización) del cromosoma X, en los individuos XY el número de copias activas Bkm sería el doble que en los XX, en los cuales siempre hay uno de ellos inactivado. Como consecuencia de ello, se conseguiría una situación similar a la de ratón, en cuanto a la presencia diferencial de secuencias Bkm activa en machos y en hembras. Según el autor, la función primaria de la inactivación del cromosoma X en la especie humana, podría ser el determinismo del sexo y no la compensación de dosis en los genes localizados en el mismo, que no considera necesaria para la mayoría de tales genes.

De todo este análisis podemos concluir que la diferenciación sexual primaria no es evidentemente un proceso tan simple como se había pensado en un principio y que aunque los conocimientos y avances alcanzados hasta ahora son realmente considerables, aún quedan muchas cuestiones por resolver, por lo que todavía no ha sido posible definir un modelo que, basado en evidencias experimentales, explique de forma convincente todas las excepciones al determinismo genético de la diferenciación sexual primaria que se conocen en la actualidad.

REVERSION SEXUAL EN MACHOS XX DE MAMIFEROS

El término reversión sexual hace referencia a la diferenciación fenotípica sexual contraria a la que cabría esperar, en función de la constitución de cromosomas sexuales de un individuo concreto. Son muy numerosos los casos descritos en la bibliografía acerca de este fenómeno, tanto si se trata de hembras XY, como de machos XX (ver revisión de Lyon y col., 1981).

Por lo que respecta a la reversión sexual de machos XX en mamíferos, solo dos especies han sido objeto de estudios profundos sobre las posibles causas de este fenómeno: el hombre y el ratón de laboratorio.

En la especie humana se han descrito multitud de casos de hombres que presentaban un cariotipo femenino 46,XX, aunque el nivel de conocimientos es aún escaso, dado lo difícil de la investigación en este campo. Sin embargo, su estudio ha conducido al establecimiento de diversas hipótesis para explicar su producción. Madan y Walker (1974) y Wachtel y col. (1976), afirman que en ciertos varones XX, el brazo corto de uno de los dos cromosomas X es significativamente menor que el del otro. Evans y col. (1979) llevaron a cabo un estudio similar, en el que obtuvieron resultados equiparables a éstos. Por el contrario, los resultados obtenidos por de la Chapelle y col. (1979) en un análisis llevado a cabo en el mismo sentido, fueron totalmente dispares a los anteriores. La posibilidad de un origen de reversión sexual basado en pérdidas o ganancias de material cromosómico de uno de los X en varones XX, quedaba por tanto aún sin esclarecer.

Palutke y col. (1973) especulaban sobre la posibilidad de que en determinados casos pudiese presentarse un fenómeno de

mosaicismo de células XY entre las mayoritarias XX. Sin embargo, de la Chapelle y col. (1977) concluyen que los puntos de fluorescencia con quinacrina en que se basaban estos autores para emitir su hipótesis, no obedecen realmente a la presencia de cromatina del cromosoma Y, por lo que el mosaicismo XX/XY no parece ser, en ningún caso, el origen de la masculinidad XX en el hombre.

El estudio de familias se ha realizado en muy pocos casos y escasa información ha podido ser obtenida de los mismos: Nicolis y col., 1972; Kasdan y col., 1973; de la Chapelle y col., 1977, 1978; Minowada y col., 1979). Algunos ejemplos podrían ser compatibles con un origen basado en mutaciones de genes mendelianos, pero según de la Chapelle (1981), si la mutación génica fuese una causa común de la masculinidad XX, debería haber muchos más casos en donde se viesen afectadas familias completas, y éstos son realmente poco frecuentes.

de la Chapelle (1981) considera que muchos de los datos disponibles son consecuentes con la hipótesis de que los varones XX se originan a partir de un intercambio entre los cromosomas X e Y, en el que se vería envuelto el gen (o genes) determinante de testículo y la porción del cromosoma X que contiene el gen Xg. Sin embargo, faltaba todavía una evidencia que demostrase el supuesto intercambio. Tal evidencia fué proporcionada por un individuo varón XX que expresa el alelo paterno para el gen 12E7 (un marcador ligado al cromosoma Y) y sin embargo no expresa el alelo paterno para el locus Xg (ligado al cromosoma X), resultados que indican claramente que en este caso, y quizás también en otros muchos, ha ocurrido un intercambio anómalo X-Y (de la Chapelle y col., 1984). Los autores sugieren que el gen o genes ligados al Y determinantes del desarrollo testicular, también fueron translocados al cromosoma X y causaron la

masculinidad en el paciente.

En conclusión, aunque el intercambio asimétrico X-Y parece ser el fenómeno mejor contrastado como origen de la reversión sexual en varones XX, otras posibilidades tales como mutaciones de genes mendelianos, translocación de un fragmento del cromosoma Y a un autosoma o al X, pequeñas deleciones en el X o la inactivación preferencial de uno de los dos cromosomas X, aún no pueden ser descartadas.

Por lo tanto, todavía no hay una hipótesis que pueda explicar todos los datos disponibles sobre la masculinidad XX y, como indica de la Chapelle (1981, 1984), muy posiblemente su etiología sea muy heterogénea.

No cabe duda de que hasta ahora, el caso que ha aportado mayor número de evidencias sobre los posible orígenes de la reversión sexual de machos XX en mamíferos, ha sido el de la cepa "Sxr" de ratón de laboratorio. Cattanach y col. (1971) describen la existencia de una mutación en el ratón de laboratorio, que se hereda como un alelo dominante de carácter autosómico, y que es capaz de revertir la diferenciación sexual en individuos XX y XO, los cuales, por consiguiente, se desarrollan como machos. En esta cepa, además de los machos XX (estériles), existían también machos fértiles, portadores de la mutación, a través de los cuales se transmite ésta.

Dado que en mamíferos el desarrollo del sexo masculino viene definido por la presencia del cromosoma Y en el cariotipo, la masculinidad en individuos aparentemente carentes de material cromosómico procedente del Y, al menos a nivel citológico, llevó a numerosos investigadores a sospechar en la posible existencia de una translocación de una pequeña porción del cromosoma Y (factor Sxr) a algún cromosoma del

resto del complemento.

Un primer paso en este sentido fué dado por Bennet y col. (1977), quienes demostraron la presencia de antígeno H-Y en los individuos machos XX,Sxr de sexo revertido, en niveles similares a los de los machos XY normales. Por otro lado, demostraron que los machos XY,Sxr portadores, mostraban niveles ligeramente superiores a los anteriores. A la vista de estos datos y teniendo en cuenta la correlación existente entre la presencia del cromosoma Y y la del antígeno H-Y, estos experimentos se consideraron como una evidencia indirecta de la existencia de material del cromosoma Y en el genotipo de los machos XX,Sxr. Sin embargo, la posterior demostración de que el antígeno H-Y no puede ser considerado como el determinante primario del sexo masculino (McLaren y col., 1984), este tipo de pruebas deben ser consideradas como una estimación del grado de masculinidad de un individuo determinado más que como un reflejo de la presencia de material procedente del cromosoma Y.

Con objeto de encontrar evidencias citológicas de la presencia de un fragmento del cromosoma Y en el cariotipo de los machos XX,Sxr de ratón, Winsor y col. (1978) llevaron a cabo un minucioso estudio de la meiosis en individuos portadores del factor Sxr, encontrando que la frecuencia con que los cromosomas X e Y aparecen separados en los machos XY,Sxr es muy superior a la de los machos XY normales, aunque no observaron asociaciones regulares entre el univalente Y y algún autosoma concreto del complemento. Según los autores, sus observaciones apuntaban hacia la conclusión de que el origen de la reversión sexual implicaba una reordenación cromosómica más que una mutación génica.

Con el mismo fin, y tras la aparición de la técnica de microextensión para la visualización de complejos

sinaptonémicos tanto al microscopio óptico como electrónico, se realizaron varios trabajos a este nivel aunque con resultados poco claros y a veces contradictorios. Tres (1978) asume la existencia de una translocación de la región distal del cromosoma Y a un autosoma, hipótesis que fué descartada a raíz de los estudios realizados por Chandley y Fletcher (1980) y por Evans y col. (1980), de forma paralela e independiente, quienes a partir de la ausencia de evidencias citológicas de translocación, favorecen la idea de que el factor Sxr está representado por una mutación génica autosómica dominante.

Singh y Jones (1982) realizaron un estudio a nivel molecular del ADN de los individuos Sxr mediante análisis de hibridación *in situ* con secuencias Bkm marcadas, en donde demuestran que tales secuencias hibridan con un cromosoma de tamaño similar al del X en los machos XX,Sxr, así como con el cromosoma Y de los machos XY,Sxr y de los machos XY normales. Los autores llegan a la conclusión de que el factor Sxr se transfiere desde un cromosoma Y aberrante al cromosoma X mediante un crossing-over regular de la meiosis paterna del macho XY,Sxr portador. Aunque su idea general es acertada, la existencia de tal cromosoma Y aberrante ha sido negada categóricamente por numerosos autores y atribuida al empleo prolongado de colchicina en las preparaciones citogenéticas de estos autores.

Evans y col. (1982) demuestran que: 1) los ratones XY,Sxr poseen un único y anormal cromosoma Y que posee un cuerpo distal adicional y de tinción intensa y 2), que durante la meiosis, este cuerpo es transferido por crossing-over desde una cromátida del Y a una del X. Como consecuencia de ello, en el cruce de una hembra normal XX por un macho portador XY,Sxr, se producen cuatro tipos de individuos: hembras normales XX y machos XY,Sxr (parentales, no recombinantes)

por un lado, y machos XX,Sxr y machos normales XY (recombinantes) por otro.

La localización en el cromosoma X del factor Sxr llevó a considerar la posibilidad de que éste pudiese estar sometido al proceso de inactivación o Lyonización. Con objeto de aclarar este punto, Cattanach y col. (1982) y McLaren y Monk (1982) llevaron a cabo análisis genéticos en ratones que en un cromosoma X llevaban el factor Sxr y en el otro una translocación del cromosoma 16 (individuos T16H/X,Sxr), en donde el cromosoma X portador del factor Sxr era mantenido en estado inactivo en la mayoría, si no todas las células del individuo, y comprobaron que tales individuos podían desarrollarse como machos XX de sexo revertido, como hembras fértiles y como intersexos. Por lo tanto, aunque susceptible de ser inactivado, el factor Sxr puede escapar a la inactivación en un determinado porcentaje de células de modo que el desarrollo fenotípico sexual de estos animales dependerá de la proporción de células que porten el factor Sxr activo. Se postula entonces la existencia de un umbral en la manifestación del poder masculinizante global de las células que llevan las secuencias Sxr en estado activo, que delimitaría el paso del fenotipo hembra al fenotipo macho. En consecuencia, en ese umbral estarían definidos los intersexos.



OBJETIVOS

estudiar



OBJETIVOS

De todos los estudios previos expuestos en la introducción se desprende, indudablemente, que el hallazgo de nuevos casos de reversión sexual en especies diferentes de las estudiadas hasta ahora, puede ser de gran interés para poder avanzar en la investigación de este interesante campo de la Biología.

Los estudios genéticos realizados hasta el momento en el género *Talpa* han estado orientados especialmente al conocimiento de las dotaciones cromosómicas, las relaciones cariotípicas entre distintas especies del género y el comportamiento meiótico (Todorovic y col., 1972; Jiménez y col., 1984a y b).

En nuestro caso, estudios citogenéticos previos (Jiménez, 1982, Memoria de Licenciatura) realizados en varias especies de insectívoros, nos llevaron a detectar en la especie *Talpa occidentalis*, la existencia de individuos con escaso desarrollo gonadal a pesar de mostrar un fenotipo externo normal de adulto. Posteriormente, la profundización en el estudio de esta anomalía, nos ha llevado a comprobar que, aunque en esta especie existe una fluctuación del peso testicular en relación con la estación climatológica, la falta de desarrollo gonadal de ciertos individuos no era funcional sino constitucional. Esto nos llevó a realizar estudios cariotípicos, histológicos, anatómicos y serológicos, que nos han venido a demostrar que dicha anomalía es de origen genético y produce un fallo en la diferenciación sexual primaria o gonadal.

Los resultados de estos estudios y su discusión en relación con el origen genético, transmisión, mantenimiento, etc... de dicha anomalía, son motivo de este trabajo.

1906

MATERIAL Y METODOS

1906

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL ANALIZADO

El presente trabajo se basa en el estudio de 126 individuos de la especie *Talpa occidentalis*, todos ellos capturados en un area relativamete pequeña de la Vega de Granada (no superior a 200x1000 m) y paralela al margen izquierdo del rio Genil, a la salida de la ciudad. Por tanto, podemos considerar que todos ellos pertenecen a una misma población.

Dada la controversia existente en cuanto a la taxonomía de las especies del género *Talpa* en la Península Ibérica, y aunque numerosos autores han considerado a *Talpa occidentalis* como sinónimo de *T. caeca* (topo ciego), nosotros hemos clasificado nuestros ejemplares de acuerdo con las directrices de Miller (1912) y Cabrera (1914), basándonos en un estudio que, a este respecto, llevamos a cabo sobre material procedente de esta misma población (Jiménez y col., 1984).

La tabla I resume los datos biométricos de los craneos de todos los ejemplares capturados, así como el peso corporal, el sexo y la dotación de cromosomas sexuales de los mismos.

TABLA I.- Sexo y datos morfométricos de los individuos analizados.

INDIVIDUO	SEXO	CROMOSOMAS SEXUALES	PESO CORPORAL (gr)	LONGITUD CONDILOBASAL (mm)	ANCHO INTERORBITAL (mm)	LONGITUD MANDIBULAR (mm)	LONGITUD SERIE DENTAL SUPERIOR (mm)	LONGITUD SERIE DENTAL INFERIOR (mm)	DIAMETRO MAYOR DEL m ² (mm)
T-9	♂	XX	59	32.4	6.0	20.4	14.1	13.2	3.0
T-10	♂	XX	60	32.5	5.9	20.7	14.0	13.6	3.0
T-13	♂	XY	70	32.1	6.1	20.8	13.8	13.3	3.0
T-14	♂	XY	74	33.1	6.3	21.1	14.2	13.2	3.3
T-15	♂	XY	73	33.0	6.1	20.9	14.0	13.1	3.2
T-16	♀	XX	71	32.1	6.1	20.6	13.7	13.2	3.0
T-17	♂	XY	60	32.5	6.5	20.5	14.1	13.4	3.1
T-18	♀	XX	50	32.2	6.4	20.3	14.0	13.4	3.0
T-19	♂	XY	64	32.4	6.7	20.7	13.4	13	3.2
T-20	♂	XY	75	33.3	6.5	21	13.3	13.1	3.3
T-21	♀	XX	61	32.0	6.3	19.7	13.5	12.8	3.0
T-22	♂	XY	56	32.4	6.2	20.4	13.7	13.3	3.1
T-23	♀	XX	63	31.7	6.1	20.1	13.6	13.3	3.2
T-24	♂	XX	61	31.8	6.1	20.5	13.6	12.7	3.2
T-25	♂	XY	74	32.9	6.7	21	14.0	13.4	3.3
T-26	♂	XY	65	32.7	6.2	20.8	14.0	12.8	3.0
T-27	♀	XX	53	32.1	6.1	20.3	13.8	13.1	3.0
T-28	♂	XY	67	33.2	6.8	21.7	14.5	13.4	3.3
T-29	♂	XY	69	32.2	6.6	20.8	14.3	13.2	3.1
T-30	♂	XY	63	32.4	6.3	20.7	14.1	12.7	3.1
T-31	♂	XY	60	33.2	6.5	21.3	14.4	13.2	3.3
T-32	♂	XY	70	32.5	6.8	21.6	14.2	12.8	3.2
T-33	♀	XX	60	32.3	6.8	20.9	13.6	12.3	3.1
T-34	♀	XX	56	31.8	6.5	20.9	13.7	12.4	2.9
T-35	♀	XX	51	31.4	6.4	20.5	13.7	12.6	3.0
T-36	♂	XY	62	32.6	6.8	21.1	14.0	12.8	3.0
T-37	♂	XX	60	32.4	6.7	20.9	14.0	12.9	2.9
T-38	♂	XY	53	31.7	6.3	20.2	13.3	12.1	3.0
T-39	♂	XX	61	31.5	6.8	20.4	13.8	12.5	3.0
T-40	♂	XY	75	32.5	6.8	21.7	14	12.6	3.0
T-41	♂	XY	78	33.0	6.8	21.8	13.7	12.5	2.9
T-42	♂	XY	57	32.5	6.8	21.8	14	12.6	3.1
T-43	♀	XX	56	31.5	6.7	20.3	13.4	12.3	3.0
T-44	♂	XY	60	31.5	6.3	20.4	13.4	12.6	3.1
T-45	♂	XX	66	32.9	6.7	21.3	13.7	12.4	3.0
T-46	♂	XX	63	32.0	6.5	20.4	13.5	12.3	3.0
T-47	♂	XY	64	32.0	6.8	20.8	13.5	12.1	3.0
T-48	♂	XY	64	32.7	6.7	21.2	13.5	12.3	3.1
T-49	♀	XX	60	31.1	6.2	20.2	13.2	12.3	3.0
T-50	♂	XY	66	32.4	7.0	21.1	13.5	12.4	3.0
T-51	♂	XY	62	32.1	6.4	20.9	13.4	12.6	3.0
T-52	♂	XY	71	33.1	6.7	21.2	13.9	12.6	3.1
T-53	♂	XY	69	32.8	6.6	21.2	13.7	12.5	3.0
T-54	♀	XX	60	32.0	6.6	20.9	13.7	12.4	3.0
T-55	♂	XY	59	32.1	6.5	20.9	13.4	12.3	3.0
T-56	♂	XX	51	32.0	6.2	20.9	13.5	12.1	3.0
T-57	♂	XY	61	32.3	6.4	20.7	13.6	12.2	3.0

TABLA I (continuación).-

INDIVIDUO	SEXO	CROMOSOMAS SEXUALES	PESO CORPORAL (gr)	LONGITUD CONDILOBASAL (mm)	ANCHO INTERORBITAL (mm)	LONGITUD MANDIBULAR (mm)	LONGITUD SERIE DENTAL SUPERIOR (mm)	LONGITUD SERIE DENTAL INFERIOR (mm)	DIAMETRO MAYOR DEL m ¹ (mm)
T-58	♂	XX	54	32.5	6.3	20.5	13.6	12.2	3.0
T-59	♂	XY	75	33.0	6.7	20.8	13.7	12.2	3.2
T-60	♂	XY	56	32.5	6.4	20.7	13.8	12.3	3.0
T-61	♂	XY	67	32.6	6.4	20.5	13.7	12.4	3.0
T-62	♂	XY	56	32.4	6.2	20.5	13.7	12.3	3.0
T-63	♀	XX	47	31.9	6.1	20.1	13.6	12.5	2.9
T-64	♂	XX	51	32.5	6.2	20.4	13.8	12.5	3.0
T-65	♂	XY	44	32.0	6.0	20.0	13.2	12.3	2.9
T-66	♂	XY	66	32.7	6.2	20.2	13.4	12.3	3.0
T-67	♂	XY	69	32.5	6.4	20.5	13.5	12.3	3.1
T-68	♂	XY	67	32.5	6.3	20.5	13.6	12.2	3.0
T-69	♀	XX	52	32.3	6.1	20.3	13.7	12.1	3.0
T-70	♂	XY	64	32.4	6.3	20.6	13.7	12.3	3.0
T-71	♂	XY	69	32.9	6.6	20.7	13.7	12.3	3.0
T-72	♂	XY	65	32.5	6.4	20.7	13.5	12.4	3.0
T-73	♀	XX	48	31.8	6.2	20.5	13.6	12.2	2.9
T-74	♂	XY	56	32.2	6.3	20.5	13.7	12.3	3.0
T-75	♂	XY	67	32.4	6.4	20.6	13.4	12.1	3.0
T-76	♂	XY	63	32.4	6.6	20.6	13.5	12.2	3.0
T-77	♂	XY	72	32.7	6.7	21.1	13.4	12.3	3.1
T-78	♀	XX	47	31.7	6.1	20.4	13.5	12.1	2.9
T-79	♂	XY	65	32.4	6.4	20.5	13.5	12.4	3.0
T-80	♂	XY	67	32.5	6.5	21.7	13.2	12.5	3.0
T-81	♂	XY	65	32.1	6.6	20.8	13.6	12.6	3.0
T-82	♂	XY	59	32.4	6.1	20.6	13.8	12.5	3.0
T-83	♂	XX	60	32.4	6.2	20.6	13.6	12.4	3.0
T-84	♂	XX	56	32.1	6.3	20.5	13.6	12.5	3.0
T-85	♂	XY	63	32.4	6.3	20.6	13.7	12.3	3.0
T-86	♂	XY	55	32.3	6.3	20.6	13.2	12.3	3.0
T-87	♂	XX	55	32.3	6.2	20.6	13.3	12.2	3.0
T-88	♂	XX	59	32.5	6.3	20.2	13.7	12.2	3.0
T-89	♂	XY	61	32.6	6.4	20.3	13.8	12.2	3.0
T-90	♂	XY	73	32.9	6.6	21.2	13.8	12.4	3.1
T-91	♂	XX	52	32.2	6.3	20.6	13.6	12.1	3.0
T-92	♂	XY	60	32.4	6.2	20.6	13.6	12.3	3.0
T-93	♂	XX	44	31.8	6.2	20.6	13.5	12.2	2.9
T-94	♂	XY	51	32.6	6.3	20.6	13.2	12.3	3.0
T-95	♂	XY	85	33.1	6.9	21.9	13.8	12.6	3.0
T-96	♂	XX	51	32.3	6.2	20.5	13.1	12.3	2.9
T-97	♂	XY	63	32.5	6.6	20.7	14.2	13.6	3.0
T-98	♂	XY	55	32.4	6.2	20.5	13.6	12.4	3.0
T-99	♀	XX	64	32.2	6.3	19.7	13.5	12.8	3.0
T-100	♂	XY	58	32.5	6.5	20.8	14.1	13.5	3.0
T-101	♂	XY	42	31.2	6.0	19.2	13.2	12.3	2.9
T-102	♂	XX	25	31.1	5.9	18.9	13.0	12.1	2.9
T-103	♂	XX	45	31.2	6.4	20.6	14.0	13.3	2.9
T-104	♂	XX	30	31.2	5.9	19.0	13.1	12.2	3.0
T-105	♂	XY	53	32.4	6.3	20.5	13.5	12.3	3.0



TABLA I (continuación).-

INDIVIDUO	SEXO	CROMOSOMAS SEXUALES	PESO CORPORAL (gr)	LONGITUD CONDILOBASAL (mm)	ANCHO INTERORBITAL (mm)	LONGITUD MANDIBULAR (mm)	LONGITUD SERIE DENTAL SUPERIOR (mm)	LONGITUD SERIE DENTAL INFERIOR (mm)	DIAMETRO MAYOR DEL m ² (mm)
T-106	♀	XX	58	32.5	6.5	20.6	14.0	13.5	3.0
T-107	♂	XX	49	32.4	6.2	20.4	13.4	12.3	2.9
T-108	♂	XX	41	31.2	6.0	19.2	13.2	12.4	3.0
T-109	♂	XX	58	32.5	6.5	20.8	14.0	13.5	3.0
T-110	♂	XY	51	32.1	6.1	20.3	13.8	13.1	3.0
T-111	♂	XY	59	32.1	6.2	20.3	13.9	12.3	3.0
T-112	♂	XX	49	32.0	6.0	20.3	13.7	13.0	3.0
T-113	♂	XY	57	32.1	6.2	20.4	13.8	12.7	3.0
T-114	♂	XX	56	32.0	6.1	20.4	13.7	12.3	3.0
T-115	♂	XX	49	32.0	6.0	20.3	13.6	13.0	2.9
T-116	♂	XY	58	32.1	6.2	20.4	13.9	13.2	3.0
T-117	♂	XX	47	32.0	6.0	20.3	13.7	13.1	3.0
T-118	♂	XY	45	32.6	5.9	20.1	13.4	12.8	2.9
T-119	♂	XY	63	32.2	6.3	20.5	13.9	13.3	3.0
T-120	♂	XX	48	32.0	6.0	20.3	13.5	13.0	3.0
T-121	♂	XY	53	32.4	6.3	20.5	13.5	12.3	3.0
T-122	♂	XY	56	32.1	6.2	20.4	13.8	13.2	3.0
T-123	♂	XY	58	32.5	6.5	20.8	14.1	13.5	3.0
T-124	♂	XY	46	31.8	6.2	20.6	13.5	12.2	2.9
T-125	♂	XX	43	32.0	6.0	20.0	13.2	12.3	2.9
T-126	♂	XY	49	32.4	6.2	20.4	13.4	12.3	2.9
T-127	♂	XY	51	32.2	6.3	20.6	13.6	12.1	3.0
T-128	♂	XX	46	31.7	6.1	20.4	13.5	12.1	2.9
T-129	♂	XY	58	32.2	6.3	20.5	13.7	12.3	3.0
T-130	♂	XY	46	31.8	6.1	20.3	13.6	12.2	3.0
T-131	♂	XY	52	32.2	6.3	20.6	13.6	12.1	3.0
T-132	♂	XX	44	31.8	6.2	20.6	13.6	12.2	3.0
T-133	♂	XY	59	32.5	6.4	20.7	13.8	12.3	3.0
T-134	♂	XX	49	31.7	6.1	20.4	13.5	12.1	2.9
T-135	♂	XX	45	32.1	6.0	20.0	13.3	12.3	2.9
T-136	♂	XX	52	32.5	6.2	20.4	13.8	12.5	3.0

MÉTODOS UTILIZADOS

Métodos de captura

Parte de los ejemplares fueron capturados a mano cuando el animal estaba reconstruyendo un tramo de galería (preferentemente una galería principal de frecuente tránsito) que previamente le había sido destruida. El paso del topo fué vigilado desde lejos, insertando dos pequeñas banderitas, una en cada extremo del tramo de galería destruido, de modo que la caída de una de ellas, indicaba que el mismo había comenzado a excavar. De este modo podían ser controladas varias galerías relativamente lejanas y de forma simultanea.

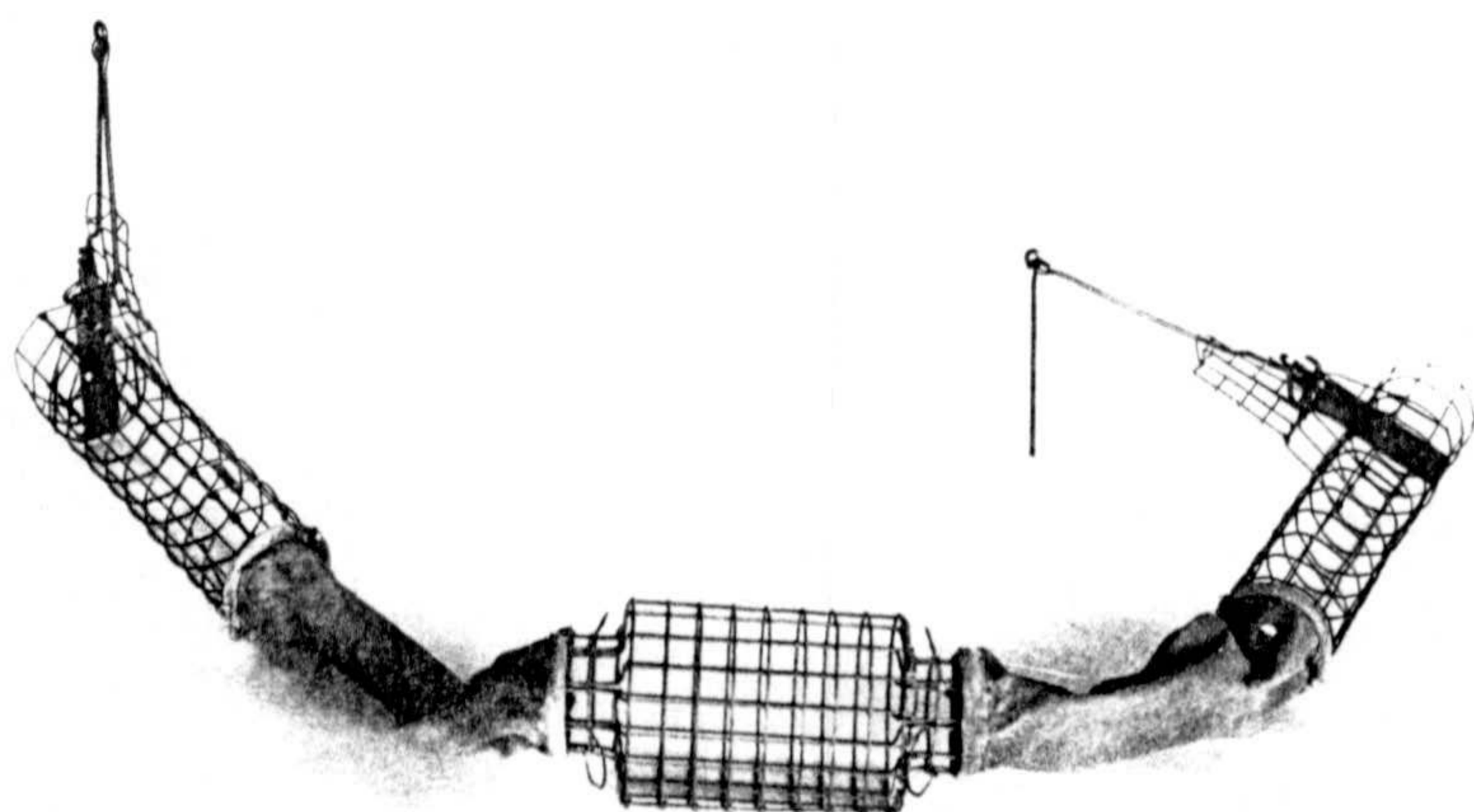
Este método, aunque efectivo, resulta francamente tedioso pues requiere el empleo de una gran cantidad de horas de espera en el propio campo.

Con objeto de evitar estas dificultades, pensamos en la utilización de trampas, pero dado que éstas no se encuentran fácilmente en el mercado y que las que existen, normalmente matan al animal al capturarlo, nos decidimos a diseñar y contruir un modelo que cumpliera con todos los requisitos de efectividad, seguridad y acondicionamiento necesarios para mantener al ejemplar vivo desde su captura hasta que la trampa es inspeccionada y el animal recogido. Tras probar diversos prototipos, se llegó a un diseño final, que seguidamente se describe (fig. 5).

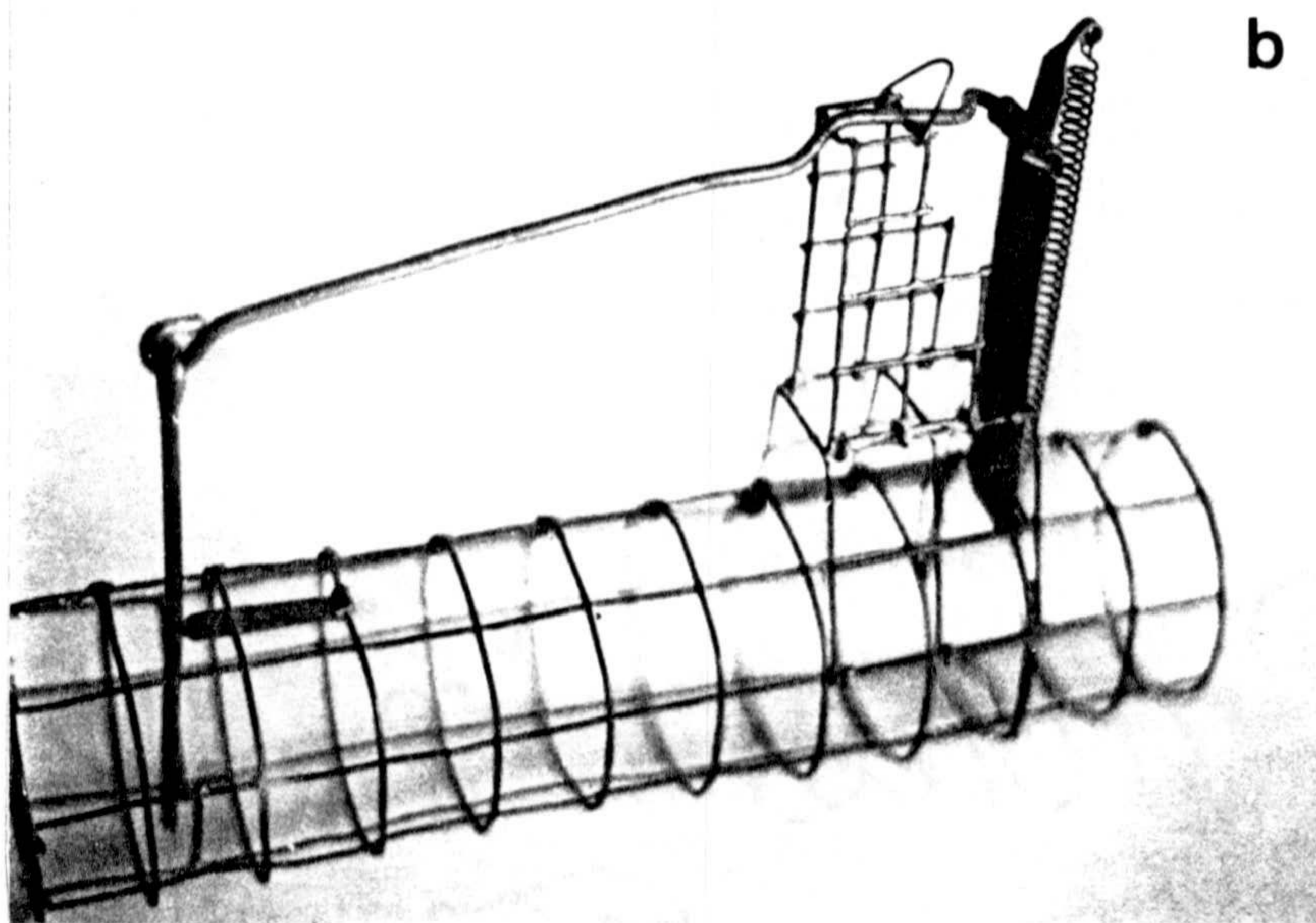
El modelo consta de tres cuerpos contruidos en tela metálica electrosoldada, de los cuales, el central (cilíndrico: $l=10$ cm.; $\varnothing=8$ cm.) constituye el compartimento nido y los dos extremos (cilíndricos: $l=20$ cm.; $\varnothing=5$ cm.) las trampas

Fig. 5.- Trampa utilizada en la captura de los ejemplares de *T. occidentalis* analizados en este estudio. a) Vista general donde se observan los tres componentes (trampas en los extremos y jaula nido central), unidos por tubos flexibles de lona. b) Detalle de uno de los compartimentos-trampa que muestra la puerta abierta y el mecanismo en posición de captura. c) Detalle del mismo una vez activado el mecanismo y cerrada la puerta.

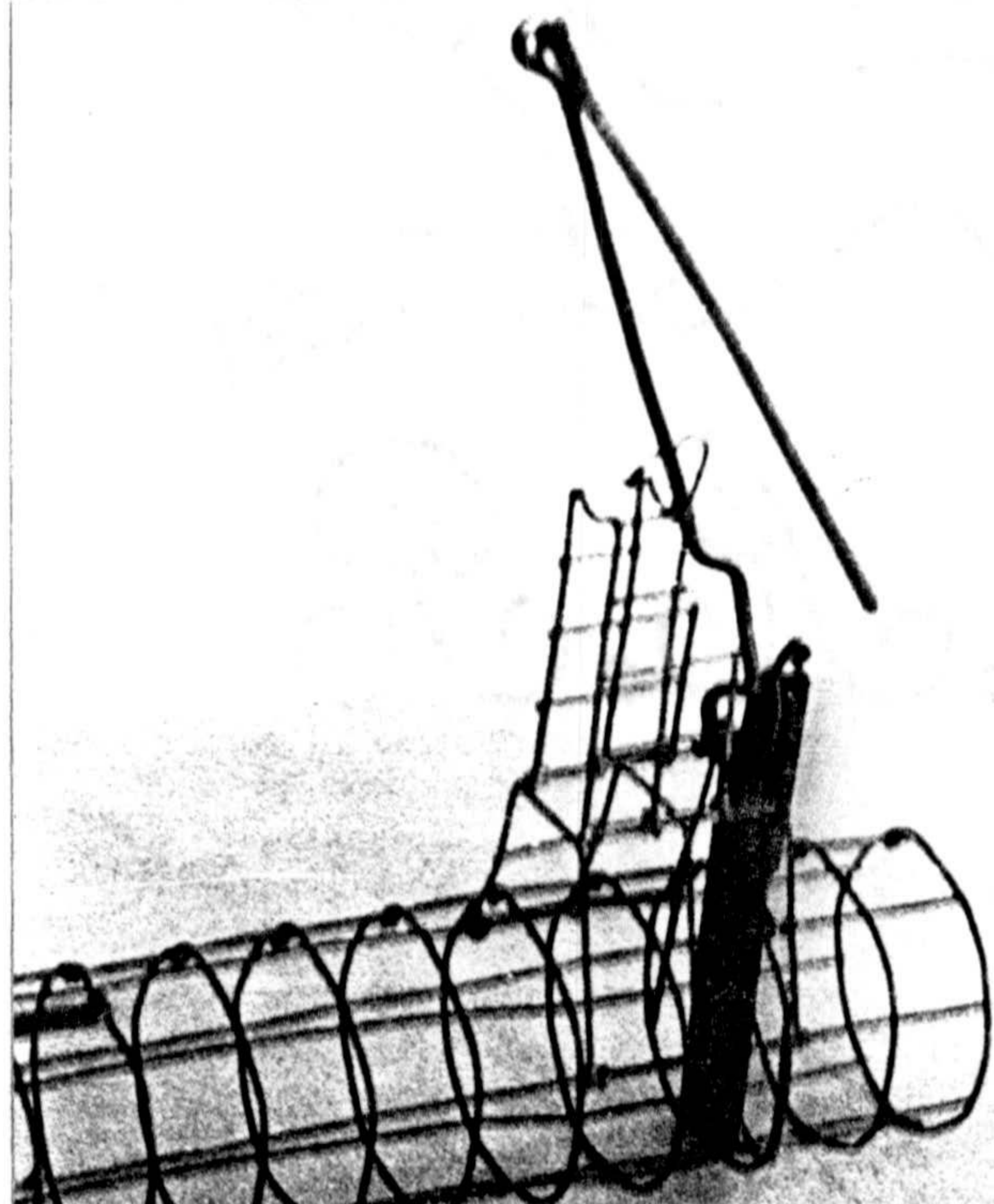
a



b



c



5

propiamente dichas, unidos entre sí por sendos cilindros de lona (l=17 cm.; \varnothing =5 cm.) (fig. 5a). Las figuras 5b y 5c muestran sendos detalles de los elementos trampa en las posiciones de abierta (Fig. 5b) y cerrada (Fig. 5c)

Quizás debido a su vida hipogea, los topos pueden mostrar actividad a cualquier hora del día o de la noche. A pesar de esto, las trampas no deben estar demasiado tiempo colocadas sin ser inspeccionadas. Como norma general, nosotros hemos llevado a cabo las capturas durante la noche en verano y durante el día en invierno, con el fin de evitar al máximo la muerte de los animales en la trampa a causa de las temperaturas extremas.

Estudio de la mitosis

Para la obtención de preparaciones de cromosomas mitóticos fueron utilizadas cinco técnicas diferentes:

- a) Preparaciones directas de médula ósea de animales colchicinados "in vivo".
- b) Preparaciones directas de médula ósea de animales sometidos a un tratamiento previo de levaduras.
- c) Cultivos de médula ósea a corto término.
- d) Cultivos de fibroblastos.
- e) Cultivos de leucocitos.

Obtención de la suspensión celular en animales colchicinados "in vivo".

La primera de estas técnicas empleadas fué originalmente descrita por Hsu y Patton (1969), si bien su utilización siempre requiere algunas modificaciones con el fin de adaptarla al particular metabolismo y fisiología de cada especie. El procedimiento seguido para la obtención de la suspensión celular siguiendo este método fué el siguiente:

1) Inyectar al animal motivo de estudio, por vía intraperitoneal, una solución de colchicina, marca Sigma, al 0.1% en solución salina isotónica de ClNa al 0.9%, en una dosis de 0.2 ml. por cada 25 g. de peso corporal. Si se emplea otra marca de colchicina la concentración óptima para su utilización puede ser distinta.

2) Transcurridos de 60 a 90 minutos el animal es sacrificado por inhalación de cloroformo y le son extraídos los fémures.

3) Cortar las epífisis y extraer la médula ósea haciendo pasar una solución hipotónica de ClK 0.75 M a través de la cavidad central de la diáfisis del fémur, con la ayuda de una jeringa y una aguja de diámetro apropiado, de forma que pueda penetrar en el interior de la mencionada cavidad. La solución hipotónica ha de estar a una temperatura aproximada de 4°C, y el material es recogido en un tubo cónico de centrífuga. Si es necesario se añade más solución hipotónica al tubo de centrífuga hasta completar de 6 a 8 ml. dependiendo de la cantidad de médula obtenida, de modo que la densidad celular de la suspensión sea baja.

4) Resuspender el material con ayuda de una pipeta pasteur provista de una tetina de goma y dejar sedimentar durante unos minutos con el fin de eliminar el tejido conectivo u

otros residuos que hayan podido ser arrastrados durante el lavado, y decantar a otro tubo igual.

5) Someter la suspensión celular al choque hipotónico a 4°C en frigorífico durante 20-30 min.

Obtención de la suspensión celular en animales sometidos a pretratamiento de levaduras.

Cole y Leavens (1971) sugerían la utilización de levaduras como un posible estimulador de la mitosis en tejido hematopoyético de reptiles y anfibios. En 1980, Lee y Elder adaptaron esta técnica a micromamíferos siendo éste el procedimiento que nosotros hemos utilizado aunque con algunas pequeñas modificaciones. Los distintos pasos seguidos han sido los siguientes:

a) Tratamiento de levaduras.

1) Mezclar de 2 a 3 g. de levadura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) y 5 a 6 g. de dextrosa en 25 ml. de agua corriente a 40°C.

2) Incubar la mezcla a 40°C en estufa o baño termostático hasta que las levaduras se tornen activas, lo que vendrá indicado por la aparición de abundante espuma.

3) Inyectar al animal por vía subcutánea, en la región dorsal, una dosis de 0.2 ml. de la suspensión de levaduras por cada 25 g. de peso corporal.

b) Obtención de la suspensión celular:

1) Inyectar al animal, por vía intraperitoneal una solución de colchicina, marca Sigma, al 0.02% en solución salina

isotónica de ClNa al 0.9% en una dosis de 0.1 ml. por cada 25 g. de peso corporal.

2) Transcurridos de 30 a 45 min. el animal es sacrificado y le son extraídos los dos fémures.

3) Cortar las epífisis y extraer la médula ósea, eliminar los residuos arrastrados durante el lavado y someter la suspensión celular al choque hipotónico a 4°C durante 20-30 min., tal y como se describe en los apartados 3), 4) y 5) del protocolo de la técnica descrita anteriormente.

Cultivos de médula ósea a corto término.

Esta técnica ha sido utilizada principalmente en los casos de muerte espontánea, habiéndose obtenido buenos resultados incluso en animales muertos desde hacía dos días, siempre y cuando fueran conservados en un frigorífico a 4°C, y cuidando evitar la congelación.

Los pasos seguidos para la realización del cultivo y la obtención de la suspensión celular son los siguientes:

1) El animal es sacrificado o retirado del frigorífico, según el caso, y le son extraídos los dos fémures.

2) Cortar las epífisis y extraer la médula ósea haciendo pasar medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 15% de suero bovino fetal a través de la cavidad central de la diáfisis del fémur con una jeringa y aguja. El material es recogido en un frasco de vidrio borosilicato, con tapón de rosca y resuspendido con la ayuda de una pipeta pasteur provista de una tetina de goma. La cantidad de medio utilizado para cada caso fué de 5 ml. El material puede ser colchicinado inmediatamente o incubado en estufa de cultivo

a 37°C hasta 24 h., antes de proceder a la realización del siguiente paso, en cuyo caso todas las manipulaciones han de hacerse en esterilidad, en cámara de flujo laminar y con material esterilizado previamente.

3) A partir de este momento se hace innecesario mantener las medidas de esterilidad caso de que se hayan tenido hasta ahora. Se añaden al medio 5 μ l de colchicina al 0.02% en solución salina de ClNa al 0.9%.

4) Transcurridos de 60 a 90 min. el cultivo es trasvasado a un tubo cónico de centrífuga y centrifugado a 900 r.p.m. durante 10 min.

5) Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 6-8 ml. de solución hipotónica de ClK 0.75 M a 4°C.

6) Someter la suspensión celular al choque hipotónico a 4°C en frigorífico durante 20-30 min.

Cultivo de fibroblastos.

Para la observación de cromosomas de animales especialmente interesantes y que no conviene que sean sacrificados, se llevan a cabo cultivos de células procedentes de un órgano no vital, como por ejemplo el rabo. Esta técnica es ampliamente utilizada en la mayoría de los laboratorios de investigación, existiendo por tanto numerosas referencias sobre ella. Nosotros en nuestro laboratorio, hemos seguido la descrita por Yosida en 1980.

El método utilizado fué el siguiente:

1- El rabo del animal se desinfecta frotándolo repetidamente con un algodón impregnado en alcohol de 70° primero y en

solución de Armil 1:1000, después.

2- Se corta una pieza de 2-3 cm aproximadamente del extremo.

3- Utilizando material de disección estéril y en el interior de una cámara de flujo laminar, se desenvaina la pieza desechando la piel. El trozo de vértebras apicales se coloca en una placa de Petri que contiene solución de Hank.

4- El tejido se corta con tijeras en pequeñas piezas que se colocan en un frasco de cultivo después de haber tocado con las mismas en un trozo de papel de filtro estéril, con objeto de eliminar el exceso de humedad.

5- Las piezas de tejido se dejan en seco en el frasco durante 10 minutos aproximadamente para permitir que se adhieran al vidrio o plástico. Transcurrido dicho tiempo se sumergen en medio de cultivo (RPMI 1640 ó IC 199) y se llevan a una estufa a 37°C. El medio de cultivo se cambiará dos veces por semana.

6- Transcurrido un tiempo variable desde el inicio del cultivo, las células habrán migrado desde los esplantes, proliferando por la superficie del fondo del frasco, momento en que será necesario realizar subcultivos con objeto de obtener abundante cantidad de células.

- Subcultivos.

Cuando en un cultivo en crecimiento exponencial el tamaño de las colonias celulares es bastante grande, o se observa que sus bordes comienzan a tocarse, se realizará subcultivos mediante el siguiente método:

1- Retirar el medio de cultivo con una pipeta Pasteur,

sustituirlo por solución lavadora (Hank o PBS) la cual se cambiará dos o tres veces, con lavados intermedios para eliminar los iones Ca^{++} y Mg^{++} del frasco.

2- Añadir al frasco la mínima cantidad de solución de tripsina suficiente para cubrir el fondo y llevarlo a una estufa a $37^{\circ}C$ durante 10 minutos. Durante este tiempo se controlará en el microscopio invertido el proceso de tripsinizado.

Cuando todas las células se encuentren en suspensión se añaden 15 ml de medio de cultivo y este volumen se reparte en tres frascos.

3- Se llevan los frascos a la estufa a $37^{\circ}C$ y no deberán moverse durante 24 horas, tiempo tras el cual la mayoría de las células se habrán adherido de nuevo al fondo y reanudarán la división exponencial.

4- Una vez que se cuenta con suficiente volumen de células (por ejemplo 3 ó 4 frascos) se puede proceder a realizar las preparaciones cromosómicas para su análisis.

- Obtención de la suspensión celular.

1- Los frascos en crecimiento exponencial se tripsinizan, con objeto de individualizar las células, 24 horas antes de realizar las preparaciones cromosómicas. Esto estimula la división celular y aumenta el número total de células metafásicas que se obtengan.

2- Se retira el medio de cultivo de los frascos y se sustituye por otro que contenga una concentración de 0,1 $\mu g/ml$ de colchicina y se dejan en la estufa durante 1 hora.

3- Transcurrido este tiempo los cultivos se tripsinizan de nuevo, se centrifugan a 800 rpm durante 10 minutos y los sedimentos se resuspenden en solución de ClK al 0,56%.

4- Someter la suspensión celular al choque hipotónico a 4°C durante 20-30 min.

Cultivo de leucocitos

1- Se preparan frascos de 10 ml que contengan 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640.

2- En condiciones de esterilidad, se extraen aproximadamente 5 gotas de sangre venosa del extremo del rabo y se echan en los frascos anteriormente preparados.

3- Estos se incuban durante 3 días en estufa a 37°C.

- Obtención de la suspensión celular.

1- Se añade a cada frasco una cantidad de solución de colchicina tal que la concentración final sea de 0,1 µg/ml, y se incuba durante 1 hora.

2- Se centrifuga el medio a 800 rpm durante 10 minutos, resuspendiendo el sedimento en solución de ClK al 0,56%.

3- Someter la suspensión celular al choque hipotónico a 4°C durante 20-30 min.

Soluciones y medios de cultivo

1- PBS con Ca^{++} y Mg^{++}

ClNa	0,8 gr/l
ClK	0,2 gr/l
$\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,160 gr/l
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,2 gr/l
Cl_2Ca	0,1 gr/l
$\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1 gr/l

2- HANK'S BSS (1x)

	<u>con antib.</u>	<u>Sin antib.</u>
HANK'S BSS (10x) (GIBCO o FLOW)	10 ml	10 ml
H_2O desionizada	90 ml	90 ml
CO_3HNa	0,035 gr	0,035 gr
Penicilina	0,02 gr	---
Streptomicina	0,02 gr	---

Ajustar pH 7,2-7,4 con NaOH 1N.

Esterilizar y guardar a 4°C.

3- Solución lavadora (Hank's BSS sin Ca^{++} ni Mg^{++} (1x)

Solución lavadora (10x)	10 ml
H_2O desionizada	89 ml
CO_3HNa	0,035 gr
Penicilina-Streptomicina (Stock)	1 ml

Ajustar pH 7,2-7,4 con NaOH 1N.

Esterilizar y guardar a 4°C.

4- TRIPSINA-EDTA (10x)

EDTA sal disódica	0,2 gr
Glucosa	1 gr
ClK	0,4 gr
ClNa	8 gr
Rojo fenol	0,002 gr
Tripsina 1:250	0,5 gr
H_2O desionizada	100 ml

Guardar a -20°C.

5- TRIPSINA-EDTA (1X)

Tripsina-EDTA (10x)	10 ml
H_2O desionizada	90 ml
CO_3HNa	0,058

Ajustar a pH 7,8 con NaOH 1N ó ClH 1N.

Esterilizar. Guardar a -20°C.

6- TC 199 (sin bicarbonato ni glutamina. FLOW)

	<u>100 ml</u>	<u>200 ml</u>
TC 199 10x	10 ml	20 ml
FCS (15%)	15 ml	30 ml
*H ₂ O desionizada	74 ml	148 ml
CO ₃ HNa	0,035 gr	0,07 gr
HEPES	0,4766 gr	0,9532 gr
Glutamina	0,01 gr	0,02 gr
Penicilina-Streptomicina (Stock)	1 ml	2 ml

Ajustar a pH 7,2-7,4 con NaOH 1N.

*H₂O desionizada dependiendo de la cantidad de FCS añadido.

Esterilizar. Guardar a 4°C.

7- RPMI 1640 sin bicarbonato ni glutamina (GIBCO)

	<u>100 ml</u>	<u>200 ml</u>
RPMI 1640 10x	10 ml	20 ml
FCS (15%)	15 ml	30 ml
*H ₂ O desionizada	74 ml	148 ml
CO ₃ HNa	0,035 gr	0,07 gr
HEPES	0,4766 gr	0,9532 gr
Glutamina	0,03 gr	0,06 gr
Penicilina-Streptomicina (Stock)	1 ml	2 ml

Ajustar a pH 7,2-7,4 con NaOH 1N.

*H₂O desionizada dependiendo de la cantidad de FCS añadido. Esterilizar y guardar a 4°C.

Fijación.

En todos los casos, una vez finalizado el choque hipotónico se procede a la fijación según los siguientes pasos:

1) Añadir, a modo de pre fijación, de 0.5 a 1 ml. de fijador Carnoy modificado (metanol:ácido acético en proporciones 3:1) al tubo de centrífuga que contiene el material y pipetear suavemente. Este paso tiene por objeto impedir la coagulación del sedimento que se produciría tras la centrifugación, de forma que las células permanezcan separadas y no formen grumos.

2) Centrifugar a 900 r.p.m. durante 10 min.

3) Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en, aproximadamente, 0.1 ml. de la solución hipotónica de ClK.

4) Añadir 6 ml. de fijador sobre la suspensión celular concentrada muy lentamente, de modo que no se mezclen.

5) Situar el tubo de centrífuga en un frigorífico a 4°C durante 40 min. a 1 h. (el tiempo necesario para que la suspensión celular tome un aspecto translúcido).

6) Transcurrido este tiempo, resuspender el material y centrifugar a 900 r.p.m. durante 10 min.

7) Decantar el sobrenadante y resuspender el sedimento en un poco de fijador residual (0.1 ml aproximadamente).

8) Añadir otros 6 ml. de fijador y resuspender el material.

9) Repetir los pasos 6), 7) y 8) dos veces más.



Obtención de extensiones.

Una vez fijadas las células se procede a la realización de las extensiones, para lo cual se han utilizado dos métodos diferentes:

- a) Extensiones sobre portaobjetos secos y secado al aire.
- b) Extensiones sobre portaobjetos húmedos y fríos y secado al aire.

Para cualquiera de las dos variantes se utilizan portaobjetos limpios y desengrasados en una mezcla de alcohol etílico y éter en proporciones 1:1.

Una vez ajustada la densidad celular de la suspensión se dejan caer 5-8 gotas de la misma sobre cada porta y se dejan secar al aire.

En general, las extensiones realizadas sobre portaobjetos húmedos dan mejores resultados que sobre portaobjetos secos y ambos métodos pueden utilizarse para todo tipo de bandeo cromosómico.

Estudio de la meiosis en machos

Para la obtención de cromosomas meióticos fueron utilizadas dos técnicas diferentes.

- a) Preparaciones obtenidas a partir de una suspensión celular de material testicular (Técnica I).
- b) Preparaciones obtenidas a partir de túbulos seminíferos fijados enteros (Técnica II).

Técnica I.

- Obtención de la suspensión celular.

La técnica más empleada comunmente para el estudio de la meiosis es la descrita por Ford y Evans (1968). Sin embargo, la técnica usada por nosotros, aunque inspirada en ésta, posee una serie de modificaciones basadas en el protocolo descrito anteriormente para el estudio de la mitosis.

La técnica consiste en lo siguiente:

1) Una vez sacrificado al animal por inhalación de cloroformo le son extirpados los dos testículos y éstos son pesados y situados en un pocillo con ClK 0.075 M a 37°C para el choque hipotónico.

2) Quitar la túnica que envuelve los túbulos y macerarlos en un homogeneizador manual ejerciendo una ligera presión sin hacer girar el émbolo.

3) Dejar sedimentar los restos de túbulo y pasar el sobrenadante a un tubo de centrífuga.

4) Incubar en la estufa a 37°C durante 30 min.

- Fijación.

Los pasos seguidos para la fijación de material testicular son los mismos que los descritos anteriormente para el estudio de la mitosis en médula ósea.

- Extensiones.

Las extensiones pueden realizarse siguiendo los mismos

métodos descritos anteriormente, siendo también válidas las mismas recomendaciones.

Técnica II.

- Obtención del material fijado.

Esta otra técnica para el estudio de la meiosis resulta de interés, ya que permite obtener preparaciones meióticas de animales sacrificados hace tiempo, a partir de material fijado, sin los inconvenientes que lleva consigo la utilización de preparaciones envejecidas. Básicamente, la técnica empleada es la descrita por Meredith (1969).

1) Situar uno o los dos testículos en un pocillo con Citrato sódico al 1%.

2) Quitar la túnica albugínea y separar éstos suavemente con ayuda de unas pinzas para asegurar una buena penetración de la solución hipotónica.

3) Cambiar los túbulos a otro pocillo con citrato sódico al 1%. El tiempo total de choque hipotónico ha de estar comprendido entre 10 y 15 min.

4) Coger uno pocos túbulos con unas pinzas curvas y tocar en la superficie de un porta limpio con objeto de eliminar la mayor cantidad de líquido posible, y situarlos en un frasco conteniendo unos 20 ml. de alcohol etílico:ácido acético en proporciones 3:1.

- Realización de las preparaciones.

Las preparaciones pueden realizarse a partir de los 15 min. de fijación aunque el material puede mantenerse en el

frigorífico a 4°C durante varias semanas, e incluso meses. El método empleado es el siguiente:

1) Transferir una pequeña cantidad de material a unos 100 μ l de ácido acético al 60% en un tubo cónico de centrifuga. Los túbulos se vuelven rápidamente transparentes y las células se resuspenden. Si es necesario se pipetea con una micropipeta.

2) Una vez obtenida la suspensión celular se recogen con la micropipeta unos 100 μ l de material y se dejan caer sobre un porta calentado a 60°C.

3) Inmediatamente se vuelve a recoger el material de la superficie del porta, con ayuda de la micropipeta, y se deja caer en otro lugar del mismo, y así sucesivamente hasta consumir los 50 μ l. Una vez seca, la preparación puede retirarse de la superficie caliente y teñirse.

Bandas G

Existen dos grandes grupos de técnicas para la obtención de bandas G: las que utilizan alta temperatura y elevadas presiones salinas, como el método de Sumner y col. (1971) y los que utilizan enzimas proteolíticos (v. gr., Dutrillaux y Lejeune, 1971; Seabright, 1972; Wang y Fedoroff, 1972). Además, se ha desarrollado algunas técnicas que utilizan diversos agentes para el tratamiento de los cromosomas, tales como permanganato potásico (Utakoji, 1972), SDS (Yosida y Sagai, 1972), Urea (Hsu, 1974), peróxido de hidrógeno (Buys y Osinga, 1982), y otros. Han sido descritas varias técnicas que combinan tripsina y 2xSSC para la obtención de bandas G (Gallimore y Richardson, 1973 y Bulatova y Rajabli, 1974). Sin embargo, el método de

Gallimore requiere preparaciones que lleven hechas 7 días, no dando buenos resultados las preparaciones frescas, además, requiere un largo tratamiento con 2xSSC (3 horas) y una suspensión de tripsina muy concentrada (1%). El método de Bulatova utiliza tripsina caliente y muy concentrada, y no da buenos resultados en cromosomas de mamíferos.

Nosotros hemos desarrollado una técnica combinada (Burgos y col., 1986) que salva todos los inconvenientes mencionados anteriormente, es rápida, y da resultados fácilmente reproducibles. El procedimiento seguido es el siguiente:

- 1) Sumergir la preparación en tripsina durante 20-40 segundos, con agitación continua y lavar inmediatamente en agua corriente.
- 2) Sumergir la preparación en 2xSSC a 65°C durante 1 min. a 1 min. 30'' y lavar en agua destilada.
- 3) Teñir con Giemsa al 10% durante 5 min.

Los tiempos de tratamiento con tripsina y 2xSSC son sólo orientativos, ya que los tiempos óptimos de tratamiento son muy estrictos. Sin embargo, no hay dificultad en obtener el tiempo óptimo después de escasos intentos que pueden realizarse de forma fácil y rápida.

Así, si después de una inmersión corta en 2xSSC (por ejemplo 45'') los cromosomas aparecen "huecos e hinchados", los cromosomas han sido expuestos demasiado tiempo a la acción de la tripsina. De la misma forma, si después de un largo tratamiento con 2xSSC (por ejemplo 2 min.) los cromosomas aparecen teñidos uniformemente o sólo con una cierta sugerencia de bandas, el tratamiento con tripsina fué insuficiente.

Bandas C

La técnica empleada se basa esencialmente en el método desarrollado por Sumner (1972), y consiste en lo siguiente:

- 1) Sumergir las preparaciones en una solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ al 5%, durante un tiempo que oscila entre 5 y 20 min. y que deberá estimarse efectuando varios ensayos.
- 2) Lavar enérgicamente en agua corriente.
- 3) Sumergir en 2xSSC a 60°C durante 1 hora.
- 4) Lavar con agua destilada.
- 5) Teñir con Giemsa al 2% durante 30 min.
- 6) Lavar de nuevo y dejar secar.

Tinción de las regiones de organizador nucleolar

La técnica empleada para la tinción de las NOR's es la descrita por Rufas y col. (1982) y consiste en lo siguiente:

- 1) Añadir 3 gotas de ácido fórmico a 200 ml. de agua desionizada y ajustar el pH a 3.1 ± 0.1 con más ácido fórmico o con hidróxido amónico.
- 2) Tomar 0.5 ml. de esta disolución y añadir 0.5 gr. de NO_3Ag en un recipiente muy limpio y recubierto de papel de aluminio para evitar el paso de la luz, cuidando que el NO_3Ag no toque ningún objeto metálico.
- 3) Agitar suavemente para favorecer la suspensión coloidal.

4) Dejar caer, con una pipeta Pasteur, 2 ó 3 gotas de la suspensión sobre la preparación a tratar y cubrirla con un cubre o con un porta.

5) Situar la preparación en una estufa saturada de humedad a 60°C durante varios minutos.

6) Lavar rápidamente con agua abundante.

7) Si la preparación no está lo suficientemente impregnada puede tratarse de nuevo.

8) Secar y montar.

Tinción secuencial NOR-Giemsa

Para estudiar la correlación entre la tinción argéntica positiva de las NORs y la presencia de constricción secundaria en esta posición, hemos desarrollado un técnica de tinción secuencial NOR-Giemsa (Jiménez y col., 1988).

1) Las preparaciones son teñidas con NO_3Ag por la técnica de Rufas y col. (1982) para visualizar las NORs.

2) Una vez observadas y fotografiadas las células la preparación es sumergida en intensificador fotográfico (dicromato potásico 0.4% : ClH 10% : agua; en proporciones 10:10:5) durante el tiempo necesario para que desaparezca la coloración dorada de la misma.

3) Lavar con agua destilada.

4) Sumergir en fijador fotográfico convencional durante 10 min. aproximadamente y lavar de nuevo.

5) Una vez seca la preparación, comprobar la decoloración mediante observación al microscopio.

6) Teñir con giemsa al 10% durante 5 min.

Las mismas células pueden ser ahora observadas y fotografiadas de nuevo.

Técnicas de fluorescencia

Aún cuando los fluorocromos interaccionan específicamente con determinadas secuencias de nucleótidos y, en consecuencia, producen en los cromosomas una tinción diferencial, el resultado es mejorado cuando se utiliza sobre un mismo preparado una combinación de colorantes, fluorescentes o no, produciendo lo que se denomina una contratinción.

Tinción con Cromomicina A₃. (Schweizer, 1976 y 1979).

Se utiliza como contratinción la Distamicina A (DA).

Solución de Cromomicina A₃.(Sigma): 0,5 mg/ml de tampón McIlvaine pH 7 con 2,5 mM de Cl₂Mg. El tampón se adiciona suavemente sin disturbar y se disuelve el antibiótico lentamente en el frigorífico durante toda la noche.

Solución de Distamicina A. (Sigma): 0,05-0,1 mg/ml de tampón. Se disuelve la distamicina A en tampón McIlvaine pH 7 inmediatamente antes de usar.

Método de tinción.

- 1) Poner unas gotas de CMA sobre la preparación cromosómica, cubrir con un cubreobjetos e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 minutos.
- 2) Quitar el cubre, lavar brevemente la preparación con agua destilada y soplar con una pera de goma para eliminar las gotas de agua.
- 3) Poner unas gotas de DA sobre la preparación cromosómica, cubrir con un cubreobjetos e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 minutos.
- 4) Quitar el cubre y lavar sumergiendo la preparación brevemente en agua destilada y soplar con una pera de goma para eliminar las gotas de agua.
- 5) Montar en una mezcla de Glicerol: McIlvaine pH 7 1:1.
- 6) Envejecer la preparación guardandola en estufa a 37°C durante 12 horas aproximadamente.

Tinción triple CMA/DA/DAPI. (Schweizer, 1980, 1981).

Además de las soluciones de CMA y DA descritas anteriormente, es necesario preparar una solución de diamino-fenil-indol (DAPI) de la forma siguiente:

Solución de DAPI (Sigma): 1µg/ml de tampón McIlvaine a pH 7. Esta solución se debe hacer preferentemente, a partir de una solución stock de 0.1 mg/ml de agua destilada, inmediatamente antes de usar.

Método de tinción

- 1) Teñir la preparación con CMA/DA siguiendo los pasos 1 a 4 del método anterior.
- 2) Poner unas gotas de DAPI, cubrir con un cubreobjetos e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 min.
- 3) Quitar el cubre y lavar sumergiendo la preparación brevemente en agua destilada y soplar con una pera de goma para eliminar las gotas de agua.
- 4) Montar en una mezcla de Glicerol: McIlvaine pH 7 1:1.
- 5) Envejecer la preparación guardandola en estufa a 37°C durante 12 horas aproximadamente.

Técnicas de microextensión para la observación de complejos sinaptonémicos al microscopio electrónico

Las diversas técnicas que existen en la actualidad para la obtención de microextensiones de espermatozoides primarios que permitan la visualización de complejos sinaptonémicos, se basan fundamentalmente en la técnica original de Counce y Meyer (1973), descrita para saltamontes. Posteriormente, Moses (1977a y b) modifica la técnica para adaptarla al estudio de mamíferos y Dresser y Moses (1979 y 1980) aplican las técnicas de impregnación argéntica para la tinción de complejos sinaptonémicos, lo que posibilita su observación, tanto al microscopio óptico como electrónico. Paralelamente aparecieron diversas modificaciones de la técnica básica para su adaptación a la observación exclusiva al microscopio óptico (Fletcher, 1979; Dietrich y Mulder, 1981). En 1980, Solari introduce la utilización de dodecil sulfato sódico

(SDS), que mejora considerablemente la calidad de las preparaciones, técnica utilizada por nosotros en el presente trabajo y que a continuación describimos.

Preparación de la suspensión de células testiculares

El animal objeto de estudio es sacrificado mediante sobredosis de cloroformo. Los testículos son rápidamente extraídos, pesados y colocados en una pequeña placa de petri conteniendo medio de cultivo (MEM: minimum esencial medium, o TC199) a temperatura ambiente. Trás extraer todos los tejidos anexos, la túnica albugínea es cortada y la masa testicular expulsada fuera de la misma con la ayuda de dos pinzas curvas, y colocada en un pocillo de vidrio con aproximadamente 0.5 ml. de medio, en donde se extraen los vasos sanguíneos en la medida de lo posible. Para la realización de la técnica sólo son necesarios 0.2-0.3 g de tejido testicular pudiendo ser empleado el resto para realizar preparaciones meióticas como se describió en el capítulo correspondiente.

Colocando el pocillo con el material en posición inclinada se macera éste concienzudamente con las puntas de unas tijeras finas, trás lo cual se dejan sedimentar los trozos más gruesos durante 1 min. aproximadamente. Con la ayuda de una micropipeta de vidrio (construida estirando a la llama de un mechero la sección capilar de una pipeta Pasteur de cuello largo) de aproximadamente 0.5 mm. de \varnothing , se recoge la suspensión celular sobrenadante y se pasa a un tubo cónico de centrífuga, que se coloca en un vaso con hielo picado o con una mezcla de agua y trozos de hielo (0°C). Una microgota de la suspensión celular se examina bajo un cubreobjetos en el microscopio de contraste de fases para comprobar la presencia de abundantes espermatoцитos primarios.

Preparación de los portas con plástico

Se prepara una disolución de 0.5 gr de plástico extraído de un frasco de cultivo de tejidos en 100 ml de cloroformo en un bote de vidrio de 100 ml. de capacidad y boca ancha. Se lavan y desengrasan perfectamente con etanol : eter (1:1) varios portaobjetos de borde esmerilado. En una cámara de flujo laminar, o en una habitación exenta de polvo en suspensión, se introducen los portas uno a uno en la solución de plástico hasta sumergirlos por completo, sujetos por unas pinzas. Transcurridos 4-5 segundos se extraen rápidamente y, tras dejar drenar sobre el frasco el exceso de líquido durante unos segundos, se colocan verticalmente sobre una superficie de vidrio, apoyados en otra superficie vertical, hasta que se sequen completamente (10 min. aproximadamente).

Posteriormente se sellan los bordes sumergiendo éstos hasta una profundidad de 2-3 mm. en una disolución de DePex diluido con xileno. Para ello es preciso no tocar el porta (ya recubierto de una delgada película de plástico) por otro sitio que no sea el mismo por el que se cogió con las pinzas en la operación anterior. Una vez hecho esto, los portas se cuelgan durante ¼ hora asidos por el mismo sitio, hasta su secado total, tras lo cual se pueden guardar en un contenedor de preparaciones hasta su uso.

El recubrimiento de portas con plástico ha de hacerse preferentemente en ambiente seco, puesto que la humedad ambiental provoca la aparición en la lámina de plástico de microgotas que imposibilitan su uso en microscopía electrónica.

Preparación de las soluciones

- Fijador

Preparar una disolución al 10% de formol comercial al 40% (concentración final 4%), o bien una disolución al 4% de paraformaldehído, para lo cual hay que calentar 70 ml de agua hasta 60-80°C y, en agitación, añadir 4g. de paraformaldehído en polvo y continuar agitando; añadir entonces 6 gotas de NaOH 1.0 N y agitar hasta que la solución se vuelva transparente e incolora. Una vez preparada la solución de formol, añadir en frío 0.03 g. de SDS y ajustar a pH 8.5 con NaOH 0.5 N antes de usar. Colocar la solución en un vaso de Koplín y taparla.

- Solución de extensión

Se preparan 200 ml. de solución de sacarosa 0.3 M, para lo cual se disuelven 20.4 g. de sacarosa en 150 ml de agua y luego se lleva a un volumen final de 200 ml.

- Solución de Photoflo

Se prepara una solución stock al 12% de Photoflo 200, o al 4% de Photoflo 600 (humectante fotográfico de Kodak), que se guarda en el frigorífico. Antes de ser usada, se prepara una solución al 10% de la anterior y se le ajusta el pH a 8.5 con tampón borato pH=9. Es conveniente preparar 200-300 ml de solución, que se guardan en un frasco con cierre hermético, desde el cual se irán pasando a un vaso de Koplín de 50 ml. conforme vaya siendo preciso.

Realización de las microextensiones

Un vidrio de reloj colocado en la platina de una lupa

binocular con fondo negro es llenado con una jeringa de 10 ml con la solución de sacarosa hasta que se forme un menisco ligeramente convexo. Con la lupa se enfoca la superficie del líquido para inspeccionar su limpieza. Si se observan demasiadas partículas de polvo sobre la misma, se "barre" ésta con la cara rugosa de una servilleta de papel.

Con la micropipeta de vidrio antes construida se toma una pequeña porción de la suspensión celular y se presiona la tetina hasta que salga una pequeña gota (de no más de 2 mm de \varnothing) sin dejar que ésta se descuelgue de la punta de la micropipeta. En este momento se aproxima la gota hasta que toque muy suavemente la superficie de la solución de extensión, de forma que el contenido de la gota se extienda rápidamente por la superficie del líquido, dando la impresión de que la gota ha desaparecido. Si por el contrario, la gota se hunde, o se extiende muy lentamente, será necesario desechar la solución y repetir de nuevo toda la operación.

Una vez conseguida la extensión de las células en la superficie de la solución de sacarosa, ésta se puede visualizar a la lupa, aunque el proceso puede ser seguido fácilmente a simple vista. A continuación se toca la superficie del líquido con un porta recubierto de plástico de forma ligeramente oblicua y no paralelamente al mismo para evitar así la formación de burbujas. El porta se retira rápidamente, separando primero un extremo y luego el otro, y se drena el exceso de líquido colocándolo inclinado sobre un papel de filtro.

Acto seguido, la preparación se sumerge suavemente en el fijador, donde permanecerá 10 min. a t_{a} ambiente.

Transcurrido este tiempo, se pasa a la solución de Photoflo

durante 30 s. y, finalmente, se colocan sobre un papel de filtro en posición vertical hasta que sequen por completo. La solución de Photoflo deberá desecharse y reemplazarse por otra nueva después de realizar no más de dos o tres preparaciones puesto que en ella se va acumulando fijador.

La manipulación de los portas debe hacerse muy cuidadosamente durante todo el procedimiento puesto que cualquier deterioro en la lámina de plástico provocará que ésta se despegue del vidrio al sumergirlo en los líquidos, en especial el Photoflo, que posee muy baja tensión superficial.

Una vez secas las preparaciones, se pueden inspeccionar en el microscopio de contraste de fases con un objetivo 40x, para comprobar la existencia de espermatozoides que muestren complejos sinaptonémicos bien extendidos e individualizados. Esta operación es conveniente sobre todo después de haber hecho la primera preparación para ajustar la densidad celular, bien variando el tamaño de la gota o concentrando o diluyendo la suspensión celular.

Tinción

Tras probar diversas técnicas de tinción con NO_3Ag , como la anteriormente descrita de Rufas y col. (1982), nosotros optamos por utilizar la técnica de Howell y Black (1980) porque proporciona un precipitado más fino de los granos de plata y, por tanto, permite un mayor detalle en la observación ultramicroscópica, si bien no muestra diferencia apreciable a nivel de microscopía óptica. Por otro lado, evita la aparición de precipitado de fondo en las preparaciones, cosa que no siempre se puede evitar con el empleo de otras técnicas. Otra gran ventaja de este método, es su gran rapidez.

Para llevar a cabo la tinción, se prepara una solución de gelatina pura al 2% y ácido fórmico al 1% en agua bidestilada o desionizada y otra solución acuosa de NO_3Ag al 50%. La primera puede conservarse varias semanas a temperatura ambiente (en el frigorífico solidifica y se estropea) mientras que la segunda se prepara extemporáneamente cada vez que va a ser usada, Para ello, nosotros disolvemos 0.125 g. de NO_3Ag en 0.25 ml. de agua en un pequeño frasco de vidrio ambar perfectamente limpio y seco, o en un frasco de vidrio incoloro recubierto de papel de aluminio para evitar el paso de la luz.

La preparación se coloca sobre una placa termostática ajustada a 60°C y, sobre ella, se ponen dos gotas de la solución coloidal de gelatina y cuatro gotas de la solución de NO_3Ag y se mezclan pipeteando suavemente sobre la misma preparación, cuidando de no tocar ésta con la punta de la pipeta, pues romperíamos el plástico. Colocamos un cubre de 24×60 mm. A los 30 s. aproximadamente, la mezcla colorante se volverá amarilla y en dos min. habrá tomado una coloración marrón-dorada. En este momento se puede vigilar la tinción al microscopio óptico, y si ésta es satisfactoria, se elimina el cubre y la solución, colocando la preparación bajo un chorro suave de agua destilada. Una vez bien lavada la preparación, se deja secar al aire.

Montaje de las rejillas para la observación ultramicroscópica

Los portas plastificados y con el material fijado y teñido pueden montarse con una mezcla de agua y glicerol (1:1) para su observación al microscopio óptico. Aquellos espermatoцитos de diferentes fases que presenten las condiciones óptimas de extensión y calidad de tinción pueden ser observados y fotografiados con objetivo de inmersión y

sus coordenadas apuntadas.

Una vez que toda la preparación ha sido observada, se toma un porta limpio, que nos servirá de réplica, en el cual se marcará un punto con un rotulador graso sobre el haz de luz del microscopio en cada una de las posiciones correspondientes a las células de las cuales se anotaron las coordenadas.

Cuando esta operación está completada, se coloca la preparación sobre la réplica punteada, ajustando perfectamente los bordes, de modo que sobre cada punto marcado en el porta inferior (réplica) habrá una célula en el porta superior (preparación).

Con un lápiz de diamante de los comunmente usados para marcar las preparaciones, se trazan círculos de 2-3 mm. de diámetro en la superficie de la preparación guiándonos por la posición de los puntos marcados en la réplica inferior. Si todo se ha hecho escrupulosamente, en cada uno de los círculos de plástico resultantes estará la célula que nos interesa. Ahora corresponde despegar los círculos de plástico del porta, para lo cual se introducirá éste de forma oblicua en un cristalizador lleno hasta el borde de agua destilada limpia. La tensión superficial del agua al entrar en la raya hecha por el diamante, despegará el círculo de plástico que quedará flotando en la misma. Poniendo un fondo negro bajo el cristalizador, e iluminación oblicua, no habrá problemas para ver la lámina de plástico flotando. Usando unas pinzas planas de punta muy fina, se toma una rejilla de microscopio electrónico de tres mm de diámetro y malla 100 ó 50, se sumerge en el agua y con ella se "pesca" desde abajo el círculo de plástico y se deposita, acto seguido, sobre un papel de filtro dentro de una placa de petri para evitar que le caiga polvo. Colocando las

rejillas ya montadas sobre un porta limpio, se pueden inspeccionar éstas al microscopio óptico, para desechar aquellas en que no haya ninguna célula completa, o aquellas en que éstas hayan coincidido con un barroto de la rejilla. En las rejillas útiles (generalmente la gran mayoría), se anotan las cuadrículas en que se encuentran las células interesantes con el fin de ahorrar tiempo en la utilización del microscopio electrónico.

En el presente trabajo se ha usado el microscopio electrónico de transmisión Zeiss 10 C TEM de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, con un factor de corrección de aumento de 0.4x, que permite un rango gradual a bajo aumento. Las células fueron fotografiadas completas dentro del rango de 800-1200 aumentos, mientras que los detalles del bivalente sexual se fotografiaron entre los 7000-12600 aumentos, sobre placas de 7x9 cm.

Recuento de espermatozoides

Para hacer una estimación de la fertilidad de cada uno de los machos, se hicieron recuentos del número total de espermatozoides existentes en los epidídimos de los mismos. Ambos epidídimos fueron cuidadosamente extraídos enteros y colocados en una placa de petri que contenía 20 ml., exactamente medidos, de tampón fosfato en donde fueron troceados con unas tijeras finas. Los trozos fueron pasados a un homogeneizador manual cónico de vidrio y ligeramente presionados con el émbolo. Tras esta operación, los espermatozoides quedan suspendidos en el líquido y puede hacerse un recuento en una cámara de Neubauer. Una vez estimado el número de espermatozoides por ml., obtendremos el número total multiplicando este valor por 20. En algunos casos (para epidídimos de animales con pequeños testículos)

se usaron solamente 4 ml. de tampón fosfato para suspender los espermatozoides.

Estimación de la edad relativa

En cada animal se obtuvo un índice proporcional a la edad del mismo, basado en el desgaste dental, con objeto de poder diferenciar los animales con escaso desarrollo sexual debido a su corta edad, de aquellos otros que presentan testículos reducidos a pesar de estar en edad adulta.

De los craneos disecados y blanqueados se extrajeron ambos molares m^1 . Se escogieron estas piezas porque son la únicas que siempre permanecen unidas al craneo y por tanto nunca se pierden en la manipulación del mismo. Los molares m^1 fueron medidos con una regla sobre un papel colocado bajo el visor de una cámara clara acoplada al ocular de una lupa con un aumento de 25x, mediante la cual se podía visualizar simultáneamente la imagen de la pieza y el papel. El índice de edad (I.E.) se obtuvo calculando la media aritmética de los resultados de aplicar la fórmula $IE=A/(B+C)$ a cada m^1 , donde A, B y C son los parámetros medidos en cada pieza de acuerdo con la figura 6. Tal como se puede deducir, este índice está en proporción directa con el desgaste dental y, consecuentemente, con la edad del animal.

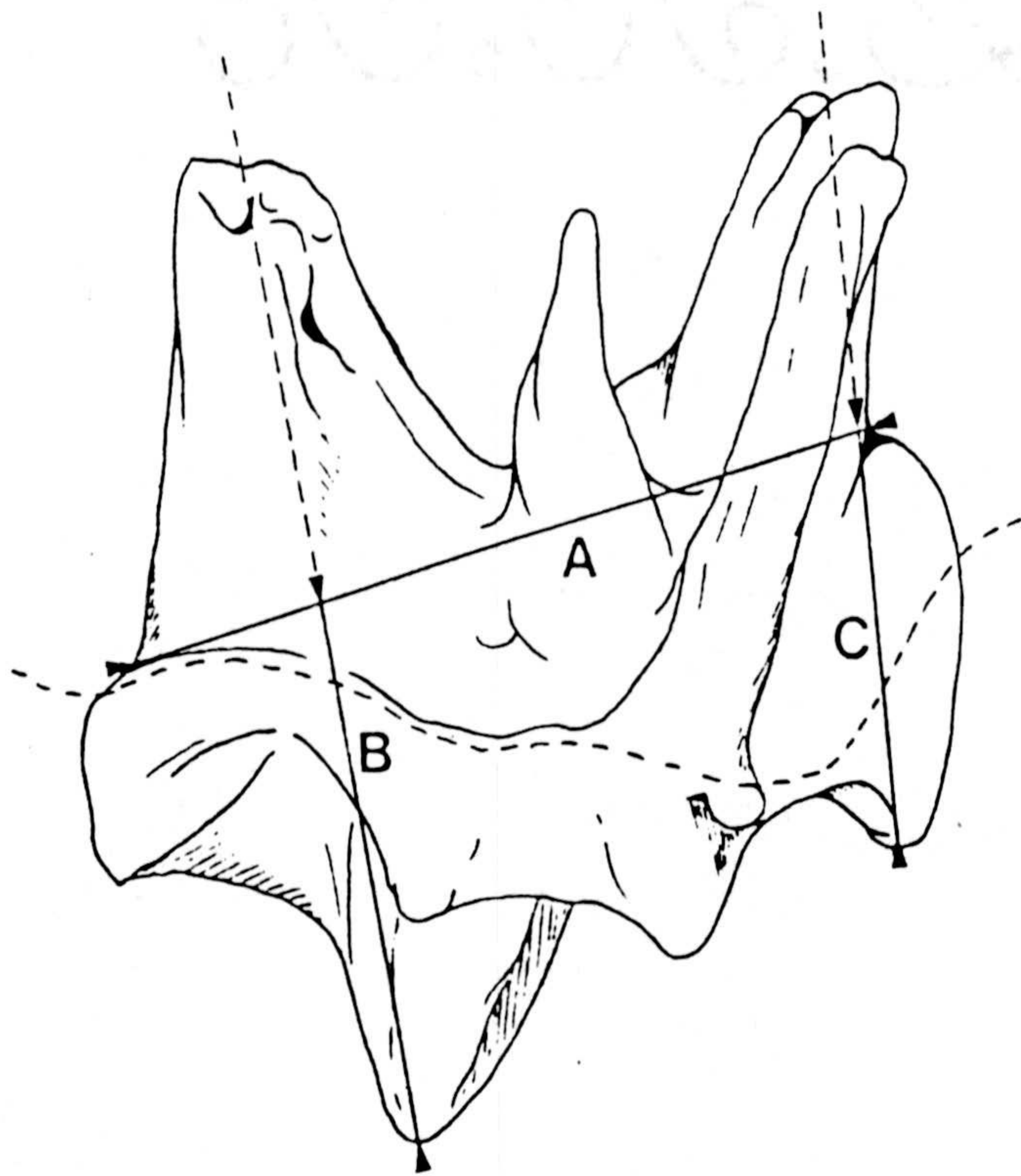
Técnicas histológicas

La realización de los cortes histológicos de las gónadas de determinados individuos se ha llevado a cabo mediante la utilización de las técnicas convencionales de fijación en AFA (alcohol-formol-acético), inclusión en bloque de parafina y tinción con hematoxilina-eosina.



Fig. 6.- Esquema del molar m^1 de *T. occidentalis*, donde se indican las medidas A, B y C, tomadas en ambas piezas de cada animal y utilizadas en la estimación del índice de edad (I.E.) mediante la fórmula $IE=A/(B+C)$.





6

1970
1971
1972
1973
1974

RESULTADOS

RESULTADOS

ESTUDIOS CITOGENETICOS

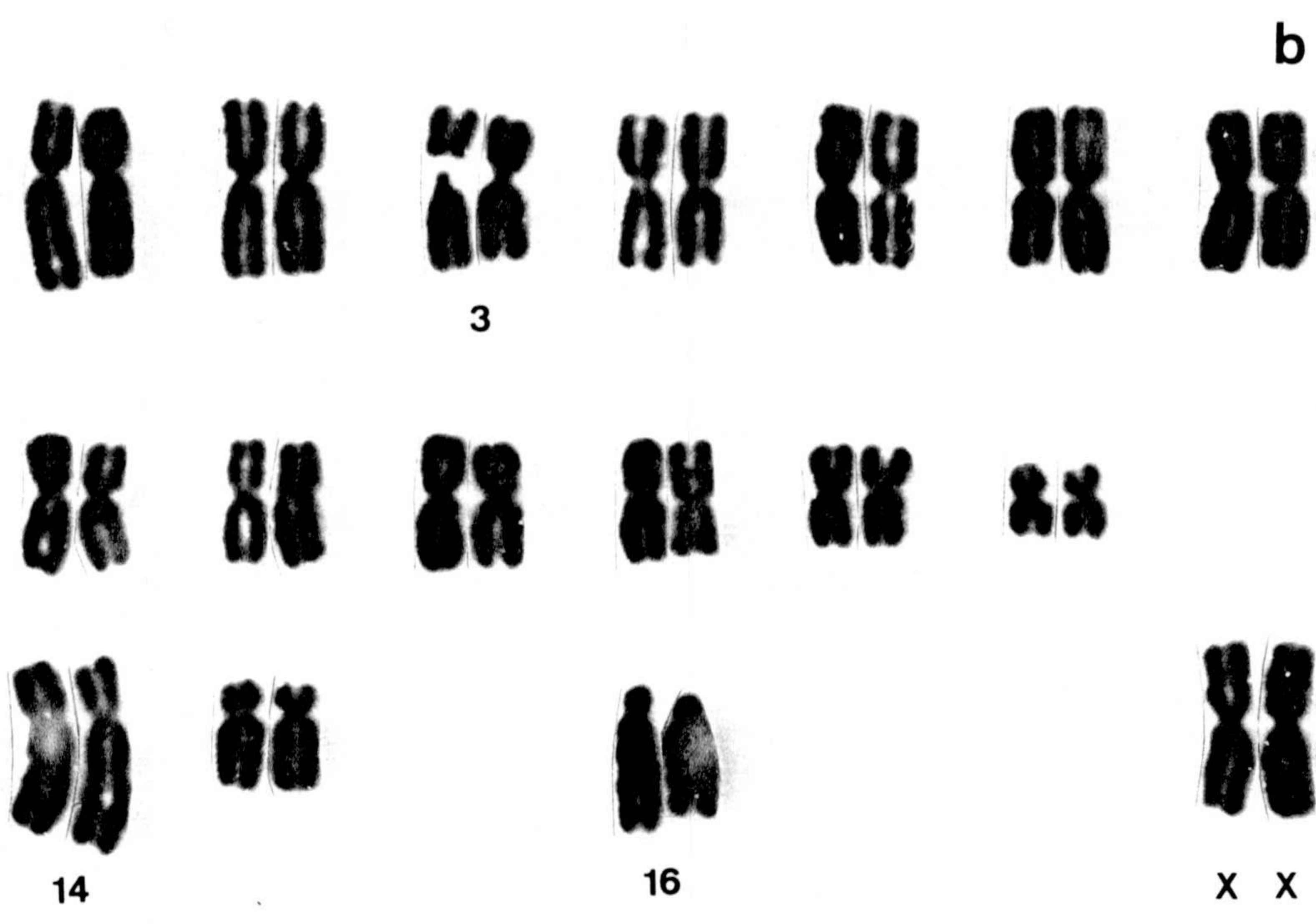
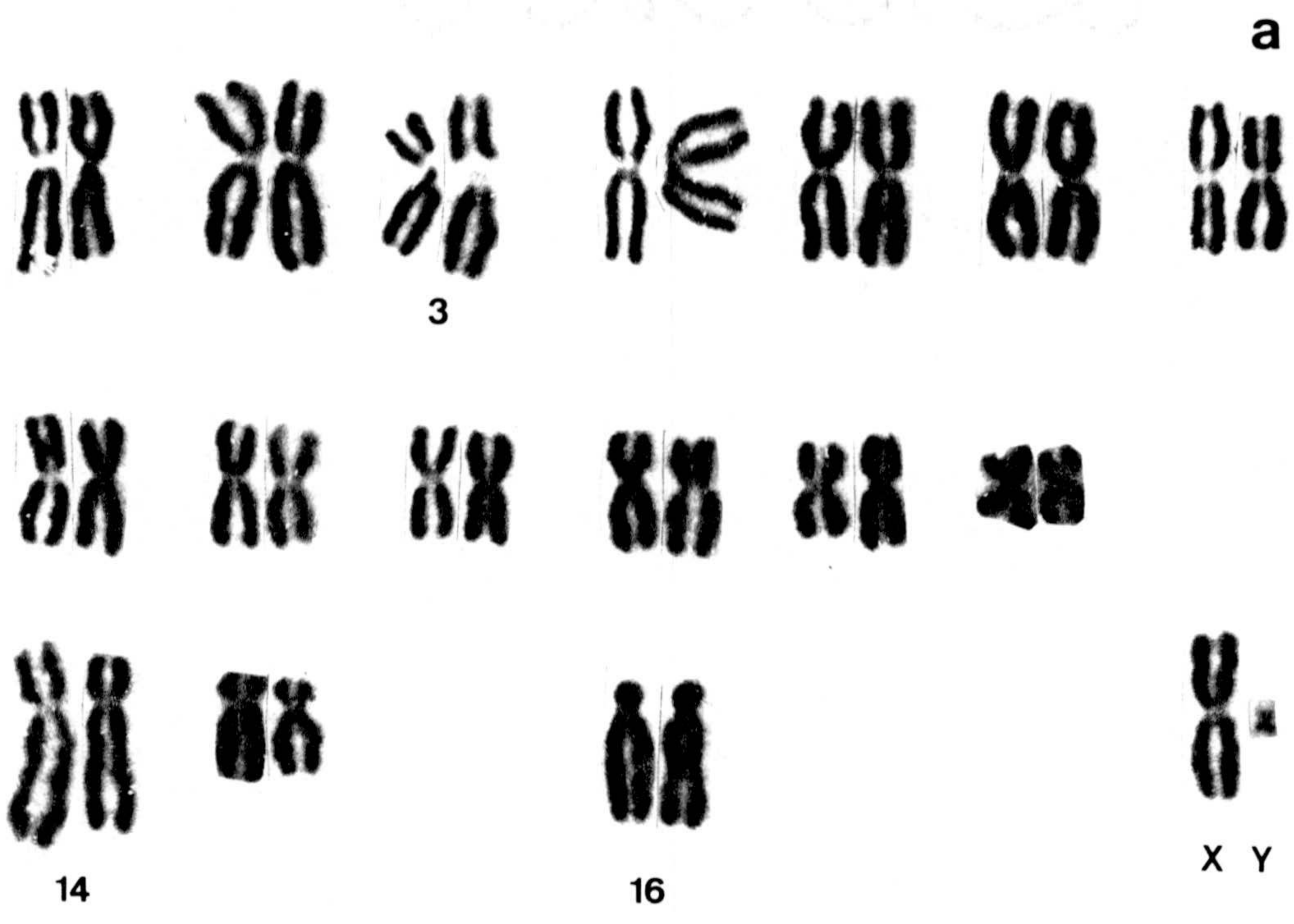
Mitosis. Descripción del cariotipo

Sólo han sido encontradas en esta población dos formas cariotípicas correspondientes a los cariotipos de macho y de hembra. Los individuos que mostraban un cariotipo $2n=34,XY$ (Fig. 7a) eran invariablemente machos normales (Tabla I), mientras que el cariotipo $2n=34,XX$ (Fig. 7b) fué encontrado en tres tipos diferentes de individuos: hembras normales fértiles, machos de sexo revertido e intersexos (Tabla I).

Los cromosomas han sido clasificados en cuatro grupos de acuerdo con su tamaño e índice centromérico: Grupo A, compuesto por trece pares de cromosomas metacéntricos, de los cuales el par tres muestra una clara y amplia constricción secundaria cerca del centrómero y representa, según Gropp (1969), un marcador cromosómico común para todas las especies del género *Talpa* y otros géneros de la Familia Talpidae; grupo B, con dos pares de cromosomas submetacéntricos de los cuales el par 14 representa el de mayor tamaño del complemento; grupo C, el par cromosómico 16, de morfología acrocéntrica, que muestra un brazo corto de reducido tamaño y representa el elemento que marca las diferencias cariotípicas entre las distintas especies de éste género, en forma de pequeñas variaciones en el tamaño del brazo corto (Todorovic y col., 1972); grupo D, par sexual constituido por un cromosoma X metacéntrico, muy similar en tamaño a los de los pares 2 ó 4, y un cromosoma Y de muy pequeño tamaño que en la mayoría de las placas

Fig. 7.- Cariotipos de *T.occidentalis* tras tinción convencional con Giemsa de (a) macho y (b) hembra. Nótese la constricción secundaria del par tres y el pequeño tamaño del cromosoma Y. Barra = 10 μ m.





metafásicas se muestra como un simple punto, aunque en metafases de cromosomas poco contraídos se le puede observar una morfología metacéntrica.

De acuerdo con la morfología cromosómica descrita el número fundamental de esta especie es $NF=68$.

Bandas G

En preparaciones citogenéticas convencionales teñidas con giemsa varios pares cromosómicos no pueden ser claramente identificados, especialmente los cromosomas de las parejas 2, 4 y el X, que poseen similar tamaño y morfología. La utilización del bandeo G permite una identificación clara de todas las parejas, puesto que cada una de ellas muestra un patrón de bandas característico (Figs. 8a y b). Sólo de esta forma es posible distinguir la pareja sexual en las hembras.

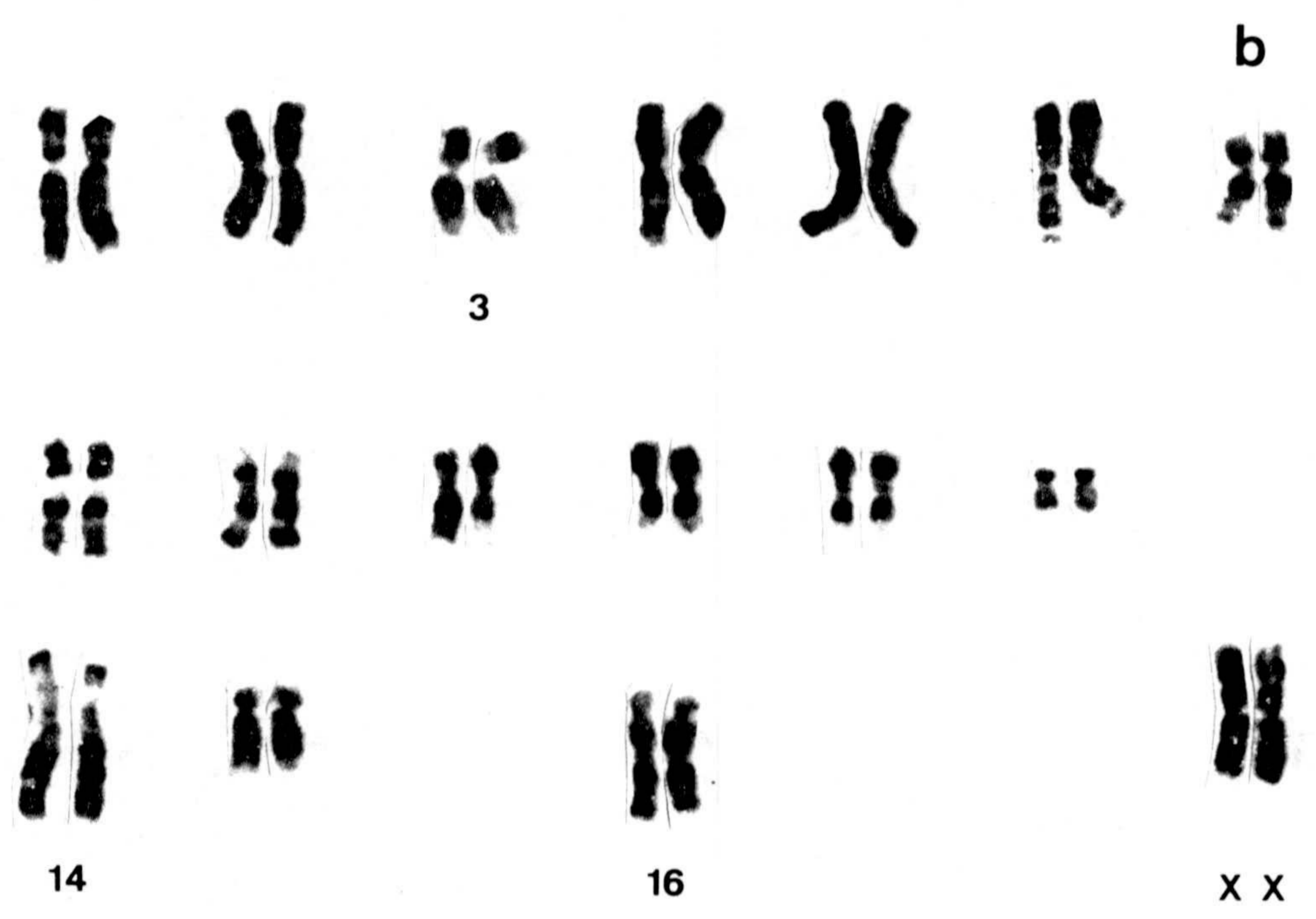
Como característica a destacar en el cariotipo de bandas G de *Talpa occidentalis* podemos citar: a) en la pareja 3 permanece la zona clara correspondiente a la constricción secundaria, b) el cromosoma Y no muestra ningún tipo de banda oscura, apareciendo muy ligeramente teñido en todas las metafases, y c) el cromosoma X muestra un patrón de bandas con un alto grado de simetría con respecto a la región centromérica. El patrón de bandas del cromosoma X es invariable en todos los individuos independientemente de su diferenciación sexual.

Bandas C

Esta técnica permite demostrar la presencia de heterocromatina constitutiva en todos los cromosomas del

Fig. 8.- Cariotipos de bandeo G en macho (a) y hembra (b) de *T. occidentalis*. Nótese la constancia en la ausencia de tinción de la constricción secundaria del par 3, la extensa región G negativa del par 14 y la simetría en el patrón de bandas en el cromosoma X. Barra = 10 μ m.





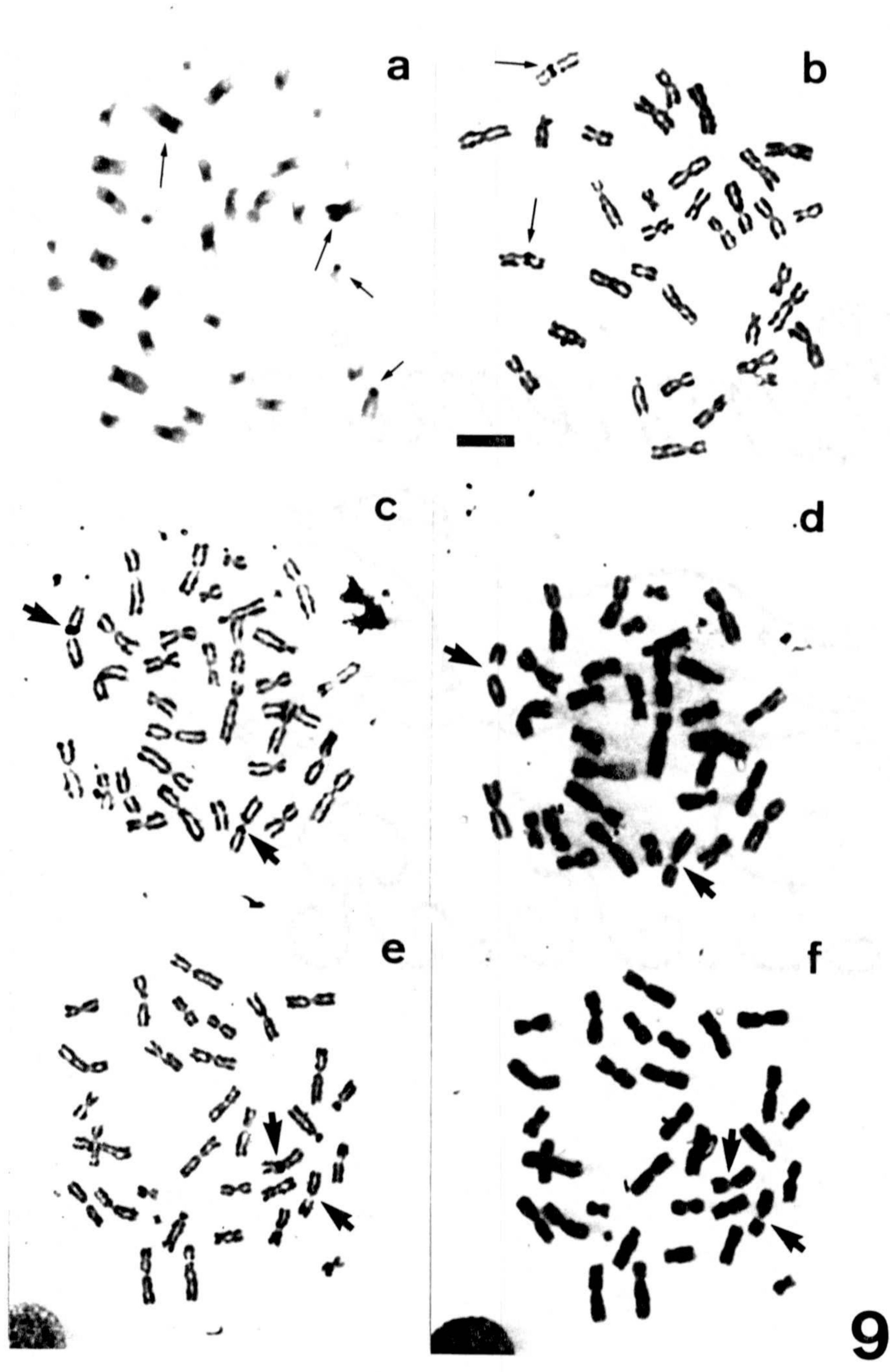
cariotipo (Fig. 9a). La mayoría de ellos sólo poseen una tenue banda C centromérica, mientras que el par 14 presenta un amplio bloque heterocromático que comprende casi la totalidad del brazo corto y $\frac{1}{4}$ del brazo largo en su región proximal. Por su parte, el cromosoma Y carece de banda C, apareciendo siempre muy ligeramente teñido. Es interesante destacar que la totalidad del brazo corto del par 16 está formado por heterocromatina constitutiva. Dado que en él radican las diferencias cariotípicas entre las distintas especies estudiadas del género *Talpa*, (Todorovic y col., 1972), su carácter heterocromático podría estar relacionado con un modelo de evolución cariotípica basado deleciones de diferentes porciones de este brazo corto del cromosoma 16. Según Hoi Sen Yong (1972), la pérdida de fragmentos de heterocromatina constitutiva podría ser tolerada sin efectos deletéreos, lo que probablemente no ocurriría en el caso de deleciones eucromáticas.

Regiones organizadoras del nucleolo (NORs)

En todos los casos las regiones organizadoras del nucleolo (NORs) estaban localizadas únicamente en la constricción secundaria del par 3 (Fig. 9b), observándose frecuentemente la asociación de los dos cromosomas 3 por estas regiones, lo que sugiere la organización de un único nucleolo, hecho que se corresponde con lo observado en núcleos mitóticos interfásicos y en profase meiótica.

Un hecho que nos llamó la atención fue la existencia de una gran variabilidad en el número de NORs por célula en las preparaciones teñidas con NO_3Ag , así como en la presencia y ausencia de constricción secundaria en aquellas teñidas con giemsa. Teniendo en cuenta que esta especie solo presenta una pareja de cromosomas portadores de NOR y que ésta es

Fig. 9.- Bandas C y NOR en *T. occidentalis*. **a)** Metafase con bandeo C; todos los cromosomas muestran una banda C centromérica a excepción del par 14 (flechas largas) que presenta un extenso bloque heterocromático y el par 16 (flechas cortas) que muestra todo su brazo corto C positivo. **b)** Metafase teñida con NO₃Ag que pone de manifiesto la existencia de una única pareja de cromosomas, el par 3, portadores de NORs. **c-d** y **e-f)** Tinciones secuenciales NO₃Ag-Giemsa en dos células de *T. occidentalis* que, además de constatar la localización de las NORs a nivel de la constricción secundaria del par 3, permiten el análisis de correlación entre la presencia de tinción y de constricción secundaria: en **c-d)** constricciones secundarias de diferente tamaño presentan diferente intensidad de tinción con NO₃Ag; en **e-f)** la constricción secundaria de uno de los cromosomas se tiñe pero no la del otro. Barra = 10 μm.



fácilmente identificable en todas las placas metafásicas, nos encontramos ante un material idóneo para el estudio de un problema citogenético de gran interés, como es el significado biológico que la tinción con NO_3Ag tiene en las células en división. Por ello, y aunque se aparta un poco de la línea general de este trabajo (estudio de las anomalías en la diferenciación sexual de *T. occidentalis*), nos decidimos a llevar a cabo un análisis de correlación entre la capacidad de tinción con plata de las NORs y el estado, descondensado o no, de su cromatina, tal como se manifiesta en la presencia o ausencia de constricción secundaria, cuestión que ha sido foco de atención de numerosos trabajos recientes (ver Medina y col., 1983 y Hubbell, 1985 como revisiones).

Para ello se analizaron 40 células de esta especie, representando un total de 80 cromosomas portadores de NOR. Cada célula fue teñida con NO_3Ag y fotografiada, y, posteriormente, desteñida y teñida de nuevo con giemsa según el método descrito en el capítulo de Material y Métodos (Figs. 9c-d y 9e-f). Para cada cromosoma se anotó la presencia (+) o ausencia (-) de tinción argéntica y de constricción secundaria. Los resultados obtenidos en este estudio están expresados en la tabla II.

Sometidos estos datos a un análisis de correlación para investigar la posible interrelación entre ambos parámetros (tinción argéntica y constricción secundaria), se obtuvo una correlación significativamente positiva entre ellos ($r=0.698$, $t=8.61$, $p<0.01$).

En las figuras 9c y d se puede comprobar además una correlación cualitativa entre el tamaño de la NOR teñida y el de la constricción secundaria en que se encuentra. Esta correlación es positiva en la totalidad de los casos.

TABLA II.- Análisis de la correlación entre la tinción argéntica de las NORs y la existencia de constricción secundaria en el par 3 de *T. occidentalis*

		TINCION ARGENTICA DE LAS NORs		
		+	-	
CONSTRICCION	+	45	13	58
SECUNDARIA	-	0	22	22
		45	35	80

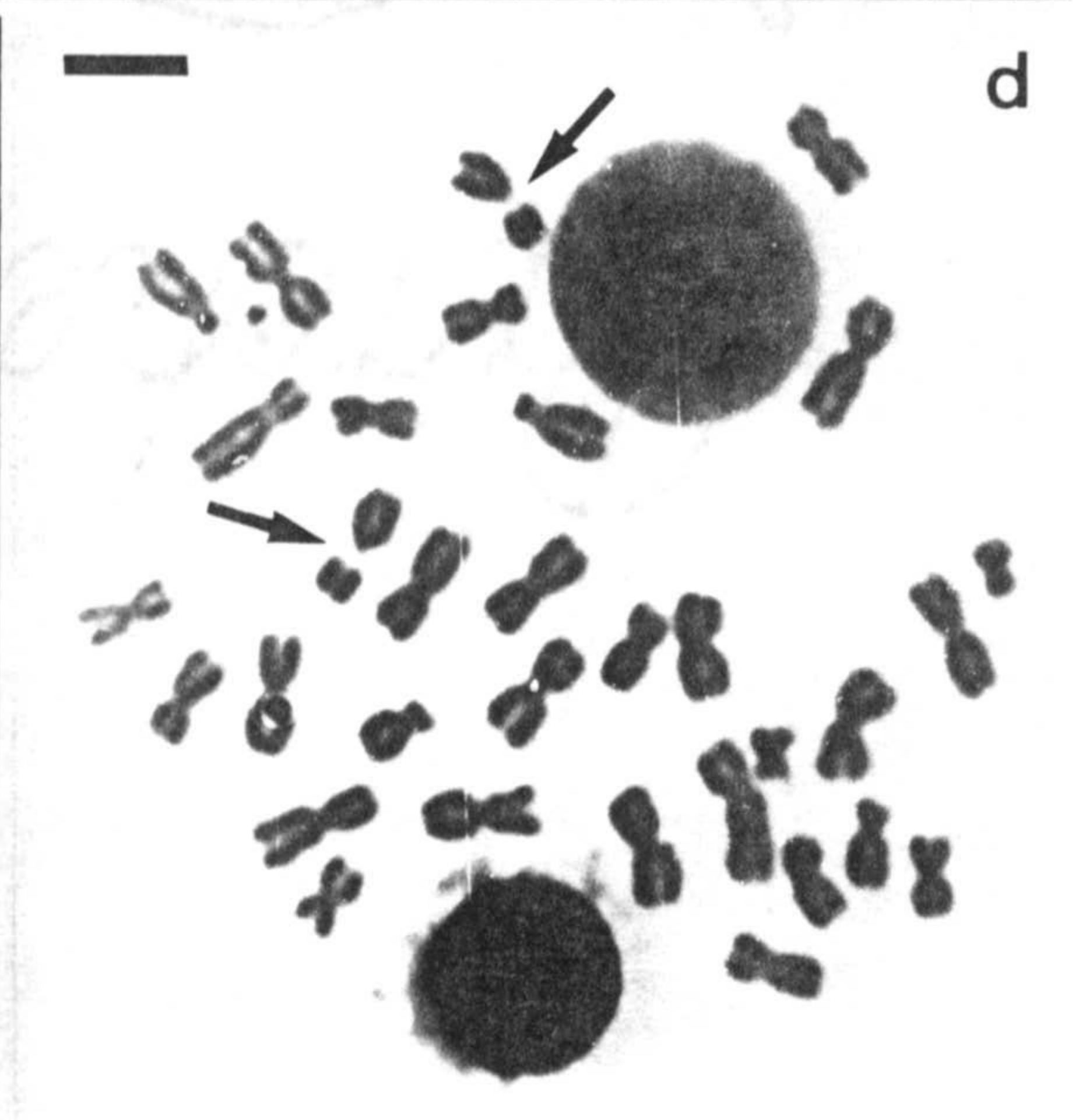
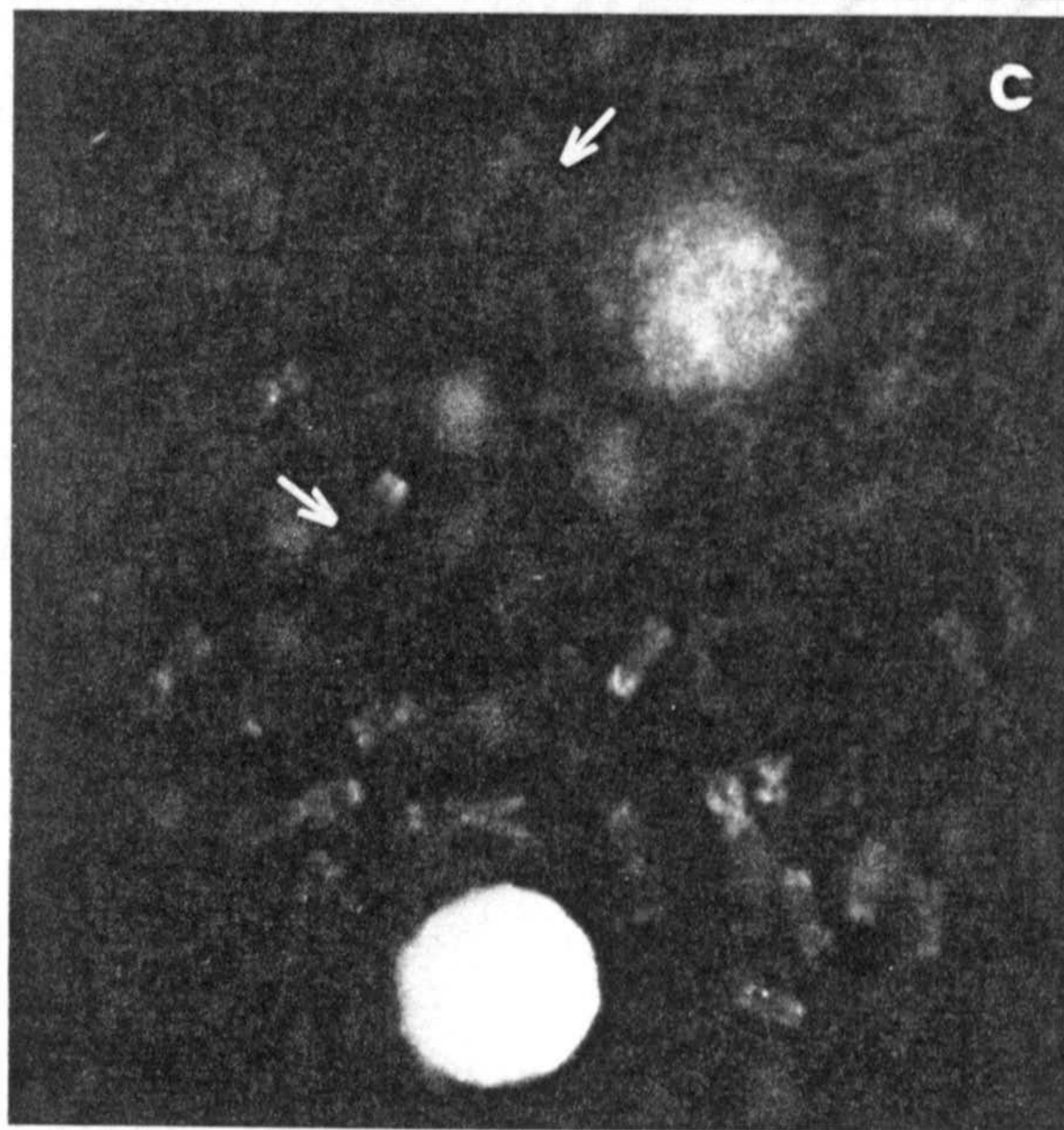
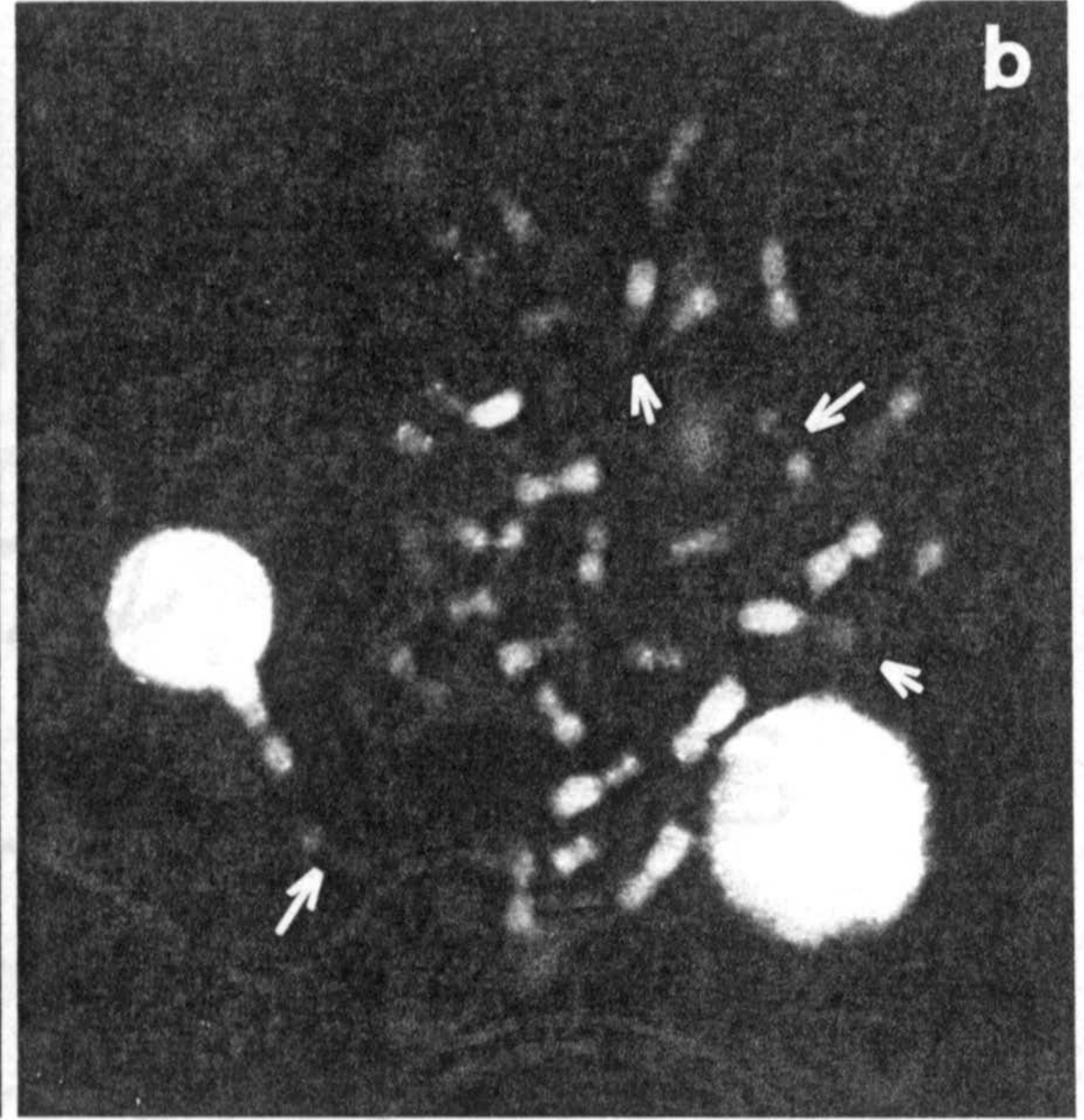
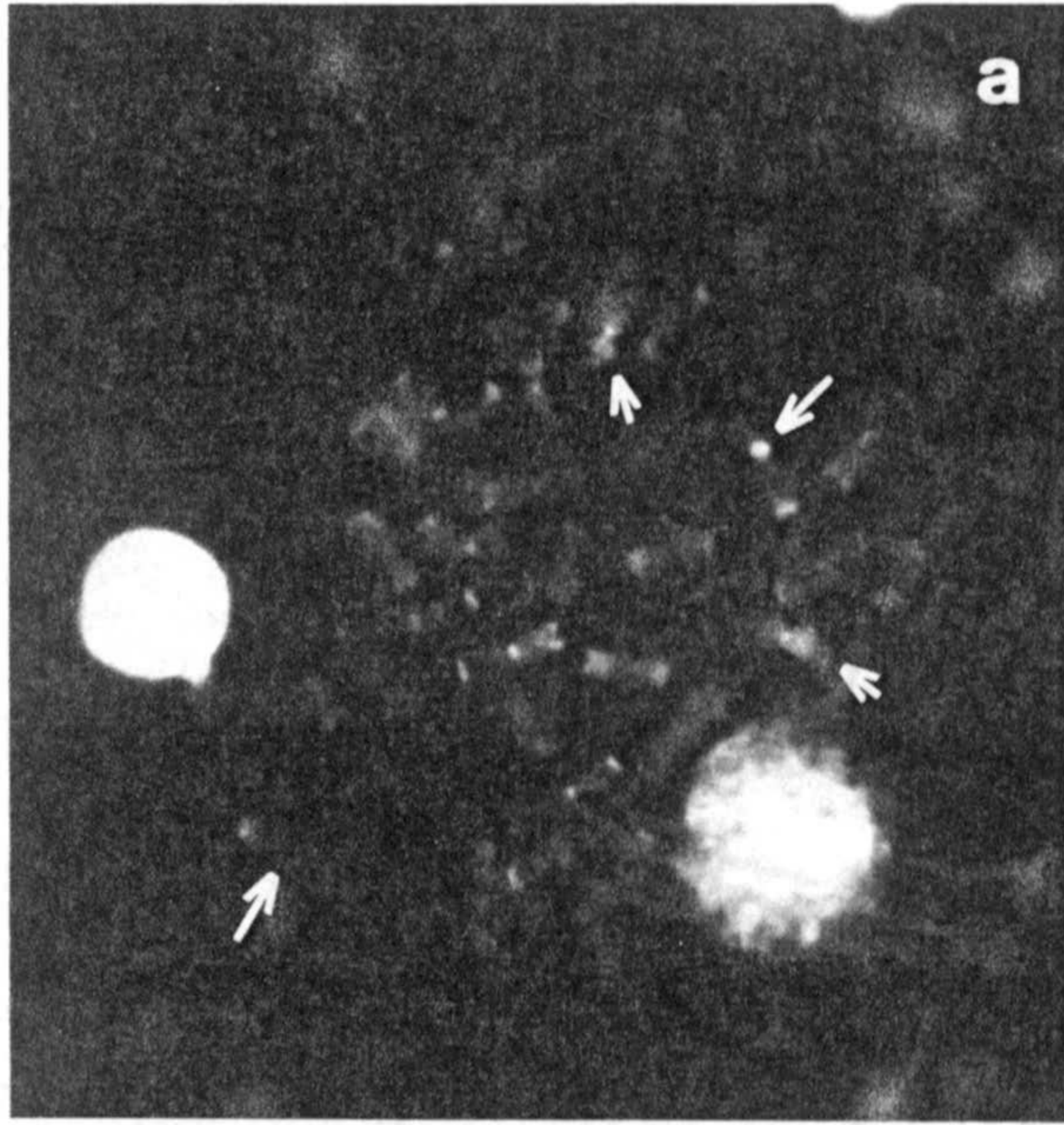
(+): Tinción positiva o presencia de constricción secundaria

(-): Tinción negativa o ausencia de constricción secundaria

Tinciones con fluorocromos

La utilización del fluorocromo cromomicina A₃ (CMA) en combinación con distamicina A (DA) como contratinción, proporciona un patrón de bandas característico en donde aparecen brillantes las regiones centroméricas y teloméricas de la mayoría de los cromosomas del complemento (Figs. 10a y c). Además son CMA positivos los bloques heterocromáticos del par 14 y el brazo corto del par 16, que también es C positivo. El cromosoma Y muestra tinción neutra. Es de destacar el comportamiento que muestra la región NOR del par 3. Cuando se realiza la tinción triple (CMA-DA-DAPI) (Fig 10a) generalmente uno de los cromosomas de dicha pareja resulta claramente positivo, mientras que el otro es neutro. Sin embargo, en la tinción simple de CMA, con contratinción de DA, ambas NORs resultan negativas (Fig. 10c). La figura 10d muestra la tinción convencional con Giemsa de la misma metafase de la figura 10c, en donde podemos ver el estado descondensado de la cromatina NOR en ambos cromosomas de la pareja 3, como se manifiesta por la existencia de las

Fig. 10.- Tinción con fluorocromos. **a-b)** Tinción secuencial CMA-DAPI mediante la utilización de la técnica triple de Schweizer; nótese la intensa tinción positiva con CMA (**a**) en uno de los cromosomas portadores de NOR y su tinción negativa con DAPI (**b**) (flechas largas), así como la banda CMA positiva y DAPI negativa que muestra la región pericentromérica y el brazo corto del par 14 (flechas cortas). **c-d)** Tinción secuencial CMA (simple)-Giemsa; en este caso ambos cromosomas del par 3 son CMA negativos, aunque muestran claramente la constricción secundaria. Barra = 10 μ m.



constricciones secundarias.

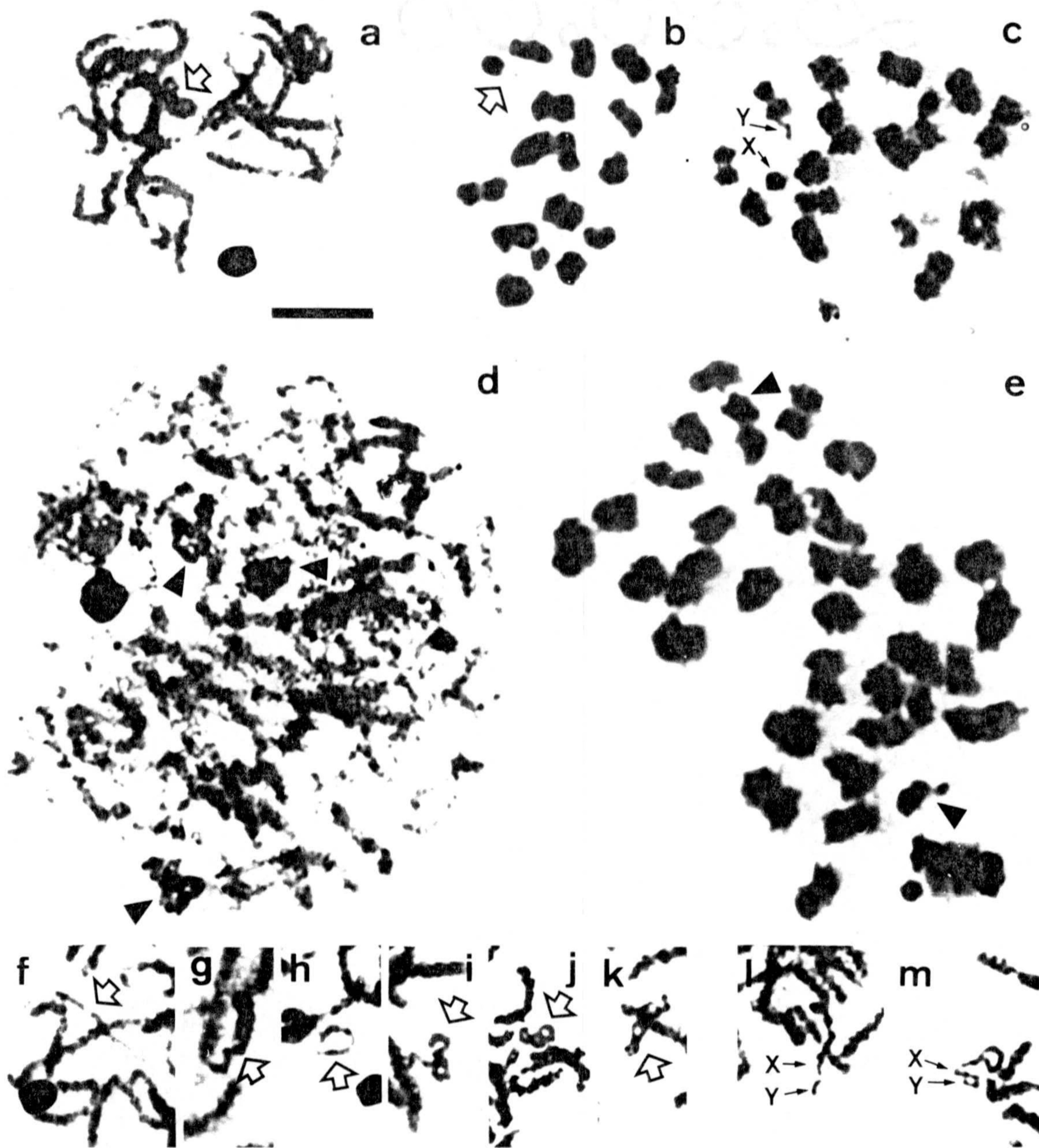
La excitación en la gama de los ultravioleta de preparaciones tratadas con la técnica de triple tinción produce la excitación del DAPI, que proporciona en esta especie un patrón de fluorescencia que, como norma general podemos considerar complementario del que produce la cromomicina A₃ (Fig. 10b). Todas las regiones CMA positivas aparecen claramente negativas ante la tinción con DAPI. Así, las regiones centroméricas y teloméricas, las zonas heterocromáticas de las parejas 14 y 16, las constricciones secundarias portadoras de NOR del par 3, y el cromosoma Y son DAPI negativos en *T. occidentalis*. El resto de las regiones cromosómicas suelen ser neutras o ligeramente positivas, aunque no se puede establecer siempre una clara distinción entre ambas intensidades de tinción.

Meiosis

El análisis de la meiosis se ha llevado a cabo en la gran mayoría de los machos capturados, aunque hemos de indicar que no todos ellos mostraban actividad espermatogénica, habiendo, como veremos más adelante, diversos factores, como la edad o la estación del año en que son capturados, que hacen que tales machos se muestren completamente azoospérmicos y carentes de actividad meiótica.

La espermatogénesis en esta especie muestra, salvo algunas excepciones, abundantes células de la profase meiótica, zigotenes y paquitenes sobre todo (Fig. 11a), siendo muy poco frecuente la observación de fases posteriores como la metafase I, anafase I o metafase II, probablemente debido a que dichos estadios tengan una duración muy corta. Aunque lo más frecuente es que los cromosomas sexuales X e Y

Fig. 11.- Meiosis en *T. occidentalis*. a) Paquitene. b) Metafase I donde X e Y permanecen aún apareados terminalmente. c) Metafase I en que X e Y han segregado prematuramente. d) Paquitene de una célula trinucleada donde las flechas indican las tres vesículas sexuales. e) Metafase I de una célula binucleada donde se pueden observar dos bivalentes sexuales. f-k) Diferentes configuraciones del cromosoma X en paquitene: f) lineal; g) plegado sobre sí mismo; h) anillo simple; i) anillo doble; j y k) anillo múltiple. l y m) relaciones sinápticas entre ambos cromosomas sexuales en paquitene: l) terminal y m) lateral. Barra = 10 μ m.



permanezcan aún unidos en metafase I (Fig. 11b), existen sin embargo algunos casos en que se puede apreciar una segregación precoz de los mismos (Fig. 11c).

En un estudio anterior que llevamos a cabo acerca del proceso meiótico de tres especies de insectívoros entre las que se incluía *T. occidentalis* (Jiménez y col., 1984), describimos la existencia de dos fenómenos dignos de atención. Por un lado, en estas especies se produce en alta frecuencia el fenómeno de polimeiosis, es decir, la meiosis que se lleva a cabo de forma simultánea y sincrónica en todos los núcleos de una célula polinucleada. Cada núcleo realiza la meiosis de forma totalmente independiente del resto, de forma que no aparecen configuraciones multivalentes, sino simplemente un número de bivalentes múltiplo de n . Entre éstas, las más frecuentes son las células con $2n$ y $3n$ bivalentes, aunque también se han podido observar células con 4 ó 5 dotaciones. En este tipo de células se pueden observar tantos bivalentes sexuales como núcleos tenga la célula polinucleada, tanto en paquitene (Fig. 11d) como en metafase I (Fig. 11e). Los resultados indican que durante la meiosis II, cada núcleo en anafase I da lugar a dos núcleos en profase II claramente independientes de las restantes profases II de otros núcleos anafásicos.

La frecuencia de células polinucleadas puede variar ligeramente de unos machos a otros, aunque como media esta frecuencia tiene un valor de 10.9%.

La observación de espermatozoides procedentes de estos machos permite demostrar la falta de gametos anormalmente voluminosos. Del mismo modo, no se han observado macroespermátidas en las preparaciones meióticas, lo que indica que los productos de las células polinucleadas

probablemente son normales.

Por otra parte, el bivalente sexual muestra un comportamiento particular en relación a su picnosis y morfología durante la profase I de la meiosis en comparación con el comportamiento de estos cromosomas en la meiosis de la mayoría de los mamíferos.

Sólo algunas células en cigotene y paquitene mostraban una vesícula sexual típica, tal como ésta ha sido descrita para la mayoría de especies de mamíferos, es decir, un cuerpo claramente heteropicnótico y condensado correspondiente a los cromosomas sexuales (Sachs, 1954; Solari, 1964, 1974) (Fig. 11a). En la mayoría de las células correspondientes a estas etapas el bivalente sexual aparece desplegado y heteropicnótico positivo o isopicnótico, pero siempre claramente diferenciable de los bivalentes autosómicos por su contorno nítido (Fig. 11f-m). Esta morfología permite visualizar la posición relativa que presentan los cromosomas sexuales entre sí, así como la de ambos brazos del cromosoma X. En este sentido hemos llevado a cabo un estudio cuantitativo de las distintas configuraciones, que se esquematiza en la tabla III.

Por lo que respecta a la morfología del cromosoma X, las configuraciones lineales y en anillo simple son las más frecuentes, representando el 81% del total, mientras que los de doble anillo y anillo múltiple son mucho menos frecuentes, sobre todo éstas últimas (Figs. 11f-k). En cuanto al tipo de asociación entre el cromosoma X y el Y, la mayoría de las células muestran asociación terminal, siendo mucho menos frecuentes las laterales (Figs. 11l-m).

TABLA III.- Frecuencia de los distintos tipos de configuraciones del cromosoma X durante la profase meiótica y de los tipos de asociación X-Y.

Configuración cromosoma X	n° de células	%
Lineal	90	45%
Anillo simple	72	36%
Anillo doble	36	18%
Anillo múltiple	2	1%
Tipo de asociación X-Y		
terminal	164	82%
lateral	36	18%

La observación de configuraciones en anillo, junto con la distribución simétrica de las bandas G en el cromosoma X nos indujo a pensar en la posibilidad de la existencia de secuencias de homología situadas en ambos brazos de dicho elemento, lo que le conferiría, al menos parcialmente, un carácter de isocromosoma.

Con objeto de profundizar en este tema y detectar una posible relación de estos hechos con las anomalías en la diferenciación sexual pusimos a punto las técnicas para la observación de los complejos sinaptonémicos al microscopio electrónico.

Estudio ultramicroscópico de los complejos sinaptonémicos

Las características generales de los espermatoцитos de *T. occidentalis* preparados por microextensión son similares en muchos aspectos a los descritos por diversos autores en otras especies de mamíferos (por ejemplo ver Dresser y Moses, 1980; Greenbaum y col., 1986). Estructuras tales como los complejos sinaptonémicos, los ejes X e Y, y los nucleolos, se tiñen de forma preferencial por la plata, lo que posibilita su observación tanto al microscopio óptico como al electrónico. Sin embargo, otras estructuras, como los elementos centrales de los complejos sinaptonémicos no se tiñen con plata, aunque sí lo hacen las regiones centroméricas y teloméricas de los mismos, correspondientes éstas últimas a las placas de fijación.

En esta especie, los elementos axiales de cada cromosoma parecen formarse al principio de la cigotene y no durante leptotene como se ha descrito en otras especies como *Peromyscus maniculatus* o *Peromyscus sitkensis* (Greenbaum y col., 1986). Como norma utilizada en otros estudios anteriores, los cambios en la morfología de los complejos sinaptonémicos autosómicos, de los ejes del X y del Y, y del nucleolo, han constituido los criterios sobre los que basar la subdivisión secuencial de las etapas de la profase meiótica en que estas estructuras están presentes, es decir, cigotene y paquitene.

Contrariamente a lo observado por otros investigadores en otras especies, en *T. occidentalis* no se observan estructuras estables correspondientes a cuerpos asociados al bivalente sexual, tales como el "cuerpo XAB" de Quack y Noel (1977) y Fletcher (1979), o el "cuerpo doble denso" de Dresser y Moses (1980) y Takanari y col. (1982). En este aspecto nuestros datos coinciden con los descritos por

Greenbaum y col. (1986).

Aparte de estas observaciones generales, nuestros análisis ponen de manifiesto algunos detalles en la sinapsis en *T. occidentalis* que parecen ser algo diferentes de los descritos en otros mamíferos en los que se han realizado detallados estudios ultraestructurales.

Todas estas características están elaboradas en la siguiente descripción del proceso sináptico en donde, además del análisis morfológico del bivalente sexual, y con objeto de conseguir información sobre el aspecto funcional del mecanismo de sinapsis entre los cromosomas X e Y, y del X consigo mismo, se ha llevado a cabo una subdivisión de las etapas de la profase meiótica que nos proporcione la secuencia cronológica de todo este proceso sináptico.

Subdivisión de las etapas de la profase meiótica

-Cigotene

Como correspondientes a esta fase, se han observado células en donde los elementos axiales de los autosomas aparecen muy largos, delgados, y de tenue tinción, características más acentuadas cuanto más temprana sea la etapa (Figs. 12a y c). Son frecuentes las interrupciones y faltas de continuidad en los ejes, lo que a veces dificulta el seguimiento en toda su longitud.

Como característica común, estas células presentan siempre una sinapsis incompleta entre los ejes de todos o algunos de los bivalentes autosómicos. Los ejes de los cromosomas sexuales son siempre fácilmente diferenciables de los

autosómicos por su tinción más intensa y mayor grosor, incluso en los estadios más tempranos.

Mientras que para las especies analizadas se han descrito tres subetapas dentro de cigotene, llamadas Z_1 , Z_2 , y Z_3 , en *T. occidentalis* solamente se han distinguido dos, correspondientes a las Z_2 y Z_3 , no habiéndose observado ninguna célula que cumpliera las características descritas para la subetapa Z_1 , es decir, ejes autosómicos bien constituidos, aunque sin haber comenzado aún el proceso de sinapsis, y ejes sexuales separados e indistinguibles de los autosómicos.

Por ello, y con objeto de facilitar la posterior discusión, las dos subetapas que vamos a describir para *T. occidentalis* serán llamadas Z_2 y Z_3 , para guardar una correspondencia correcta con las ya descritas anteriormente en la bibliografía.

Z_2

No se han encontrado células en cigotene en las cuales el proceso de sinapsis no estuviese ya bastante avanzado, de modo que los estadios más tempranos observados correspondían a células en donde la mayor parte de los complejos sinaptonémicos ya estaban formados (Fig. 12a). En Z_2 , mientras algunos ejes autosómicos muestran finalizado el proceso de sinapsis (poco frecuentes), otros mantienen amplias regiones donde aún no se ha completado ésta.

La longitud de los ejes autosómicos es en Z_2 la máxima observada en toda profase meiótica.

Los ejes sexuales aparecen relativamente delgados, ambos

desplegados, y la sinapsis está ya iniciada (Fig. 12b). No se han observado células en donde los ejes X e Y estuvieran separados. La sinapsis X-Y se extiende generalmente desde un extremo telomérico del Y hacia su región centromérica, sin que ésta se encuentre sinapsada en la mayoría de los casos.

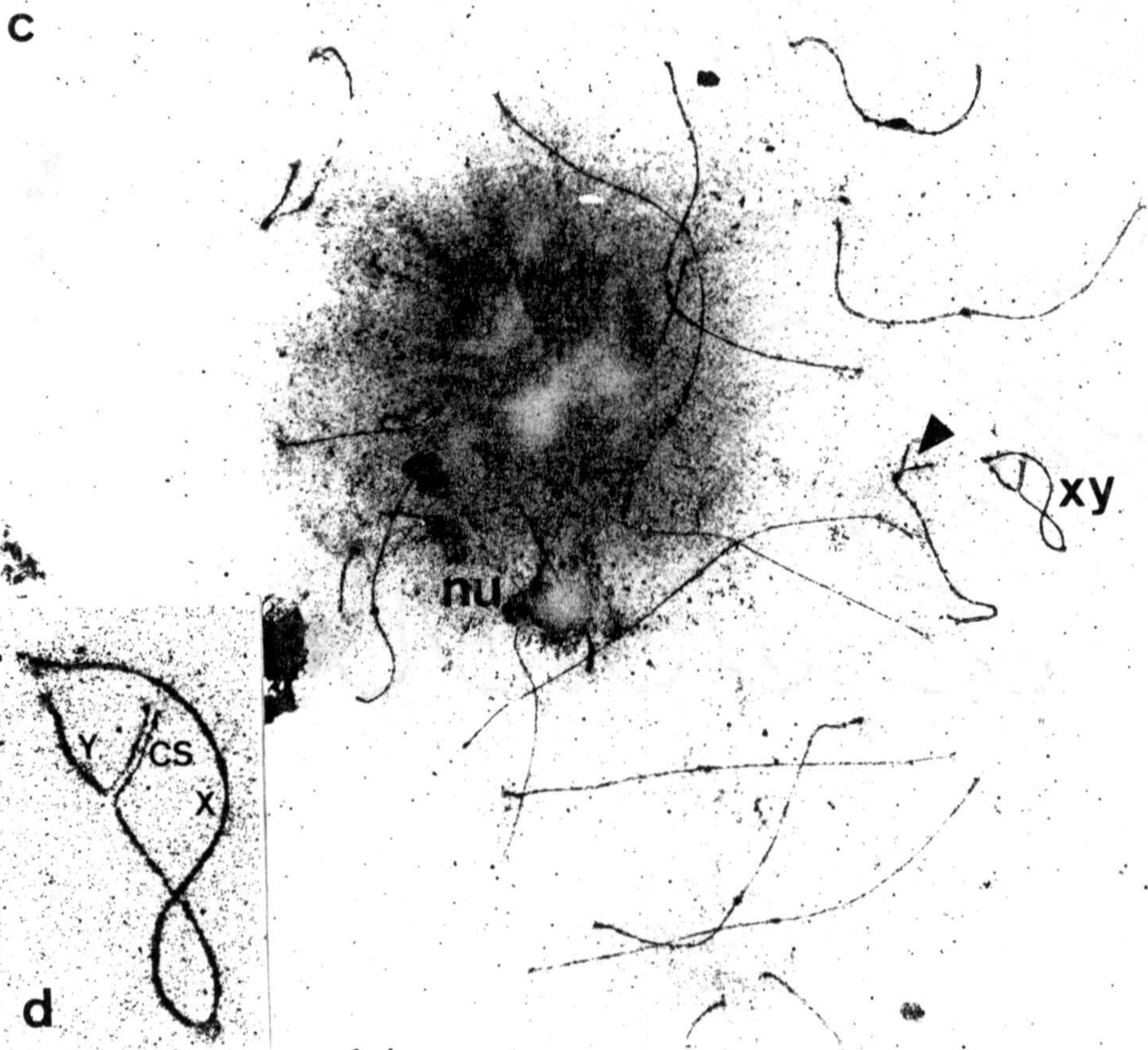
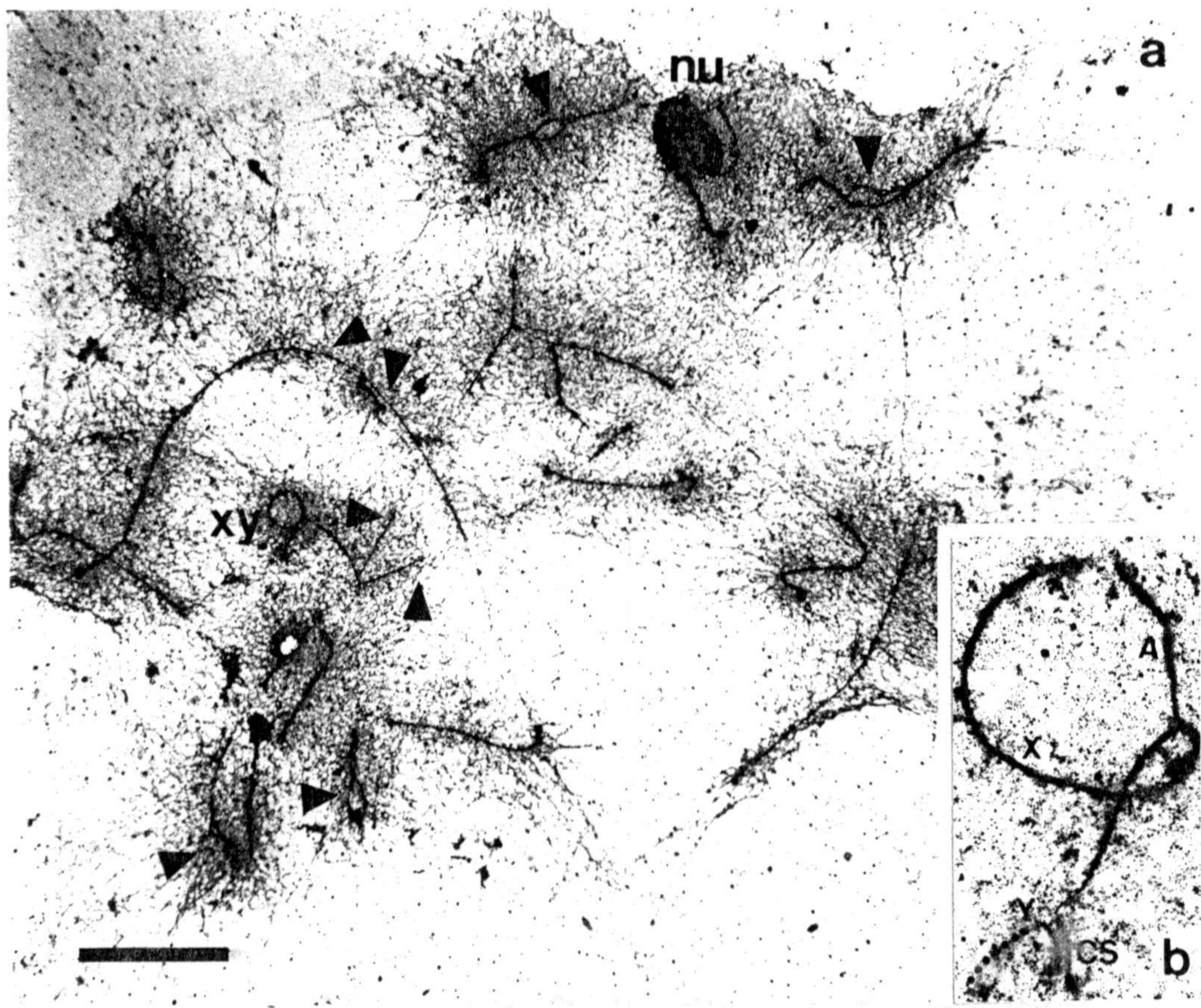
En los primeros estadios de la profase meiótica sólo aparece un único nucleolo. Desde Z_2 hasta paquitene tardía, el nucleolo sufre un proceso de atenuación ligera y de fragmentación que, aunque en muchos casos se producen de forma sincrónica al avance de la profase, sin embargo, no manifiestan una constancia en su paralelismo con las distintas subetapas. Así, en Z_2 se observa generalmente un nucleolo muy denso e invariablemente asociado con el complejo sinaptonémico del par 3, en posición intersticial, y coincidiendo con la localización de los NORs observados en preparaciones mitóticas.

La masa nucleoplasmática y cromatínica de la célula aparece frecuentemente teñida de un fino precipitado de plata, lo que contrasta con el escaso grado de condensación de la cromatina en esta fase, pero sin embargo, concuerda con el aspecto que estas fases muestran en las preparaciones meióticas convencionales, en donde el citoplasma celular también aparece más teñido que en etapas posteriores.

Z_3

Como continuación de la subetapa anterior, Z_3 se caracteriza por una sinapsis más avanzada. En algunas células parece casi completamente terminada, a excepción de algunas regiones (Fig. 12c). Como en las especies anteriormente citadas, en *T. occidentalis* las regiones centroméricas son las últimas en completar la sinapsis. Esto permite la

Fig. 12.- Complejos sinaptonémicos en cigotene. **a)** Cigotene temprana (Z_2). Nótese la existencia de amplias regiones asinápticas (puntas de flecha) y el compacto nucleolo (nu). **b)** Detalle del bivalente sexual de esta célula que muestra el X desplegado y el Y formando ya una pequeña región de complejo sinaptonémico (cs); el segmento asináptico del eje del Y no se ha teñido y ha sido representado por una fila de puntos; (A) indica la presencia de un segmento de un eje autosómico adyacente. **c)** Cigotene tardía (Z_3). Sólo pequeñas regiones permanecen aún en estado asináptico en los ejes autosómicos, como el pequeño brazo heterocromático del par 16 (punta de flecha); el nucleolo (nu) aparece algo fragmentado; (n) indica un núcleo interfásico de otra célula superpuesto en la extensión. **d)** detalle del bivalente sexual de esta célula mostrando un complejo sinaptonémico (cs) más extenso y el segmento diferencial del X aún desplegado. Barra = 10 μ m en a; 7.5 μ m en c; 1.5 μ m en b y 2.2 μ en d.



observación de frecuentes aberturas intersticiales (recordemos que todos los cromosomas de esta especie poseen centrómeros intersticiales) en los ejes autosómicos en proceso de sinapsis.

En esta subetapa todos los ejes pueden ser ya fácilmente seguidos y contados, apareciendo algo más cortos que en Z_2 .

Los ejes sexuales prosiguen su proceso de sinapsis pero, aunque la región centromérica del Y ya se ha sinapsado, la unión completa del mismo aún no se ha llevado a cabo. Por su parte, el eje diferencial del cromosoma X, como ocurre en Z_2 , puede haber comenzado ya un proceso de autoapareamiento (ver el capítulo sobre el comportamiento del bivalente sexual), aunque a menudo se observa aún desplegado (Fig. 12d)

En esta subetapa el nucleolo puede mostrar igual aspecto que en Z_2 , o bien mostrar prolongaciones en forma de cometa ("comet shaped"), menos densamente teñidas, que parten de él.

-Paquitene

Como norma generalizada, se consideran incluidos dentro de paquitene aquellas células en donde la sinapsis se ha completado en todos los ejes autosómicos. En comparación con los estudios anteriormente citados, llevados a cabo en otras especies, en *T. occidentalis* la paquitene puede ser subdividida en cinco subetapas, con objeto de guardar un paralelismo con éstas.

P_1 y P_2 (paquitenes tempranas)

La primera subetapa de la Paquitene en *T. occidentalis* es muy similar a Z_3 en muchos aspectos, excepto en el grado de sinapsis, que en P_1 es ya total (Fig. 13a). Los complejos sinaptonémicos autosómicos pueden ser seguidos y contados fácilmente en esta subetapa, aunque su longitud aún es considerable y muestran escaso enrollamiento ("twisting").

Con respecto a los ejes sexuales, el complejo sinaptonémico XY está ya generalmente completado, mostrando su máxima extensión de sinapsis (Fig. 13b). La morfología de estos ejes sexuales, así como la calidad de tinción de los ejes autosómicos, son los parámetros que permiten diferenciar claramente las subetapas de P_1 y P_2 , que, con respecto a otros aspectos, son muy parecidos.

Al igual que en otras especies, en *T. occidentalis* P_2 también representa un paso intermedio entre P_1 y P_3 (Fig. 13c). Los ejes autosómicos prosiguen su proceso de acortamiento en longitud y de aumento de enrollamiento.

Los ejes sexuales han comenzado generalmente en esta fase a mostrar un proceso de aumento en su complejidad, que normalmente afecta antes al segmento diferencial del X, mientras que el complejo sinaptonémico XY todavía mantiene una morfología similar a la de los c.s. autosómicos (Fig. 13d).

P_3 (midpaquitene)

Es una subetapa bien definida por el máximo acortamiento y enrollamiento de los complejos autosómicos (Fig. 13e). Los de mayor longitud han llegado a mostrar más de 20 giros en

algunas células, mientras que los más cortos pueden mostrar hasta 8.

En midpaquitene los ejes sexuales presentan un mayor grado de complejidad que en anteriores subetapas. Tanto el complejo sinaptonémico XY como el segmento diferencial del X muestran ya un considerable engrosamiento con aparición de excrecencias laterales, que en conjunto le confieren un aspecto altamente heteropicnótico (Fig. 13f). El bivalente XY puede tener estructura lineal o anillada con mayor o menor grado de complejidad en P_3 . El autoapareamiento del segmento diferencial del cromosoma X se encuentra ya totalmente completado.

P_3 se caracteriza también por ser la fase en que el conjunto nucleoplasma-cromatina aparece menos enrarecido por precipitado de plata y los complejos sinaptonémicos autosómicos se encuentran menos enmarañados.

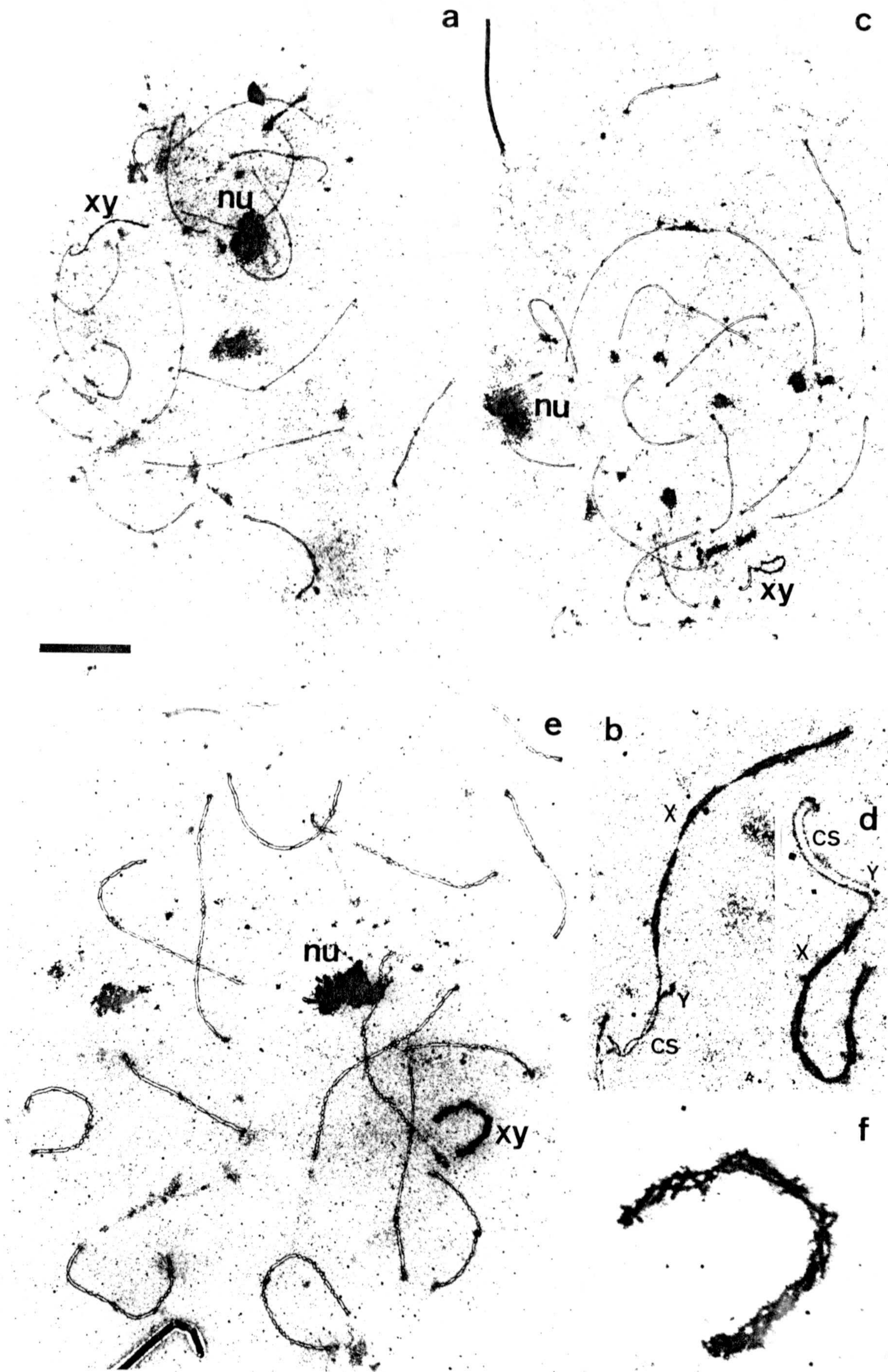
P_4 y P_5 (paquitenes tardías)

P_4 se caracteriza por la progresiva atenuación en la tinción de los ejes autosómicos y una elongación secundaria de los mismos (Fig. 14a). El enrollamiento es menos acusado aquí que en P_3 . Con respecto al bivalente sexual, prosigue el aumento de complejidad de los ejes del X y del Y, siendo frecuente la observación de anastomosis internas en configuraciones normalmente anulares (Fig. 14b).

Probablemente se trate de una subetapa de corta duración pues la frecuencia de este tipo de células es realmente baja.

P_5 representa la subetapa en donde las características de P_4

Fig. 13.- Complejos sinaptonémicos en paquitene. **a)** Paquitene temprana (P_1). Todos los complejos autosómicos han completado ya su proceso sináptico y aparecen aún largos y delgados; el nucleolo (nu) muestra estructura granular periférica y se observan ya algunas fracciones del mismo, fruto de su fragmentación. **b)** Detalle del bivalente sexual que muestra una pequeña porción del Y aún no sinapsada y el segmento diferencial del X todavía desplegado. **c)** P_2 . Los complejos sinaptonémicos autosómicos están más cortos y más enrollados y el nucleolo (nu) prosigue la fragmentación. **d)** Detalle del bivalente sexual de este núcleo que muestra la sinapsis completa del Y con el X (cs) incluida la región centromérica de aquél; el segmento diferencial del X presenta un aspecto similar al anterior. **e)** Midpaquitene (P_3). Todos los complejos autosómicos presentan su máximo grado de acortamiento y enrollamiento; el nucleolo (nu) muestra un grado de fragmentación similar al de P_2 ; la tinción del conjunto nucleoplasma-cromatina es mínima. **f)** Detalle del bivalente sexual de la célula anterior que muestra ya un alto grado de complejidad, mayor compactación y algunas excrecencias laterales. Barra = 10 μm en a; 7.5 μm en c; 6 μm en e; 2.2 μm en b; 1.6 μm en f y 1.3 μm en d.



se expresan en su mayor grado (Fig. 14c). La elongación secundaria es máxima y el twisting está muy reducido. Son muy frecuentes las regiones de interrupción en la continuidad de los complejos autosómicos, lo que indica la posible desorganización de los complejos al final de la paquitene. El fondo de la célula suele aparecer muy teñido.

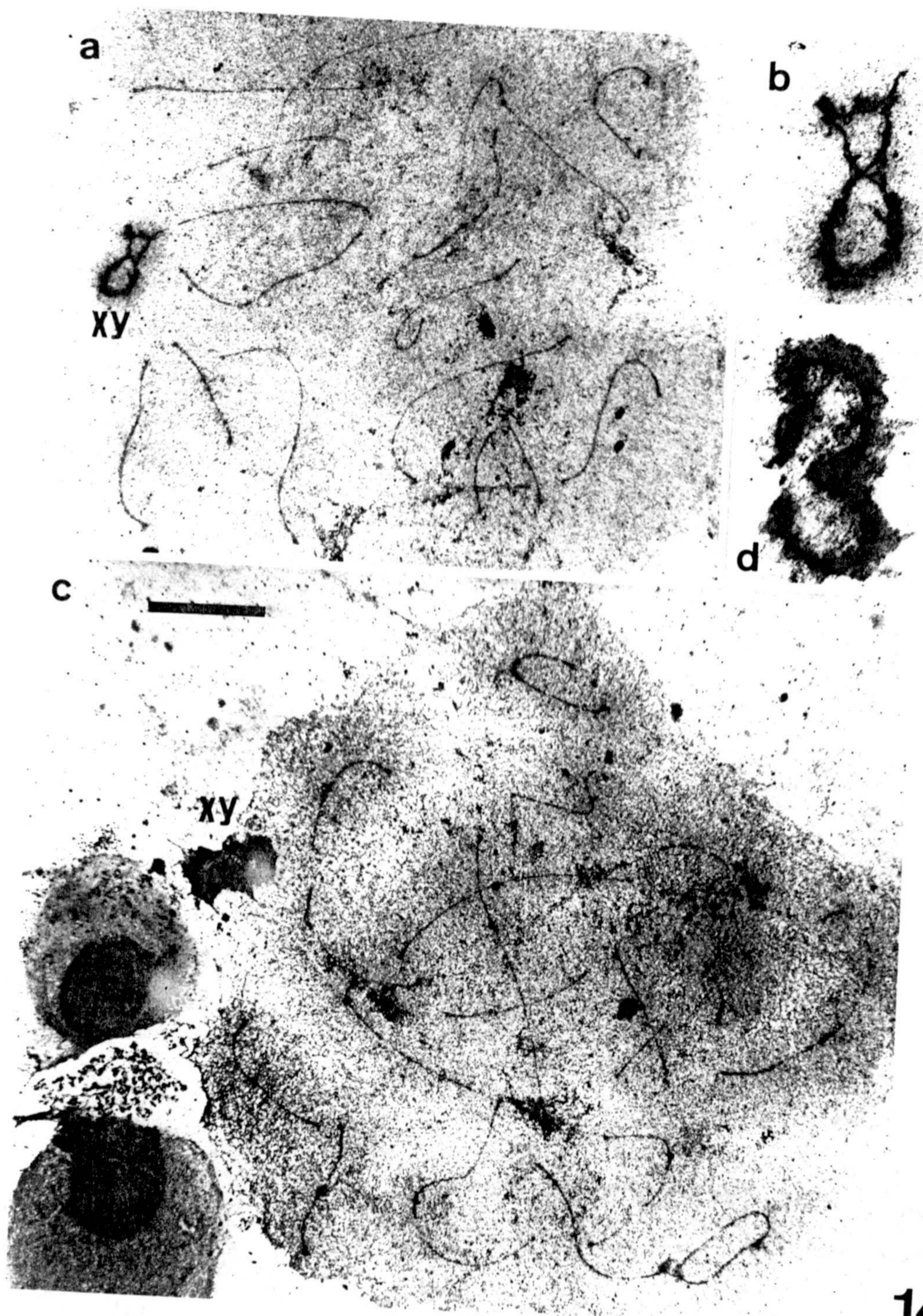
Por lo que respecta al par sexual, las características son muy similares a las de P_4 , con la diferencia de que en P_5 los ejes sexuales se encuentran envueltos en una densa matriz cromatínica que sugiere la aparición de una vesícula sexual (Fig. 14d).

Aunque no tanto como las subetapas anteriores, ésta debe ser relativamente rápida, dada su baja frecuencia.

En algunos casos, las células en P_5 adquieren proporciones mucho más grandes que las de células pertenecientes a etapas anteriores. En estos casos existe una gran separación entre los diferentes complejos autosómicos, los cuales se encuentran individualmente envueltos en una densa masa de cromatina. Este tipo de células se parece en ciertos aspectos a las células Z_2 y Z_3 , tanto en la longitud de los ejes, como en la tinción de la cromatina o en la superficie que ocupan. Sin embargo, otras características, como son a) ausencia de zonas asinápticas, b) presencia de "gaps" o interrupciones en la continuidad de los complejos sinaptonémicos, no observados en cigotene en tan alto grado, c) la estructura dispersa del nucleolo, y sobre todo d) la configuración y morfología del bivalente sexual, permiten diferenciar claramente ambas subetapas.

Muchas de estas diferencias sólo son apreciables a nivel de microscopía electrónica y no al microscopio óptico.

Fig. 14.- Complejos sinaptonémicos en paquitene. **a)** P_4 . Los complejos autosómicos han comenzado su elongación secundaria, aparecen menos intensamente teñidos y con algunas zonas de discontinuidad. **b)** Detalle del bivalente sexual en P_4 , que muestra una gran complejidad con abundantes excrecencias y anastomosis internas. **c)** Paquitene tardía (P_5). Los complejos autosómicos están más largos y con amplias y abundantes zonas de discontinuidad; el conjunto nucleoplasma-cromatina está muy teñido por un fino precipitado de plata; el nucleolo está muy fragmentado y apenas se puede distinguir su fragmento principal. **d)** Detalle del bivalente XY de esta célula, que se encuentra envuelto ya en una densa vesícula sexual y muestra su máximo grado de complejidad. Barra = 10 μ m en a y c y 4 μ m en b y d.



Con respecto a la evolución del nucleolo en paquitene, éste aparece generalmente menos denso que en cigotene y de estructura granular periférica, y en el que se pueden diferenciar las dos mitades correspondientes a cada una de las NORs. Desde P_1 hasta P_5 se produce una dispersión y fragmentación, cuyo grado de intensidad no coincide siempre en células pertenecientes a la misma subetapa. Así, algunas células en P_2 pueden mostrar mayor grado de dispersión que otras pertenecientes a P_4 o P_5 .

Este proceso de fragmentación del nucleolo puede producirse en multitud de pequeños fragmentos, como ocurre en la célula de la figura 13c, o en dos o más trozos grandes, como se muestra en la figura 13a. En cualquier caso, el fragmento mayor permanece generalmente asociado al complejo del par 3.

Evolución del bivalente sexual

En *T. occidentalis* los ejes X e Y aparecen siempre unidos, aún en las etapas más tempranas de la cigotene, no habiéndose presentado ninguna célula en que éstos no hubiesen comenzado ya su proceso de sinapsis, igual que ocurre con los bivalentes autosómicos.

Sin embargo, es posible observar diferentes estadios dentro de esta sinapsis X-Y (Figs. 15a-i). Esta se inicia por la región telomérica de ambos cromosomas y se va completando, a modo de cremallera, conforme avanza la cigotene. En Z_2 , la región centromérica del cromosoma Y aun no se ha sinapsado, mientras que en Z_3 , puede o no haberlo hecho. Finalmente, aunque no siempre en coincidencia con la terminación de la cigotene, la sinapsis X-Y se completa, implicando a toda la longitud del eje del cromosoma Y. El aspecto del complejo sinaptonémico X-Y es normal en toda su longitud, apareciendo con igual separación y calidad de tinción que los bivalentes

autosómicos.

El segmento diferencial del X aparece inicialmente con morfología lineal, más o menos plegada, en donde se observa claramente la posición del centrómero en la mayoría de las células. Posteriormente, dicho segmento diferencial del X comienza un proceso de autoapareamiento, que se inicia entre la región telomérica libre del mismo y la zona del otro brazo que se encuentra inmediatamente después del segmento apareante con el Y. El proceso de autosinapsis se va extendiendo hacia el interior del bucle así formado y, como consecuencia, se va cerrando paulatinamente. Por lo general, la sinapsis X-Y comienza antes que el autoapareamiento del segmento diferencial del X, aunque a veces, esto no es así, tal como muestra la figura 15j. En este caso podemos ver como el X se encuentra autoapareado en toda la longitud de su segmento diferencial mientras que el apareamiento con el Y apenas ha comenzado en posición terminal. Como regla general, en midpaquitene (P_3) el proceso de autosinapsis se ha completado.

En la mayoría de los casos, la autosinapsis del X va acompañada de una disminución progresiva en la distancia que separa ambos "elementos laterales" del bucle, así como de un engrosamiento de los mismos, fenómenos que generalmente se producen antes de que el autoapareamiento concluya.

Este fenómeno afecta también al complejo sinaptonémico X-Y, en donde hay una disminución de la separación entre los elementos laterales y un engrosamiento de los mismos. Este fenómeno nunca es observado en los ejes laterales de los autosomas.

Como consecuencia de todo este proceso, se obtiene una figura lineal, tal como se esquematiza en la figura 15l,

generalmente alcanzada en P_3 .

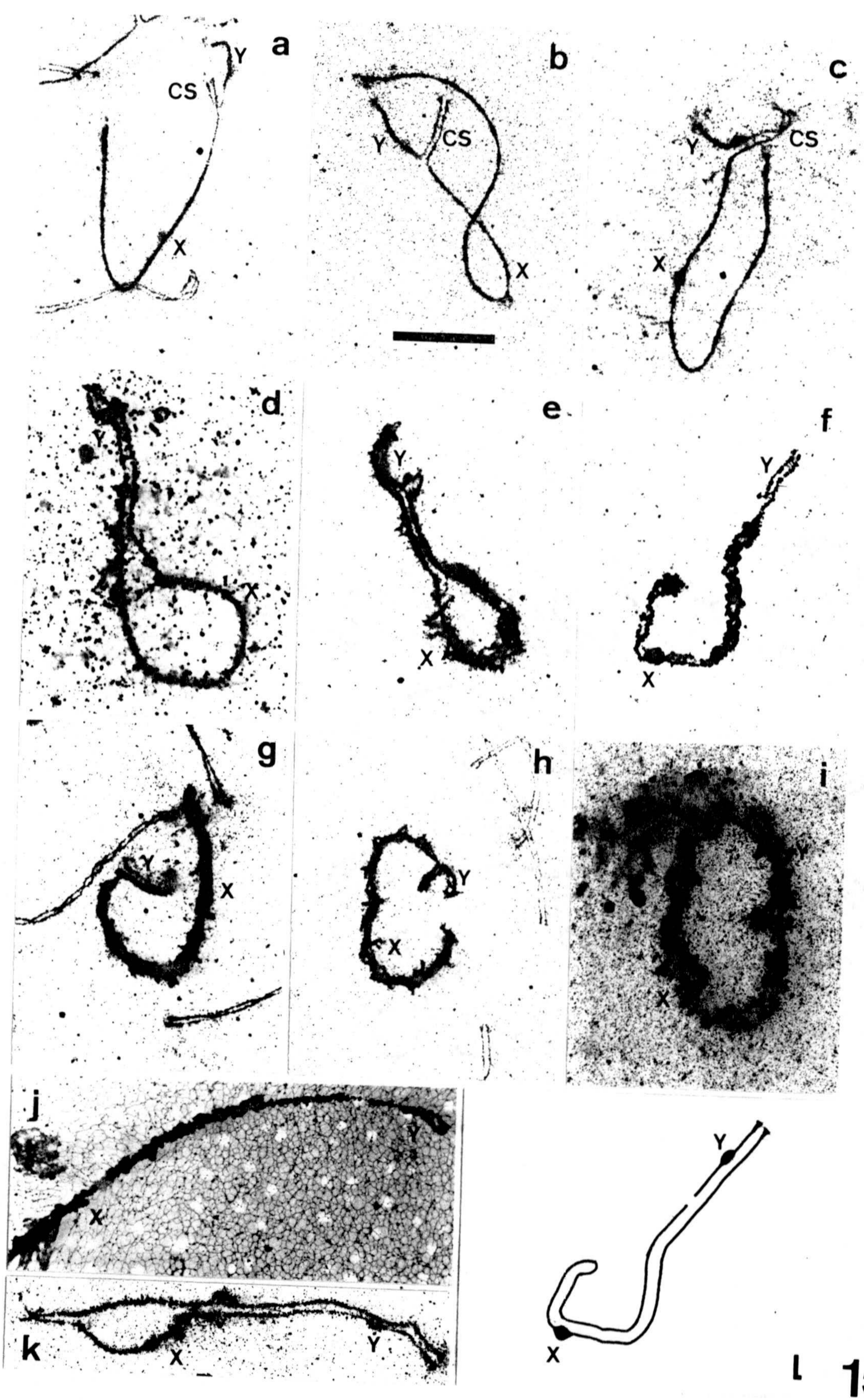
En estas etapas la longitud total del bivalente sexual es aproximadamente la mitad de la longitud de los autosomas de mayor tamaño. Si tenemos en cuenta que el cromosoma X mitótico es de un tamaño similar al de los pares 1-4 del complemento, es decir, uno de los más grandes del mismo, esta disminución de su longitud a la mitad puede, lógicamente, ser atribuida a su autoapareamiento.

Aunque ciertamente, la región de autoapareamiento del cromosoma X aparece frecuentemente con una morfología algo diferente de la de los complejos sinaptonémicos autosómicos o del formado entre X e Y (elementos laterales engrosados y distancia de separación disminuida), algunos casos, como el de la figura 15k demuestran, sin embargo, que tal morfología se alcanza una vez constituido un complejo sinaptonémico de apariencia normal, donde tanto el grosor como la separación son normales. podría interpretarse pues, que se forma un complejo sinaptonémico típico que, sin embargo, rápidamente degenera a la forma antes descrita. A este respecto, hay que tener en cuenta que el complejo sinaptonémico X-Y sufre un proceso de degeneración muy similar.

En P_3 es frecuente observar como el bivalente sexual adopta configuraciones anilladas, simples o múltiples, paralelamente a la aparición de excrecencias laterales, similares a las observadas en estas etapas en los ejes X e Y de otras especies de mamíferos, tales como el hombre (Solari, 1980) o el hamster chino (Desser y Moses, 1980).

Este aumento progresivo de la complejidad del bivalente sexual, alcanza un grado máximo durante la paquitene tardía (P_4 y P_5), en donde, además comienza a aparecer una densa vesícula sexual que engloba a los ejes X-Y.

Fig. 15.- Evolución del proceso sináptico X-Y y del autoapareamiento del segmento diferencial del X. **a)** Z_2 . Inicio de la sinapsis X-Y. **b)** Z_3 . Prosigue la sinapsis X-Y. **c)** P_1 . La región centromérica del Y está ya apareada y el segmento diferencial del X comienza su aproximación para la autosinapsis. **d-f)** Diferentes configuraciones en P_2 : **d)** el Y está totalmente sinapsado y el segmento diferencial del X ha comenzado el autoapareamiento; **e)** el grado de autoapareamiento es mayor, con la aparición de excrecencias en la región del X no autoapareada; **f)** Autoapareamiento total del X. **g-i)** Diferentes configuraciones en P_3 : **g)** estructura lineal muy heteropiconótica; **h)** estructura lineal con abundantes excrecencias; **i)** Estructura anillada. **j)** Un caso en que, habiendo fallado la sinapsis X-Y se ha llevado a cabo, sin embargo, el autoapareamiento del X. **k)** Un caso de autoapareamiento en P_2 en el que se puede observar el aspecto totalmente normal del complejo sinaptonémico formado entre ambos brazos del cromosoma X. **l)** Representación esquemática del resultado de los procesos de sinapsis X-Y y autosinapsis del X una vez completados éstos. Barra = $2.2 \mu\text{m}$.



Durante P₄ y sobre todo en P₅, el bivalente sexual se observa como un cuerpo compacto y fibroso en donde son frecuentes las anastomosis internas y las excrecencias laterales (figs. 14b y d).

Igual que ocurre con los complejos autosómicos, los elementos del bivalente sexual comienzan a desorganizarse paulatinamente al final de P₅ acabando por desaparecer.

ESTUDIOS ANATOMICOS Y DE FERTILIDAD

Machos normales (34,XY)

Por lo que respecta a su morfología externa, todos los individuos con cariotipo 34,XY presentaban un indiscutible fenotipo masculino. Su peso corporal era generalmente superior al de las hembras y la separación ano-genital claramente pronunciada en todos los casos. Internamente los machos XY fértiles mostraban una anatomía normal, con dos testículos bien desarrollados acompañados de epidídimos (fig 16a).

La característica más llamativa en la anatomía de los machos XY es la gran variabilidad que presentan en cuanto al desarrollo testicular. El peso de ambos testículos variaba desde 20 hasta 939 mg., lo que también se acompañaba de una significativa variabilidad en el diámetro de los túbulos seminíferos (ver más adelante el estudio histológico de las gónadas).

Dado que los machos portadores de la mutación "Sxr", causante de reversión sexual (machos XX) en el ratón de laboratorio presentaban como característica más peculiar el

Fig. 16.- Anatomía interna de los diferentes tipos de individuos analizados. **a)** Macho normal XY que muestra testículos (T) bien desarrollados y acompañados de epidídimos envueltos en tejido adiposo. **b)** Macho XX con reversión sexual, mostrando dos testículos (T) de muy reducido tamaño y epidídimos poco desarrollados. **c)** Hembra XX donde se observa un útero bien desarrollado (U) que al final de sus dos ramas presenta ovarios (OV) de aspecto normal. **d)** Intersexo XX mostrando un útero aparentemente normal (U) en cuyo extremo aparecen dos ovotestes (OT) de gran tamaño.



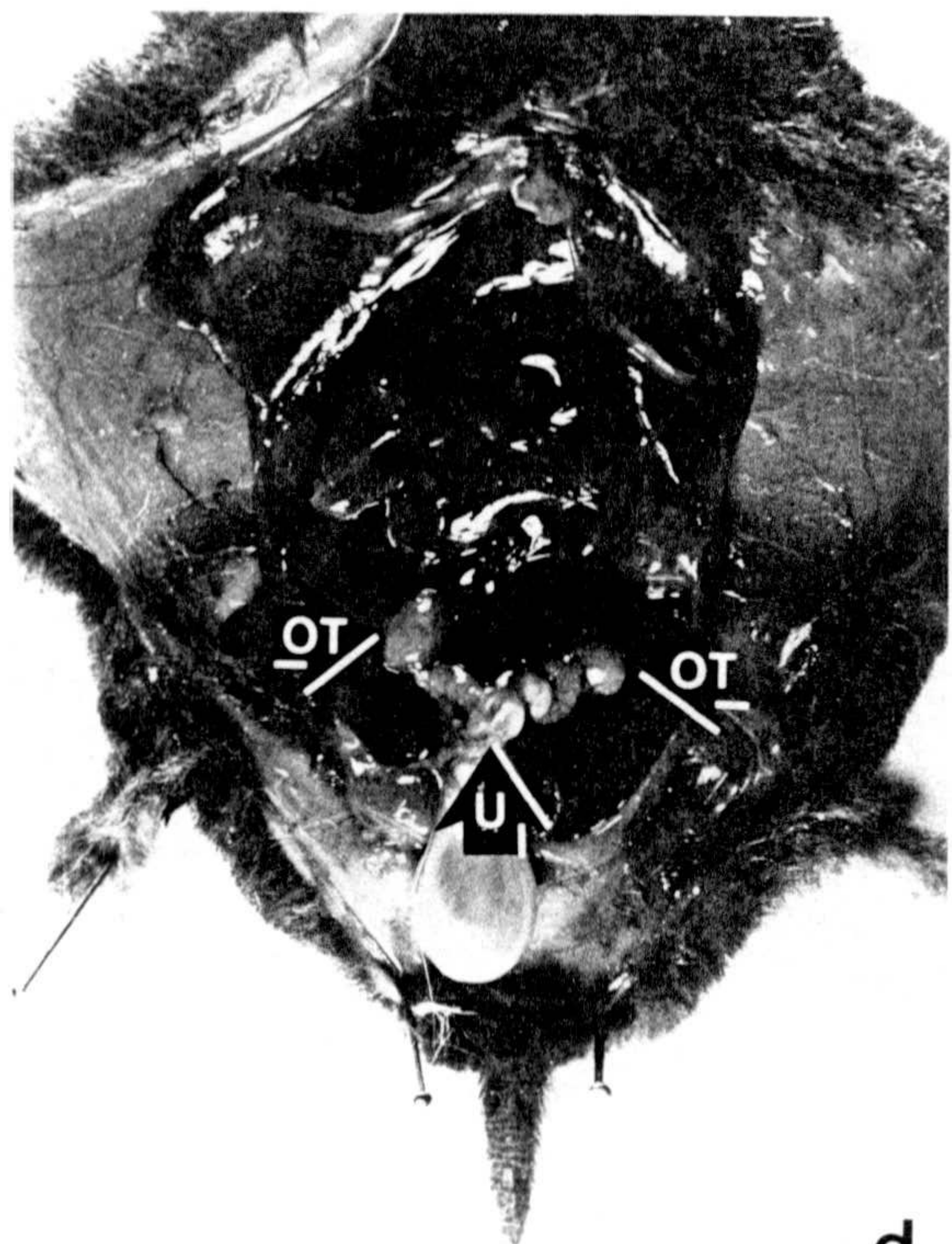
a



b



c



d

poseer testículos de peso claramente inferior al de los machos normales no portadores, nos decidimos a llevar a cabo un estudio profundo de todos los machos de *T. occidentalis* capturados, con objeto de poder demostrar si también en esta especie existen machos portadores de similares características. Se trataba pues de demostrar si existían dos tipos de machos, que se diferenciaban en el peso testicular, en los cuales estas diferencias fuesen independientes de factores tales como la edad o la estación del año en que habían sido capturados.

Para ello fué necesario caracterizar cada individuo mediante diversos parámetros, tales como su edad relativa, el peso testicular, diámetro de los túbulos seminíferos, peso corporal, grado de fertilidad y fecha de captura. Todos estos datos están recogidos en la tabla IV, y los métodos de medición de cada uno de los parámetros fueron explicados en el capítulo correspondiente.

Una vez recopilados todos estos datos y en una primera aproximación al problema, era posible comprobar que el peso testicular es un parámetro variable, que depende no sólo de la edad del animal, sino también de la estación del año. Así, durante el invierno y la primavera, es factible establecer una relación entre peso testicular y edad, de manera que todos los machos que presentaban los pesos testiculares más bajos (20-25 mg.) correspondían precisamente a aquellos que tenían un índice de edad más pequeño (0.7-0.8), algunos de los cuales eran claramente inmaduros por su aspecto juvenil y su escaso peso corporal. Por otra parte, estos individuos eran siempre estériles por carecer de actividad espermatogénica, tal como se deduce de la ausencia tanto de células meióticas en preparaciones de testículo, así como de espermatozoides en sus epidídimos.

TABLA IV.- Valores de los parámetros utilizados para la estimación de la actividad sexual en los machos.

INDIVIDUO	PESO CORPORAL (g)	PESO (*) TESTICULAR (mg)	Ø (b) TUBULOS SEMINIFEROS (µm)	PRODUCCION (c) ESPERMATOZOIDES	PESO TESTICULAR PESO CORPORAL (mg/g)	EDAD (d)	MES DE CAPTURA
T-9	59	25	--(a)	-	0.4237	++	MY
T-10	60	30	--(a)	-	0.4983	++	MY
T-13	70	350	160	++	5.0000	++	EN
T-14	74	371	162	++	5.0135	+++	EN
T-15	73	320	157	++	4.3836	++	EN
T-17	60	20	53	-	0.3333	+	FE
T-19	64	361	146	++	5.6406	++	AB
T-20	75	333	160	++	4.4400	++	AB
T-22	56	36	57	-	0.6316	+	AB
T-25	74	370	156	++	4.9731	++	AB
T-26	65	22	55	-	0.3385	+	MY
T-28	67	180	140	+	2.6866	++	MY
T-29	69	106	102	-	1.5429	++	MY
T-30	63	192	112	-	3.0476	++	MY
T-31	60	116	108	+	1.9333	++	MY
T-32	70	160	115	-	2.2857	+++	JL
T-36	62	141	100	-	2.2742	+	JL
T-38	53	55	75	-	1.0378	++	JL
T-40	75	315	150	-	4.2000	++	AG
T-41	78	939	267	++	12.1100	++	SE
T-42	57	478	231	++	8.3800	++	SE
T-44	60	163	123	+	2.7170	++	AB
T-45	66	162	93	-	2.4700	++	AB
T-47	64	97	110	-	1.5160	++	MY
T-48	64	272	138	-	4.2500	+	MY
T-50	66	392	165	++	5.9400	++	MY
T-51	62	81	59	-	1.3000	+	MY
T-52	71	193	157	-	2.7200	++	MY
T-53	69	166	125	-	2.4000	+	MY
T-55	59	192	137	-	3.2540	+++	MY
T-57	61	371	157	-	6.0820	++	MY
T-59	75	105	102	-	1.4000	+	JN
T-60	56	161	110	-	2.8750	+++	JN
T-61	67	97	73	-	1.4480	++	JN
T-62	56	102	76	-	1.8550	++	JN
T-65	44	33	70	-	0.7570	+	JN
T-66	66	83	77	-	1.3030	++	JN
T-67	69	806	258	++	11.6980	++	SE
T-68	67	604	243	++	9.0700	++	SE
T-70	64	597	232	++	9.3720	+	SE
T-71	69	600	240	++	8.6960	+++	SE
T-72	65	304	148	+	4.6480	++	SE
T-74	56	587	240	++	10.4820	++	OC
T-75	67	682	251	++	10.1790	++	OC
T-76	63	546	228	++	8.6670	++	NO

TABLA IV (continuación).-

INDIVIDUO	PESO CORPORAL (g)	PESO (a) TESTICULAR (mg)	Ø (b) TUBULOS SEMINIFEROS (µm)	PRODUCCION (c) ESPERMATOZOIDES	PESO TESTICULAR PESO CORPORAL (mg/g)	EDAD (d)	MES DE CAPTURA
T-77	72	838	269	++	11.6390	++	NO
T-79	65	520	220	++	8.0620	++	NO
T-80	67	760	250	++	11.3070	++	NO
T-81	65	578	239	++	8.8380	+++	NO
T-82	59	854	270	++	14.4750	++	DI
T-85	63	782	253	++	12.4130	++	DI
T-86	55	554	229	++	10.0000	++	DI
T-89	61	118	79	+	1.9540	+++	EN
T-90	73	752	251	++	10.3720	++	EN
T-92	60	580	230	++	9.6030	++	FE
T-94	51	400	170	++	7.7970	+++	MA
T-95	85	118	81	-	1.3880	+	MA
T-97	63	240	130	+	3.8090	+++	AB
T-98	55	21	48	-	0.3790	+	AB
T-100	58	500	218	++	8.6210	++	AB
T-101	42	23	48	-	0.5540	+	AB
T-105	53	315	156	++	5.9430	+++	AB
T-110	51	90	71	+	1.7650	+++	MY
T-111	59	156	82	-	2.6670	+	MY
T-113	57	304	157	+	5.3333	+++	MY
T-116	58	160	90	+	2.7590	+++	MY
T-118	45	69	56	-	1.5510	+	MY
T-119	63	180	89	+	2.8570	+++	MY
T-121	53	160	87	+	3.0190	++	MY
T-122	56	113	80	+	2.0180	+++	MY
T-123	58	241	139	+	4.1550	++	JN
T-124	46	127	81	+	2.7610	+++	JN
T-126	49	42	53	-	0.8660	+	JN
T-127	51	85	69	-	1.6666	+	JL
T-129	58	210	115	+	3.6520	++	JL
T-130	46	410	171	++	8.9130	++	SE
T-131	52	133	75	+	2.5830	++	SE
T-133	59	936	241	++	15.8640	+++	OC

(a): Peso conjunto de ambos testículos

(b): Valor medio de la medida de 10 túbulos seminíferos

(c): ++ = Zoospermia normal; + = Oligozoospermia; - = Azoospermia

(d): +++ = edad avanzada; ++ = edad media; + = edad juvenil

(e): No presentan túbulos seminíferos sino cordones sexuales macizos

Coexistiendo en el tiempo con estos ejemplares, había otros de mayor tamaño corporal por lo general que, además, presentaban un peso testicular notablemente mayor y una activa producción espermatigénica, observable tanto a nivel citogenético como en el recuento de espermatozoides. El índice de edad en estos casos era siempre mayor de 0.8.

Es evidente pues, que las diferencias en el peso y desarrollo testiculares eran claramente atribuibles a diferencias de edad entre unos y otros individuos y que realmente estábamos comparando los individuos inmaduros (subadultos) con los maduros sexualmente (adultos).

En el resto del año, la situación es mucho más variable, de modo que en verano, todos los machos XY presentaban pesos testiculares muy bajos independientemente de la edad de los individuos. Por otra parte, durante el otoño y principios del invierno, todos los machos analizados presentaban un peso testicular elevado y un índice de edad superior a 0.8, o dicho en otras palabras, eran todos adultos y sexualmente maduros.

Representando estos datos (tabla V) gráficamente (fig. 17), podemos ver como los individuos adultos tienen el máximo peso testicular durante el otoño y principios del invierno, para ir bajando paulatinamente durante la primavera hasta llegar al verano en que se alcanza el mínimo y los individuos pasan a ser oligozoospermicos primero y totalmente azoospermicos después (esterilidad temporal). Finalmente, al principio del otoño, comienza una fuerte y rápida ascensión, de modo que en septiembre se alcanza de nuevo el desarrollo testicular máximo.

Por su parte, los individuos subadultos aparecen por primera vez en el mes de febrero y presentan pesos testiculares muy

Fig. 17.- Variación estacional del peso testicular (PT) en los machos XY de *T. occidentalis*. : machos jóvenes azoospérmicos; : machos jóvenes fértiles; : machos adultos inactivos; : machos adultos oligozoospérmicos; : machos adultos fértiles. Los primeros machos jóvenes, probablemente nacidos en invierno, aparecen en el mes de febrero y continúan azoospérmicos (estériles) hasta el mes de agosto, en que aumenta rápidamente el peso testicular y alcanzan la madurez sexual en septiembre, mes trás el cual dejan de ser capturados como jóvenes. Por su parte, los machos adultos adquieren durante el otoño-invierno los máximos valores en el peso testicular y la actividad espermatogénica, para comenzar en enero-febrero a disminuir éstos, hasta que en verano los individuos llegan a ser azoospérmicos y por lo tanto temporalmente estériles.



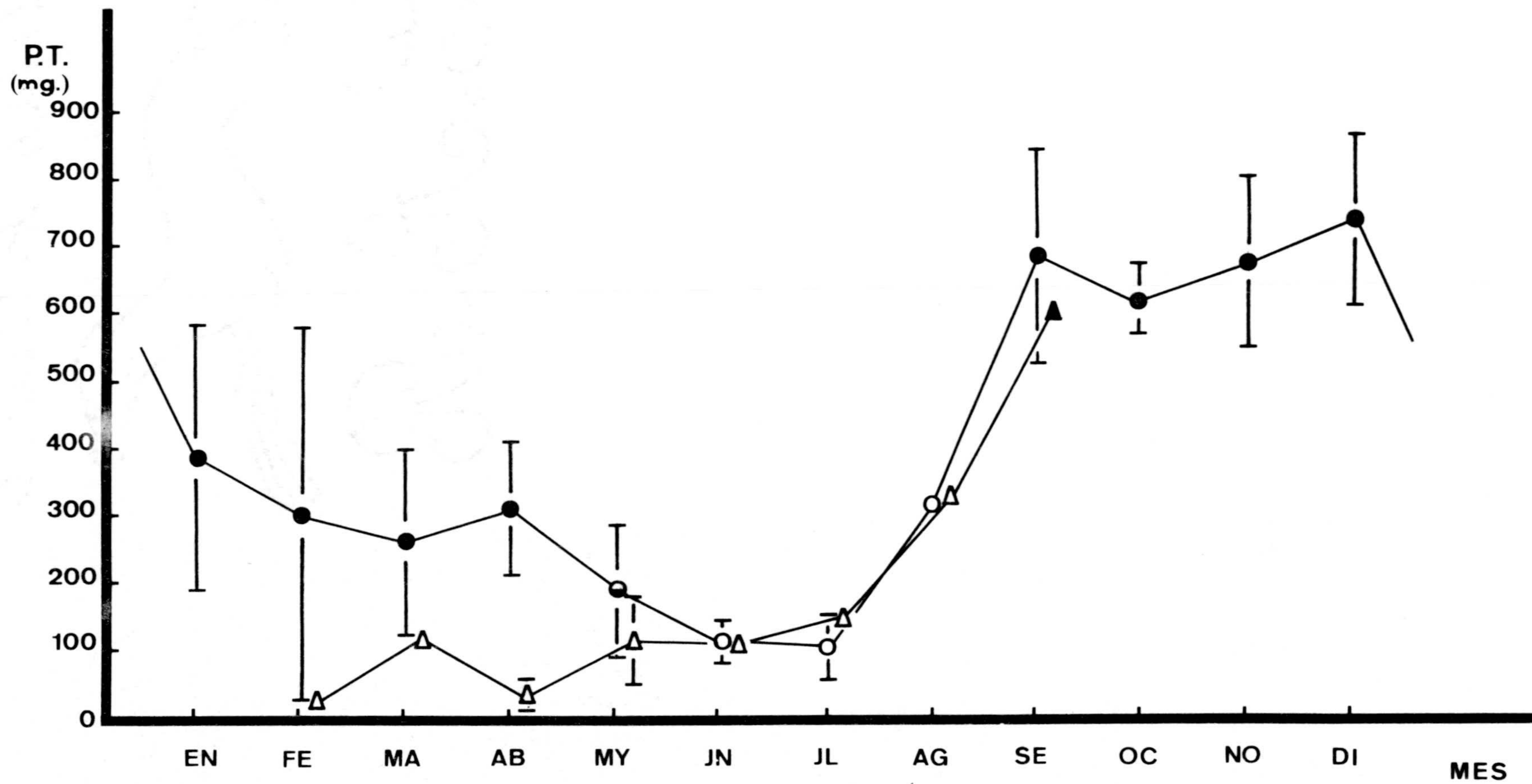


TABLA V.- Valores correspondientes a los puntos representados en la gráfica de la Fig. 17 (peso testicular vs. mes de captura).

MES DE CAPTURA	ADULTOS			JOVENES		
	n	X PT	σ_n	n	X PT	σ_n
EN	5	382	205	-	-	-
FE	2	300	280	1	20	-
MA	2	259	141	1	118	-
AB	8	305	106.7	3	26.6	6.6
MY	13	197.9	95.3	6	119.3	79.7
JN	4	110.7	29.8	6	119.3	79.7
JL	2	107.5	52.5	1	141	-
AG	1	315	-	-	-	-
SP	5	685.4	164.7	1	597	-
OC	3	605	56.9	-	-	-
NO	4	674	129.6	-	-	-
DI	3	730	127.8	-	-	-

n = nº de individuos analizados en el mes.

X PT = Valor medio del peso testicular expresado en mg.

σ_n = Desviación típica.

bajos hasta finales del verano, en que comienzan un rápido crecimiento testicular que sigue paralelo al definido por los adultos. A partir del mes de septiembre ya no se han capturado individuos que, según su índice de edad, puedan ser catalogados como jóvenes.

Por otra parte y con objeto de comprobar si el peso corporal sufre algún tipo de cambio cíclico similar al descrito para el peso testicular, confeccionamos una gráfica (tabla VI, fig. 18) en donde se representaron en líneas separadas los pesos corporales de todos los machos respecto la fecha de captura. Como podemos ver, las variaciones entre unos meses y otros no son significativas, ya sea para los individuos adultos o para los subadultos, apareciendo una curva de trayectoria plana con leves variaciones entre los meses consecutivos, para cada uno de ambos tipos de animales.

Consecuentemente, la gráfica correspondiente a los valores del índice "peso testicular / peso corporal" (tabla VII, fig. 19), que nos daría una idea más correcta del grado de desarrollo testicular de cada individuo por ser independiente de las variaciones interindividuales en el tamaño corporal, ofrece una curva muy similar a la ya descrita antes para el peso testicular.

Fig. 18.- Variación estacional del peso corporal (PC) en machos XY de *T. occidentalis*. La simbología es la misma empleada en la figura 17. Se observa una trayectoria plana, aunque con ligeras variaciones, a lo largo de todo el año, tanto para individuos jóvenes como para los individuos adultos.



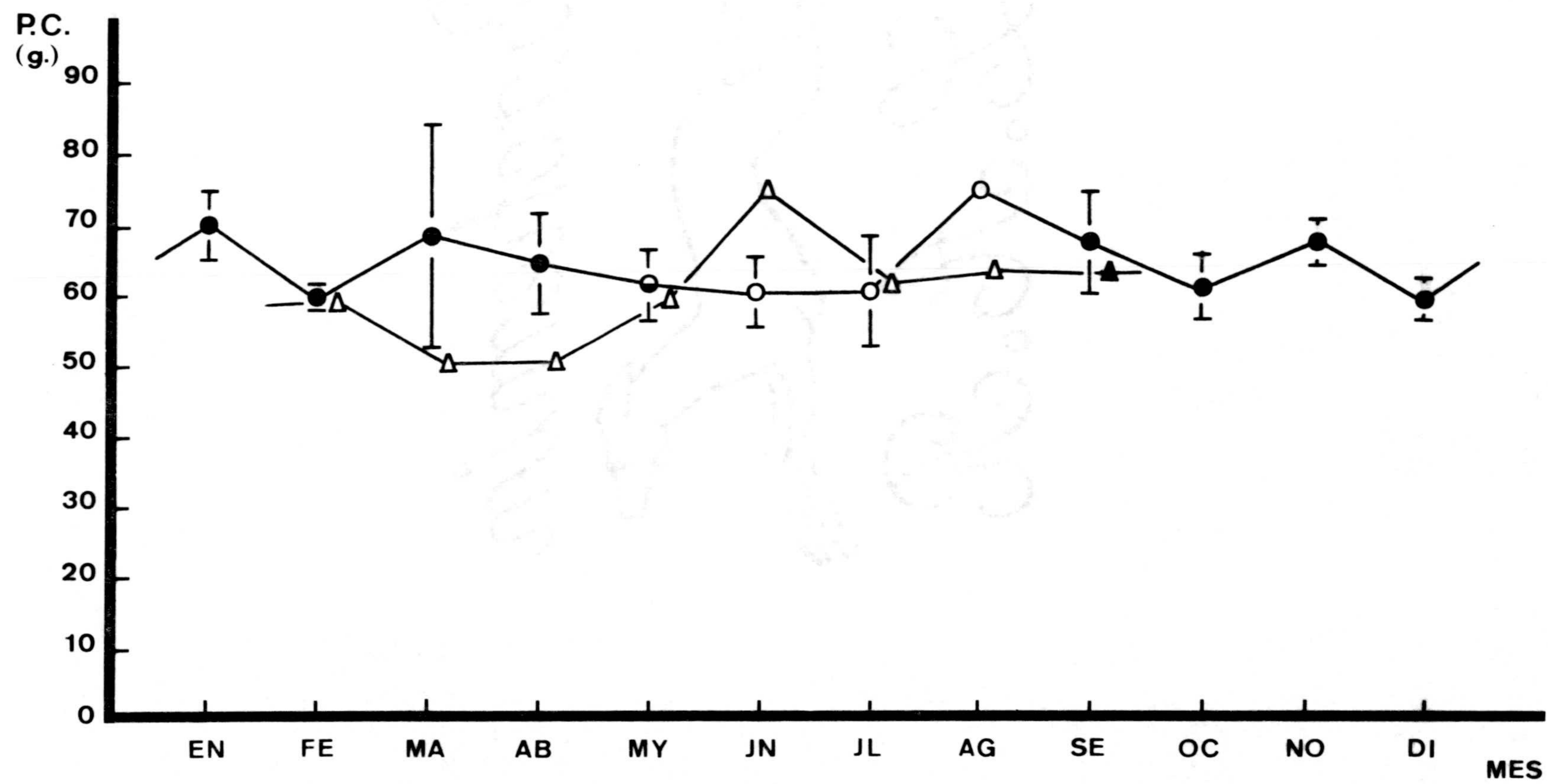


TABLA VI.- Valores correspondientes a los puntos representados en la gráfica de la Fig. 18 (peso corporal vs. mes de captura).

MES DE CAPIURA	ADULTOS			JOVENES		
	n	X PC	σ_n	n	X PC	σ_n
EN	5	70	5.5	-	-	-
FE	2	60.2	0.2	1	60	-
MA	2	68.2	16.8	1	51.3	-
AB	8	64.1	7.1	3	51.5	6.8
MY	14	62.4	5.0	6	60.5	7.8
JN	4	61.1	5.3	1	75	-
JL	2	61.5	8.5	1	62	-
AG	1	75	-	-	-	-
SP	4	67.5	7.3	1	63.6	-
OC	3	62	4.5	-	-	-
NO	4	67.3	2.9	-	-	-
DI	3	59.1	3.1	-	-	-

n = nº de individuos analizados en el mes.

X PC = valor medio del peso corporal, expresado en g.

σ_n = desviación típica.

Fig. 19.- Variaciones estacionales del cociente peso testicular/peso corporal (PI/PC) en los machos XY de *T. occidentalis*. Simbología como en figura 17. Dada la independencia del peso corporal respecto a la fecha de captura, las curvas obtenidas en esta gráfica coinciden plenamente con las de la figura 17.

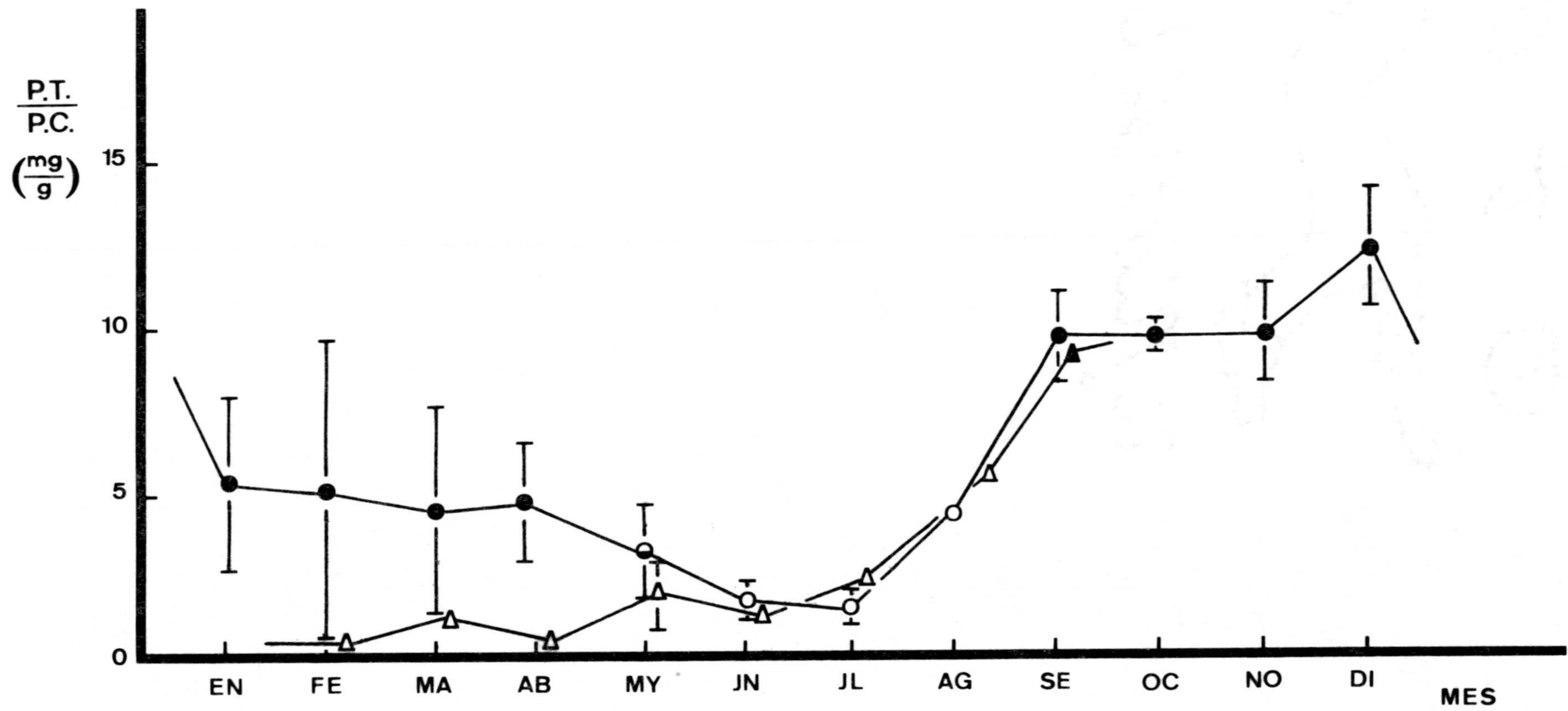


TABLA VII.- Valores correspondientes a los puntos representados en la gráfica de la Fig. 19 (peso testicular / peso corporal vs. mes de captura).

MES DE CAPTURA	ADULTOS			JOVENES		
	n	X PT/PC	σ_n	n	X PT/PC	σ_n
EN	5	5.345	2.754	-	-	-
FE	2	4.903	4.635	1	0.333	-
MA	2	4.593	3.205	1	1.388	-
AB	8	4.826	1.855	3	0.522	0.505
MY	13	3.174	1.534	6	2.085	1.229
JN	4	1.870	0.614	1	1.14	-
JL	2	1.662	0.624	1	2.274	-
AG	1	4.2	-	-	-	-
SP	5	9.991	1.583	1	9.372	-
OC	3	9.776	0.794	-	-	-
NO	4	9.962	1.541	-	-	-
DI	3	12.296	1.828	-	-	-

n = nº de individuos analizados en el mes.

X PT/PC = valor medio del peso testicular / peso corporal, expresado en mg/g.

σ_n = desviación típica.

Machos de sexo revertido (34, XX)

Estos ejemplares mostraban un aspecto externo similar al de los machos XY normales. Internamente, y a excepción hecha de su constitución cariotípica, eran indistinguibles de un macho subadulto, donde las únicas características destacables eran la presencia de testículos diminutos de color blanquecino (los machos XY poseen testículos de color marrón-verdoso) y de epidídimos de carácter translúcido (blancos en los adultos), también de reducido tamaño. En estos individuos, el peso testicular oscilaba, como en los subadultos, alrededor de los 20-25 mg. (fig. 16b).

Las preparaciones meióticas denotaban una total ausencia de actividad espermatogénica, faltando cualquier tipo de células meióticas. Como consecuencia, eran también carentes de espermatozoides en los epidídimos. Se trata por tanto de individuos estériles.

Hembras (34, XX)

El fenotipo hembra de *T. occidentalis* se caracteriza por un peso corporal generalmente inferior al de los machos adultos, escasa separación entre los orificios anal y uretral, presencia de un claro canal vaginal y, finalmente, presencia de mamas inguinales y abdominales.

Internamente se observa una vagina, bien desarrollada en individuos adultos, en cuyo extremo se aloja un útero bicorneo, que termina finalmente en dos ovarios de pequeño tamaño (2-2.5 mm. \varnothing), que frecuentemente se encuentran englobados en una extensa masa de tejido adiposo. Las trompas son muy delgadas y cortas (2-3 mm. de longitud) (fig. 16c). Mediante disección a la lupa de los ovarios, se

pueden observar grandes folículos secundarios, en cuyo interior se alojan los oocitos. Adosados a la superficie interna de la piel del abdomen se encuentran las glándulas mamarias que, en individuos gestantes y lactantes, muestran una evidente producción de leche.

En las hembras, igual que ocurre con los intersexos que trataremos a continuación, se aprecia una amplia variabilidad en el tamaño del útero. Su peso puede variar desde 10 mg. hasta más de 500 mg., aproximadamente. En el primer caso, el desarrollo es mínimo, su aspecto es translúcido-blanquecino y la irrigación es muy escasa. Por el contrario, los úteros bien desarrollados presentan un color rosado-rojizo con abundante vascularización.

Intersexos (34, XX)

Su fenotipo externo es indiferenciable del de las hembras, mostrando todas las características de éstas. Internamente, todos los órganos que constituyen el aparato reproductor son semejantes a los de hembra, excepto la presencia de ovotestes situados en los extremos de ambas ramas uterinas (fig. 16d). Estos ovotestes son generalmente ovoideos y de color blanquecino, rosado o marrón.

La característica más llamativa del conjunto de estos individuos es la gran variabilidad que muestran en cuanto al desarrollo tanto del útero como de los ovotestes. El peso del útero puede oscilar desde 4 hasta 560 mg. y sus características son las mismas descritas anteriormente al hablar de las hembras.

Ante la sospecha de que tal variabilidad obedezca a la posible existencia de cambios fisiológicos cíclicos, tal

como ocurre con el peso testicular de los machos, hemos llevado a cabo un estudio similar al realizado en éstos, cuyos resultados se observan en la gráfica de la figura 20 (tabla VIII). Representando el peso del útero frente a la fecha de captura de forma separada para individuos de corta y avanzada edad, podemos ver cómo en estos últimos, el peso del útero es máximo durante los meses de diciembre y enero y mínimo durante la época de primavera-verano. Por su parte, los individuos jóvenes, capturados solamente en los meses de abril y mayo, muestran los pesos uterinos más bajos encontrados, por lo que su escaso desarrollo puede ser atribuido indudablemente a su corta edad. Es obvio por lo tanto, que existe una clara correspondencia entre los periodos de actividad espermatogénica y desarrollo testicular en los machos y el desarrollo uterino en hembras e intersexos.

De todos estos datos se deduce que, con toda probabilidad, la reproducción de esta especie se lleva a cabo durante el invierno, lo que viene corroborado por el hecho de que solamente se han capturado hembras gestantes o lactantes durante estos meses.

Como indicábamos anteriormente, también se ha observado una amplia variabilidad en el tamaño y peso de los ovotestes (3-46 mg.). Sin embargo, cuando intentamos establecer en este caso una posible correspondencia entre el peso del ovoteste y la fecha de captura, la gráfica correspondiente (fig. 21, tabla IX) nos dió como resultado una nube de puntos de no se ajusta a ninguna curva definida. Individuos capturados en el mismo mes del año presentaban ovotestes de pesos casi extremos. Es evidente por tanto, que el desarrollo del ovoteste no está sujeto a variaciones estacionales de una forma significativa.

Fig. 20.- Variaciones estacionales en el peso del útero (PU) en los intersexos XX de *T. occidentalis*. Simbología como en la figura 17. La línea discontinua representa la trayectoria estimada en meses en donde no se han realizado capturas de animales de este sexo. Se observa un peso máximo durante los meses invernales y mínimo durante la primavera y verano en los individuos adultos, y un peso uterino muy bajo para los jóvenes, capturados sólo en los meses de abril y mayo.

Patchman
L. H. P.
L. H. P.

P.U.
(mg)

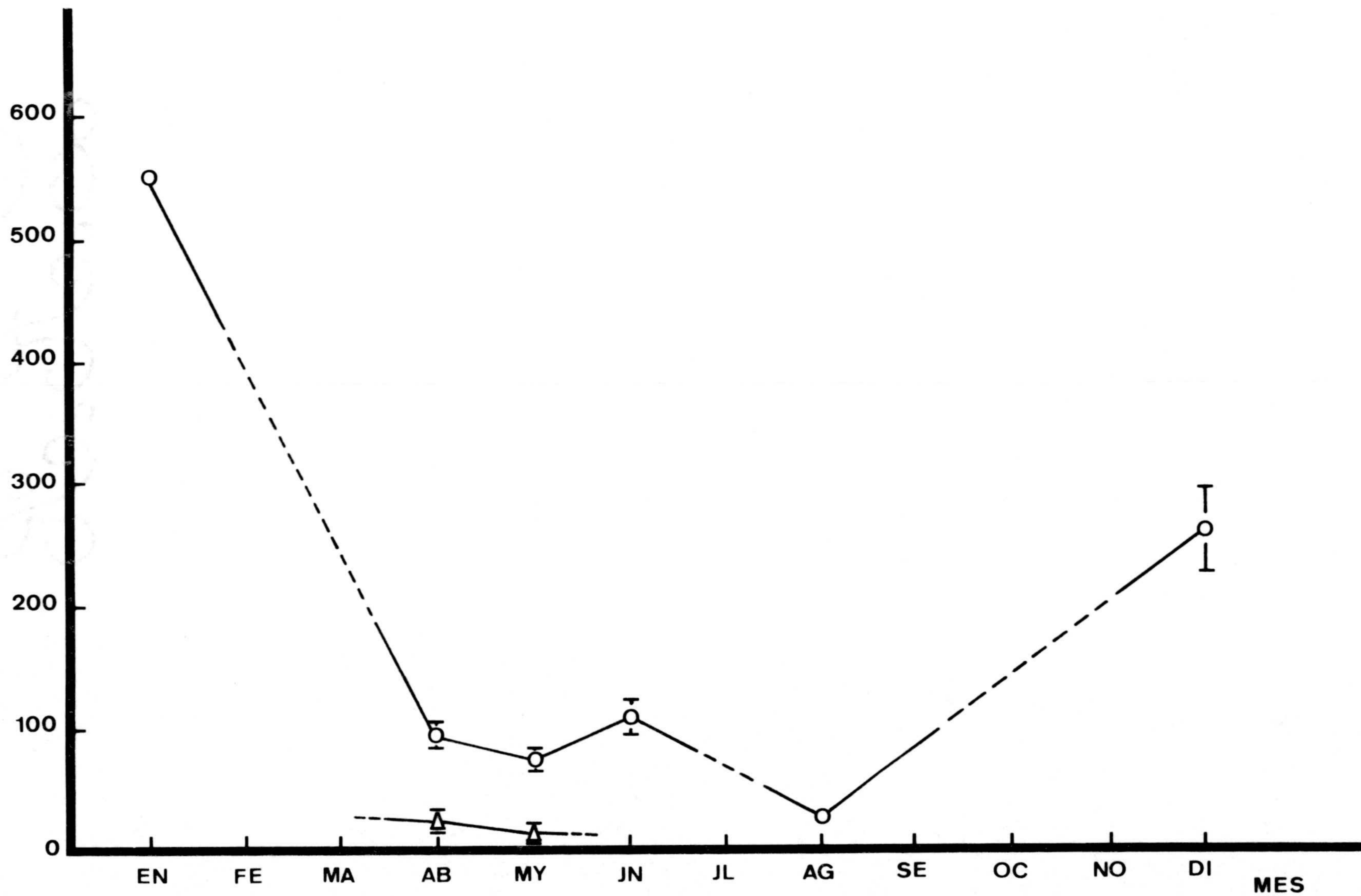


TABLA VIII.- Valores correspondientes a los puntos representados en la gráfica de la Fig. 20 (peso del útero vs. mes de captura).

MES DE CAPTURA	ADULTOS			JOVENES		
	n	X PU	σ_n	n	X PU	σ_n
EN	1	553.0	-	-	-	-
FE	-	-	-	-	-	-
MA	-	-	-	-	-	-
AB	2	95.7	11	3	23.9	14
MY	4	76.5	18	4	13.9	8
JN	3	111.9	31	-	-	-
JL	-	-	-	-	-	-
AG	1	25.8	-	-	-	-
SP	-	-	-	-	-	-
OC	-	-	-	-	-	-
NO	-	-	-	-	-	-
DI	3	259.1	74	-	-	-

n = nº de individuos analizados en el mes.

X PU = Valor medio del peso del útero expresado en mg.

σ_n = Desviación típica.

Fig. 21.- Representación del peso de uno de los ovotestes de cada intersexo en función del mes de captura. La nube de puntos resultante no permite ajustarlos a ninguna curva definida, lo que parece indicar la falta de relación entre ambas variables.



P.O.
(mg)

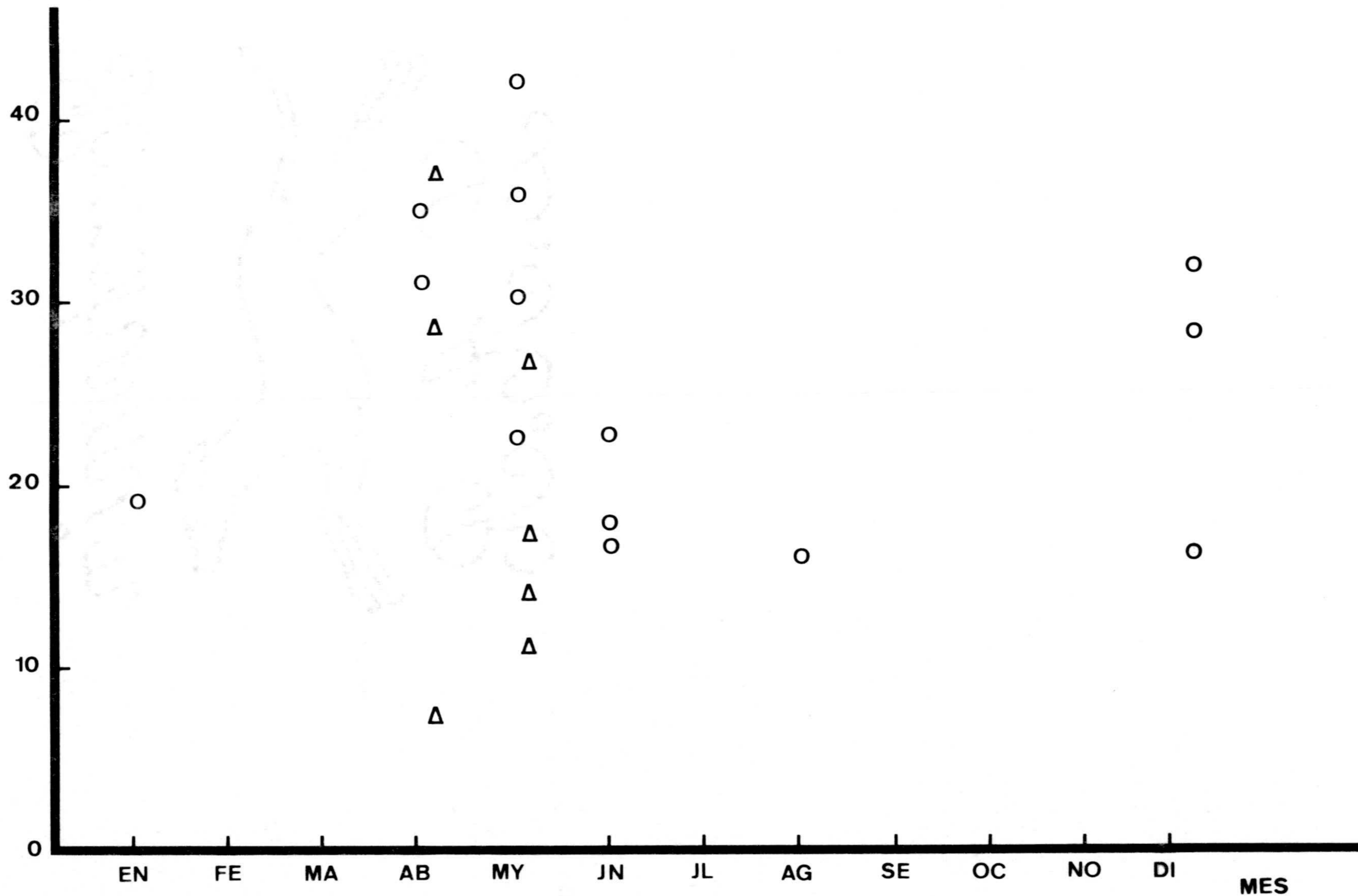


TABLA IX.- Valores correspondientes a los puntos representados en la gráfica de la Fig. 21 (peso de un ovoteste vs. mes de captura).

MES DE CAPTURA	PESO DEL OVOTESTE	
	ADULTOS	JOVENES
EN	19	
FE		
MA		
AB	31, 35	7, 29, 37
MY	22, 30, 36, 42	11, 14, 17, 26
JN	16, 18, 22	
JL		
AG	15	
SP		
OC		
NO		
DI	15, 28, 31	

pesos expresados en mg

En cambio, cuando buscamos establecer una posible relación entre el peso del ovoteste y la edad del animal (fig. 22, tabla X), observamos que si los ejemplares eran englobados en tres grupos de edad (jóvenes, edad mediana y edad avanzada, cuyos índices de edad eran <0.9 , $0.9-1.1$ y >1.1 , respectivamente), las medias del peso del ovoteste crecían ligeramente con la edad en una magnitud poco significativa, mientras que las desviaciones típicas disminuían considerablemente al pasar de un grupo de edad al inmediato superior. Esto implica que entre los individuos de mayor edad, la variabilidad en el tamaño del ovoteste es menor que entre los más jóvenes, donde éste puede presentar valores extremos.

TABLA X.- Valores correspondientes a los puntos representados en la gráfica de la Fig. 22 (peso del ovoteste vs. edad).

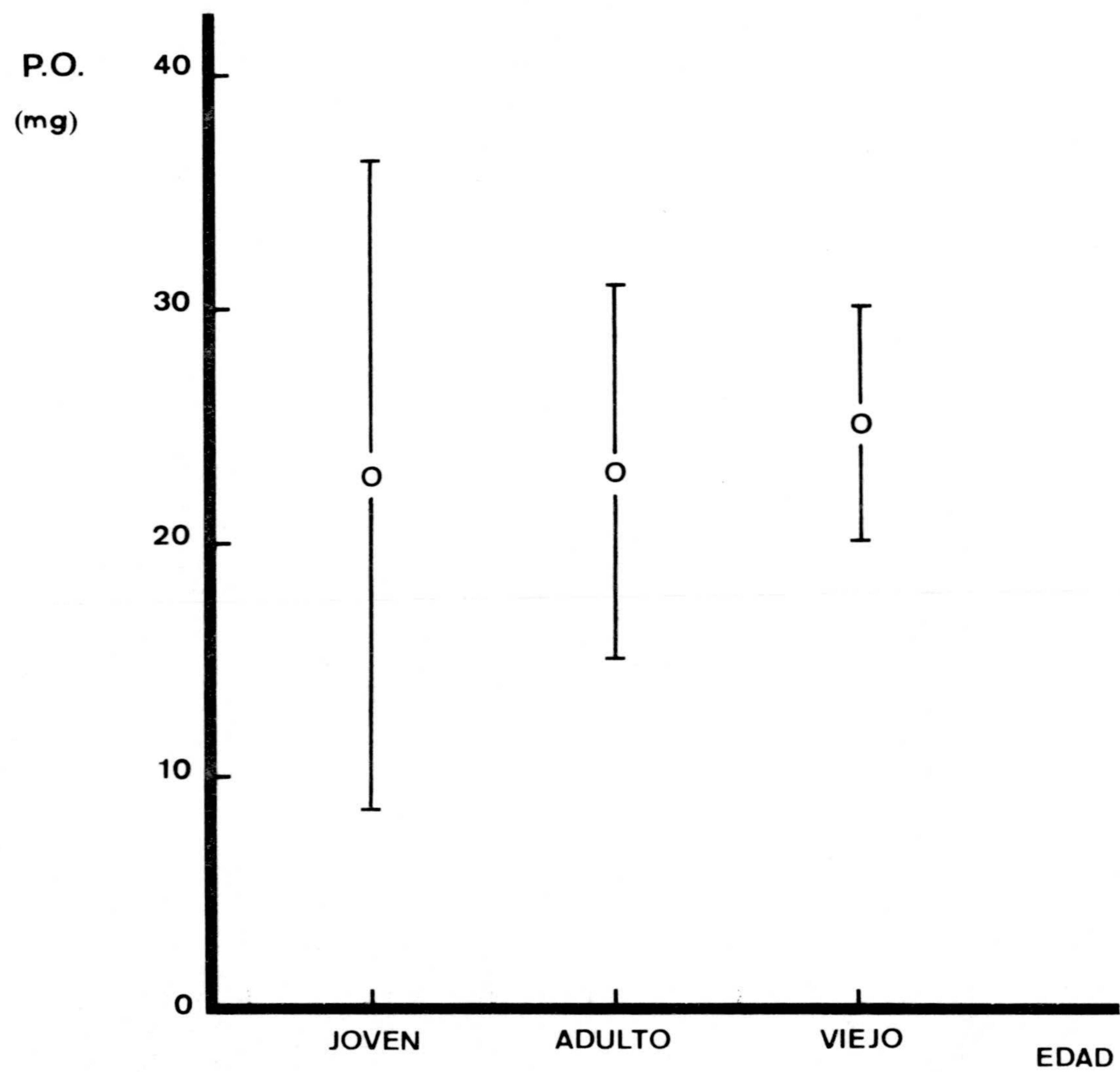
	CLASES DE EDAD		
	JOVENES	ADULTOS	VIEJOS
n	11	6	3
X PO	23	23	25.9
σ_n	14.3	8	5

n = nº de individuos de cada clase de edad.

X PO = Valor medio del peso del ovoteste expresado en mg.

σ_n = Desviación típica.

Fig. 22.- Variación del peso de los ovotestes en función de la edad de los intersexos que lo portan. Los individuos han sido agrupados en tres clases de edad (jóvenes, adultos y viejos). Nótese que mientras las medias del peso del ovoteste se mantienen casi constantes a lo largo de la vida del animal, aunque suben ligeramente en los individuos de mayor edad, las desviaciones típicas decrecen claramente conforme avanza ésta.



ESTUDIOS HISTOLOGICOS DE LAS GONADAS

Machos normales (34, XY)

El estudio histológico de los testículos de los machos XY en cualquiera de los tipos antes descritos (adultos sexualmente activos e inactivos y subadultos o juveniles) demuestra un desarrollo normal de los mismos, aunque con las lógicas diferencias consecuencia del grado de desarrollo o actividad.

Los testículos de los individuos adultos sexualmente activos son los de mayor tamaño, como ya se indicó anteriormente. La túnica albugínea constituye una gruesa cápsula fibrosa que engloba a una masa testicular constituida por túbulos seminíferos y grupos de células intersticiales o de Leydig (fig. 23a).

Los tubos seminíferos muestran un diámetro medio de 160 μm . La "lámina propia" o tejido envolvente de los mismos es muy delgada y en ella apenas se pueden distinguir las células mióides que, en cualquier caso constituyen siempre una capa monoestratificada (fig. 23b). Esta lámina propia envuelve al epitelio seminífero, de gran grosor en estos machos fértiles. En el mismo se aprecian claramente las células de Sertoli, con núcleo ovoideo, grande y de tinción característica, formado por un cuerpo central redondo u oval flanqueado por dos masas basófilas redondeadas. Estos núcleos se encuentran generalmente en posición basal o en el segundo estrato de células (fig. 23b).

Junto a los núcleos de las células de Sertoli, se aprecian claramente las espermatogonias de tipo A en sus dos modalidades, "claras" y "oscuras", según la intensidad de

tinción de sus núcleos. Ambas se caracterizan por presentar un citoplasma muy poco denso, casi transparente en ocasiones. Las espermatogonias de tipo B muestran un núcleo esférico con grumos de cromatina de diferente tamaño y un único nucleolo muy prominente. El citoplasma de estas células es muy similar al de las espermatogonias de tipo A (fig. 23b).

En el siguiente estrato de células se observan los espermatocitos primarios, de citoplasma escaso y con un núcleo muy voluminoso, en el que se distinguen los bivalentes cromosómicos formando una densa maraña. Entre los espermatocitos primarios, se pueden diferenciar aquellos que se encuentran en estadio leptoténico-cigoténico de los que han alcanzado ya las fases de paquitene o diplotene. Tras la división del núcleo de estas células (meiosis I), se originan los espermatocitos secundarios, los cuales se dividen a su vez rápidamente (meiosis II), por lo cual su observación es mucho menos frecuente. Aquí los cromosomas están muy contraídos y densos.

Avanzando aún más hacia la luz del tubo seminífero, podemos ver las espermatidas, de núcleo pequeño y denso y finalmente los espermatozoides, que proyectan sus colas hacia dicha luz (fig. 23b).

Los espacios angulosos situados entre los diferentes túbulos seminíferos se encuentran ocupados por un tejido constituido por un único tipo celular, las células de Leydig formando grandes grupos, de manera que el porcentaje de área transversal que ocupan estas células parece ser superior en esta especie que en otros mamíferos, tales como roedores o primates.

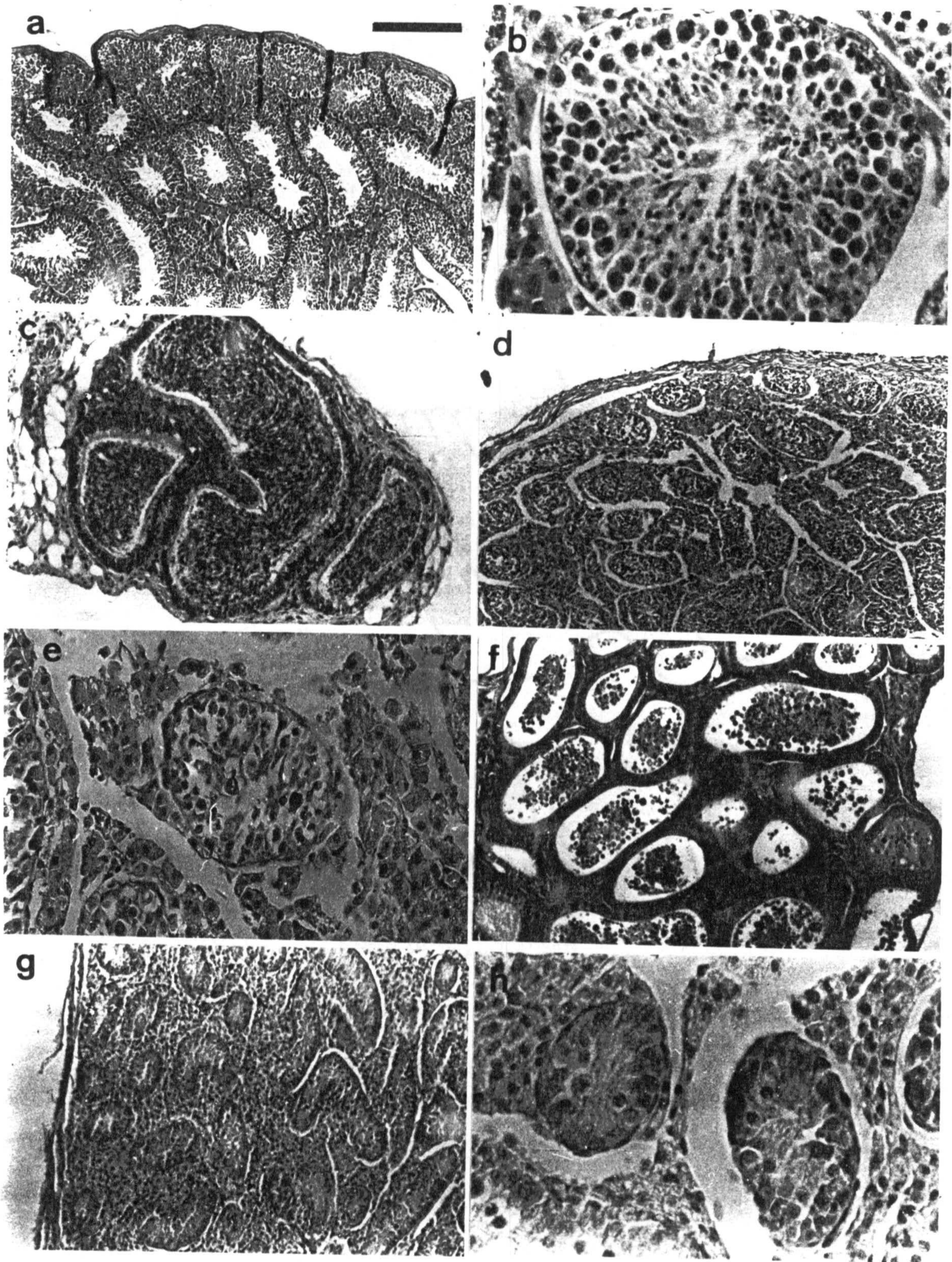
De igual manera que los cortes de testículo de los topos

fértiles denotan la estructura típica descrita para mamíferos, también el epidídimo es completamente normal. El conducto del epidídimo es muy contorneado en la cabeza del mismo. Internamente se encuentra tapizado por células cilíndricas con núcleo basal que presentan un penacho de estereocilios proyectados hacia la luz del conducto (fig. 23c). Las diferentes asas que constituyen este conducto se encuentran muy empaquetadas, tal como se ha descrito para la mayoría de los mamíferos estudiados, y rellenos de espermatozoides.

Además de los machos adultos sexualmente activos, hemos indicado anteriormente que existen machos adultos sexualmente inactivos y temporalmente estériles y machos jóvenes o subadultos, también estériles. En ambos casos, los testículos muestran claras características infantiles, es decir, todas sus estructuras presentan un aspecto normal aunque el epitelio germinativo de los túbulo seminíferos se encuentra involucionado en los machos adultos inactivos y aún no desarrollado en los subadultos. En cualquier caso, el resultado final es similar; una disminución considerable del diámetro del túbulo seminífero ($56\mu\text{m}$ de \varnothing medio) (figs. 23d y 23g) que provoca una disminución real del volumen del mismo y por consiguiente del testículo en su conjunto, así como un aumento del porcentaje de área transversal ocupado por el tejido intersticial que, de esta forma, parece haber sufrido una considerable hiperplasia.

Tanto en los machos adultos sexualmente inactivos como en los subadultos, los túbulo seminíferos presentan células de Sertoli y espermatogonias dispuestas en los escasos estratos celulares que presentan estos túbulo. Sin embargo, en ellos se observa cómo entre las distintas células de Sertoli existen huecos que a veces alcanzan la lámina propia del túbulo, lo que puede interpretarse como un reflejo del

Fig. 23.— Cortes histológicos de las gónadas de los machos normales 34,XY. **a-c)** Macho adulto sexualmente activo: **a)** imagen a poco aumento. Nótese el aspecto normal de la gónada; los túbulos seminíferos y la túnica albugínea son gruesos y los acúmulos de células de Leydig relativamente pequeños. **b)** Túbulo seminífero a mayor aumento; se pueden observar diversos tipos celulares en el epitelio germinativo. **c)** Epidídimo con abundantes espermatozoides en sus túbulos. **d-f)** Macho normal sexualmente inactivo: **d)** Imagen a poco aumento; los túbulos seminíferos se encuentran reducidos en diámetro. **e)** Túbulo seminífero a mayor aumento que muestra una intensa degeneración del epitelio germinativo. **f)** Epidídimo en el que se observan células provenientes del epitelio germinativo en sus túbulos, los cuales están carentes de espermatozoides. **g-h)** Macho joven: **g)** Imagen a bajo aumento que muestra tubos seminíferos de escaso diámetro y amplia matriz de células de Leydig. **h)** Mayor aumento de los túbulos, en los que se aprecia el estado aún no desarrollado del epitelio germinativo y la ausencia de luz en algunos de ellos. Barra = 200 μm en a, d y g; 100 μm en f; 50 μm en b, c, e y h.



proceso degenerativo que han sufrido las células germinales en estos individuos (fig. 23e). Como consecuencia de esto, la luz del túbulo toma el aspecto de tener ramificaciones hacia la lámina propia. Dicho proceso degenerativo se manifiesta claramente en la presencia de numerosas células, provenientes del epitelio germinativo de los túbulos seminíferos, en la luz de los túbulos del epidídimo de estos individuos (Fig. 23f). Por el contrario, en los subadultos los túbulos muestran un aspecto más compacto, sin huecos que interrumpen el epitelio y frecuentemente carentes aún de luz tubular (fig. 23h).

Aparte de las espermatogonias y de algunos espermatocitos primarios que aparecen esporádicamente en el epitelio de los túbulos, estos individuos no presentan ningún otro tipo de células germinativas (espermatocitos secundarios o espermatidas) ni espermatozoides.

Machos de sexo revertido (34,XX)

El análisis histológico de las gónadas de los machos XX revela notables diferencias con respecto a los descritos anteriormente para los machos normales XY. Además de las ya mencionadas diferencias en el tamaño y peso de las gónadas, los túbulos seminíferos de estos machos XX poseen una sección menor (25 μm de \varnothing medio) y menos compleja que la de los machos XY normales, ya sean inmaduros o adultos (55 y 160 μm , respectivamente)(fig. 24a). Dada su escasa complejidad y la ausencia de luz, estos túbulos son claramente similares a los "cordones sexuales" macizos, típicos de las gónadas fetales indiferenciadas.

En estos cordones sexuales sólo es posible distinguir un único tipo celular correspondiente al de las células de

Sertoli, con núcleo ovoideo de contorno muy picnótico. Estas células no parecen disponerse de forma ordenada dentro del cordón sexual sino que lo hacen al azar (fig. 24b).

Por otra parte, existen notables diferencias en la cantidad de tejido intersticial existente entre los cordones sexuales. Así, mientras que en los machos adultos se observaban pequeños grupos de células de Leydig y en los inmaduros estos grupos son algo más numerosos, en los machos XX las células de Leydig constituyen una verdadera matriz compacta y continua que rellena la mayor parte del volumen testicular (fig. 24a).

Hembras (34, XX)

Los cortes histológicos de los ovarios de las hembras muestran unas características muy similares a los de la mayoría de los mamíferos. En el ovario se pueden distinguir claramente dos regiones bien definidas: por una parte la corteza donde residen los folículos en diversos estadios de maduración, y por otra parte una médula constituida principalmente por tejido conectivo en donde predominan los vasos sanguíneos, que se caracterizan por su gran calibre y sección de forma irregular (fig. 25a).

Dentro de la corteza, e incluidos en una densa matriz conjuntiva, se encuentran alojados los folículos los cuales se pueden catalogar, como en el resto de los mamíferos, en folículos primordiales, primarios, secundarios y maduros o de Graff, así como algún cuerpo lúteo.

Los folículos primordiales o folículos unilaminares están constituidos por un oocito pequeño rodeado por un estrato simple de células foliculares. Son muy abundantes y están

generalmente alojados en las regiones más periféricas de la corteza ovárica (fig. 25b).

En los folículos primarios, que constituyen el primer estadio en el proceso madurativo del folículo, el oocito presenta un mayor volumen y se ha rodeado ya de varias capas de células esferoideas, que constituyen la granulosa, los cuales a su vez, están envueltos por otra capa de células aplanadas que forman la densa envuelta externa del folículo o "teca". Entre el oocito y las células de la granulosa se observa ya la formación de una zona "pelúcida" (fig. 25c).

Los folículos secundarios se caracterizan, además de por su mayor tamaño, por la existencia de un antro folicular, es decir, un hueco lleno de líquido folicular que va envolviendo paulatinamente al oocito y a parte de las células de la granulosa por las que éste queda rodeado (fig. 25d), El conjunto oocito-granulosa permanece aún unido a las tecas por un pedúnculo de células foliculares o "cúmulo ovífero" que, dependiendo del sentido del corte histológico es visible o no.

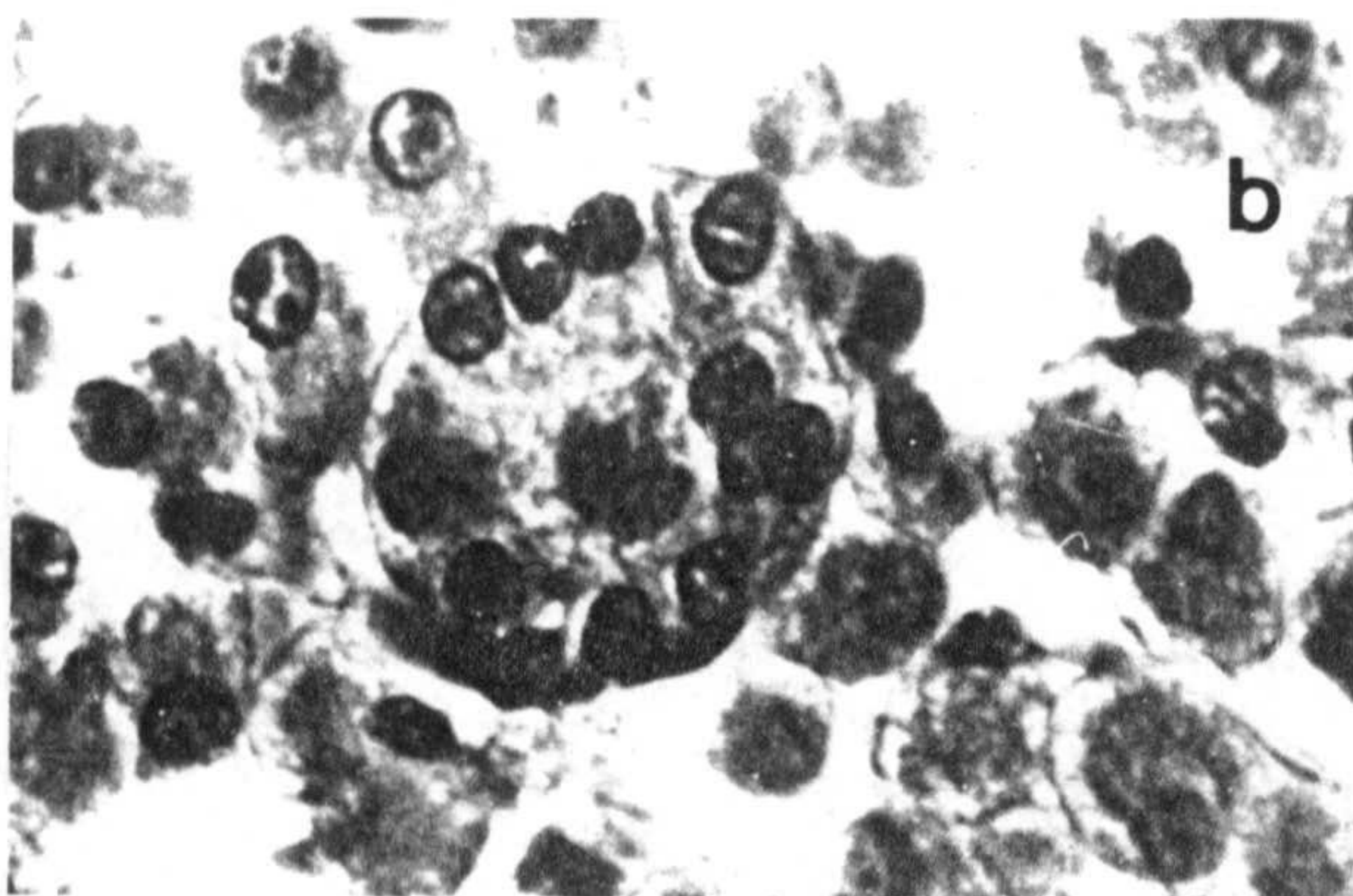
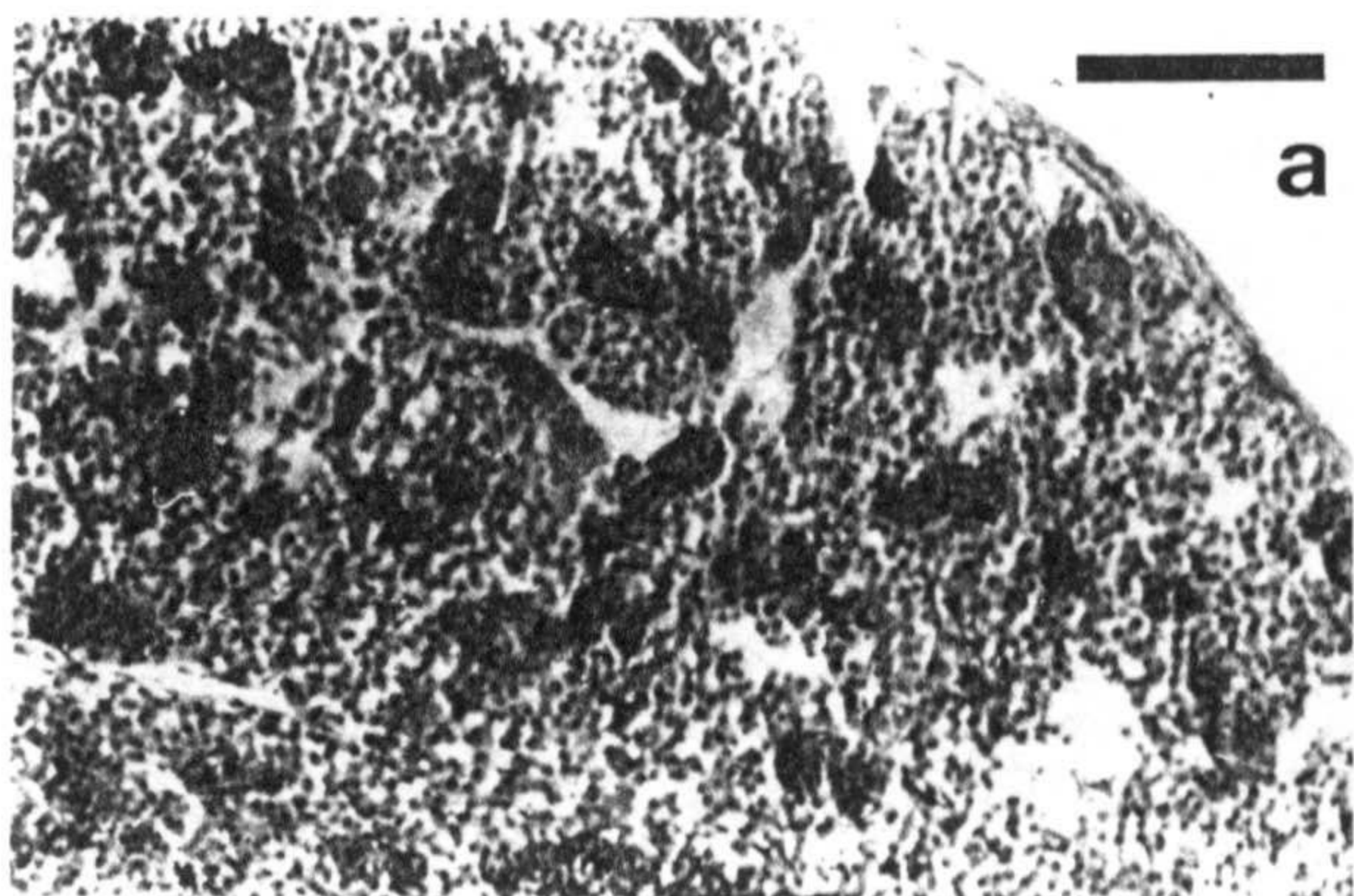
Finalmente, en los folículos maduros o de Graff, el oocito y la granulosa quedan flotando en el líquido folicular. El tamaño del oocito y del folículo son máximos (fig. 25e). Los folículos secundarios y maduros frecuentemente ocupan el grosor de la corteza y hacen prominencia en la superficie libre del ovario, dándole a éste un aspecto externo abultado.

Intersexos (34,XX)

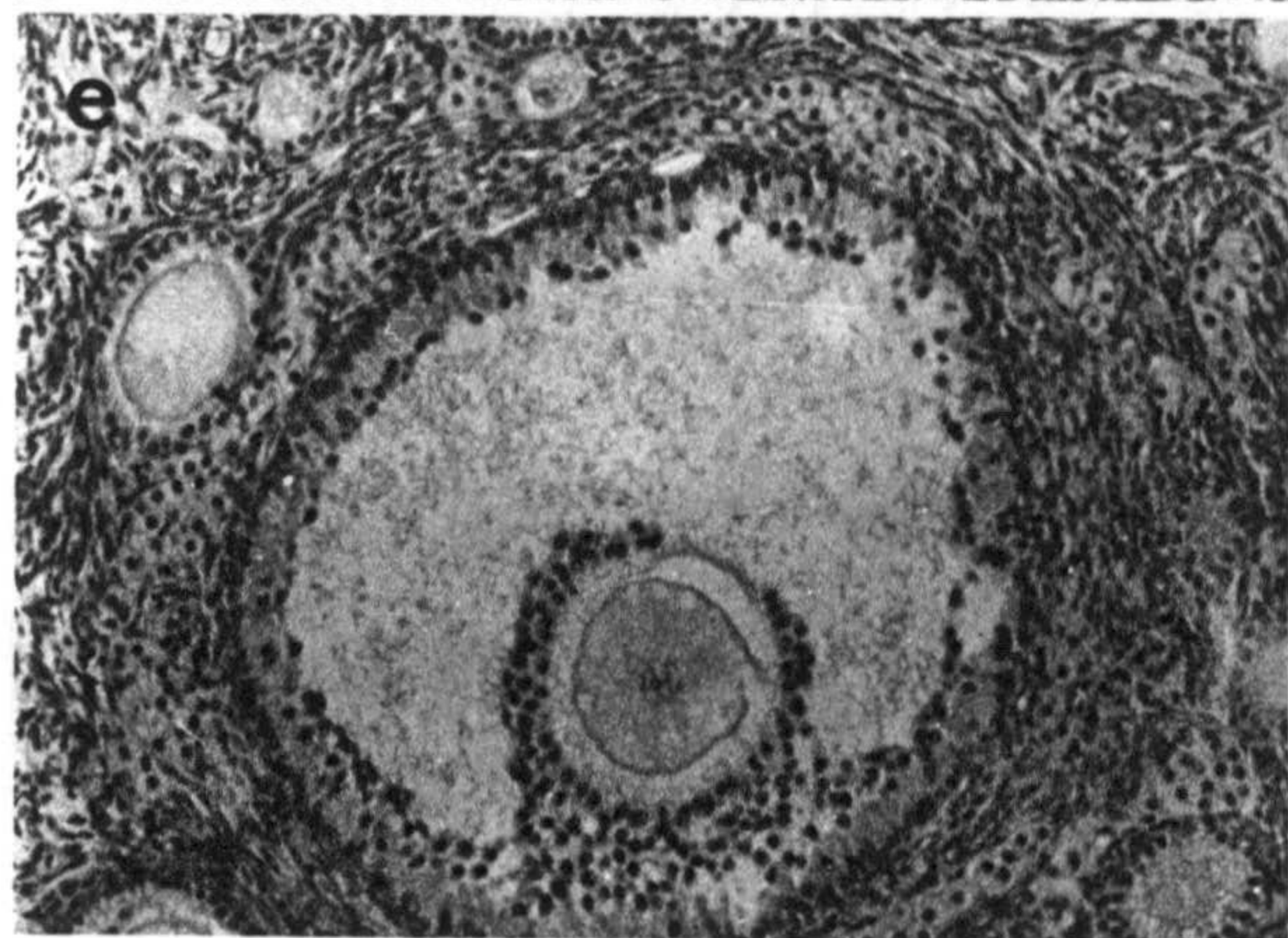
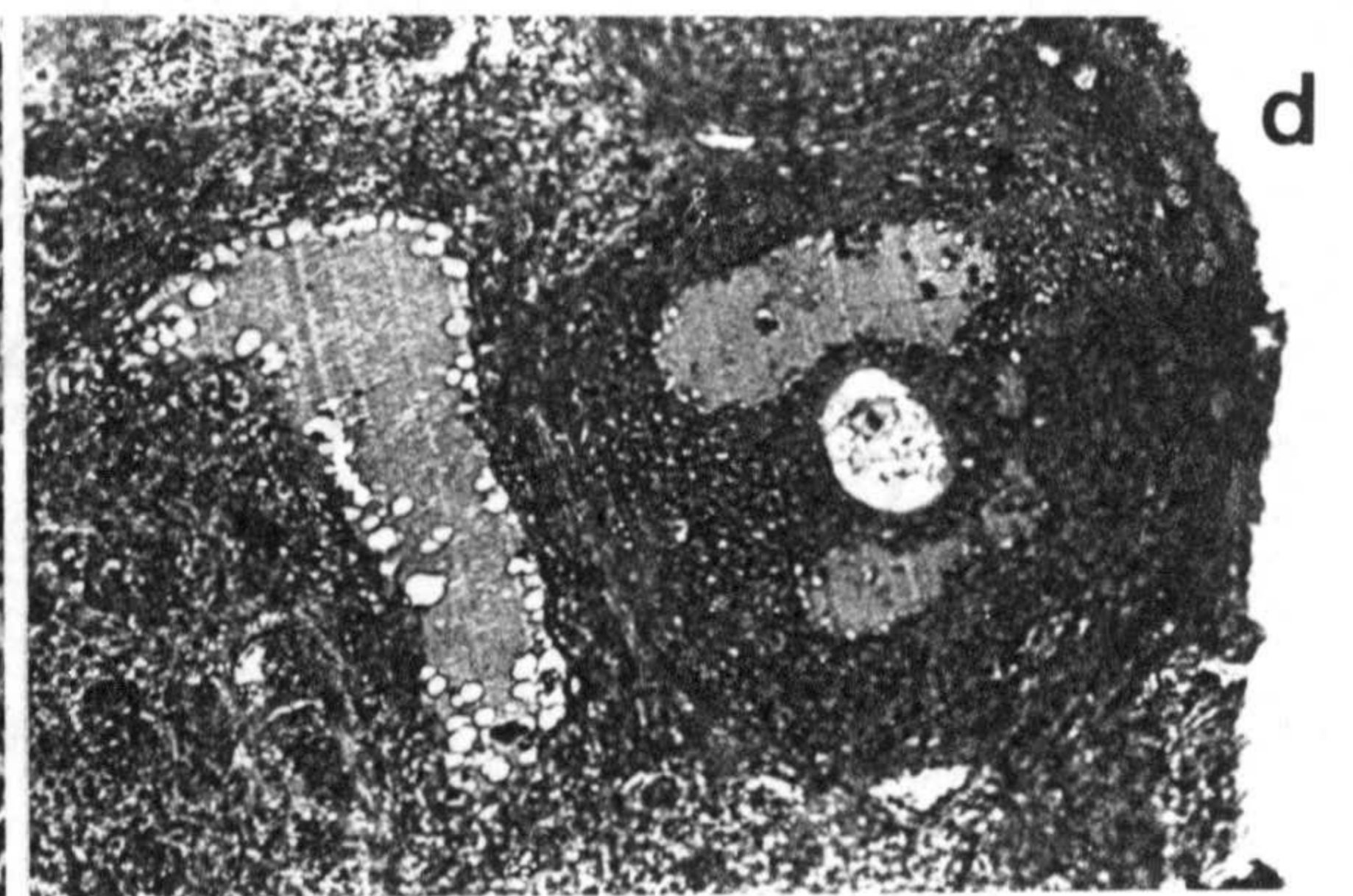
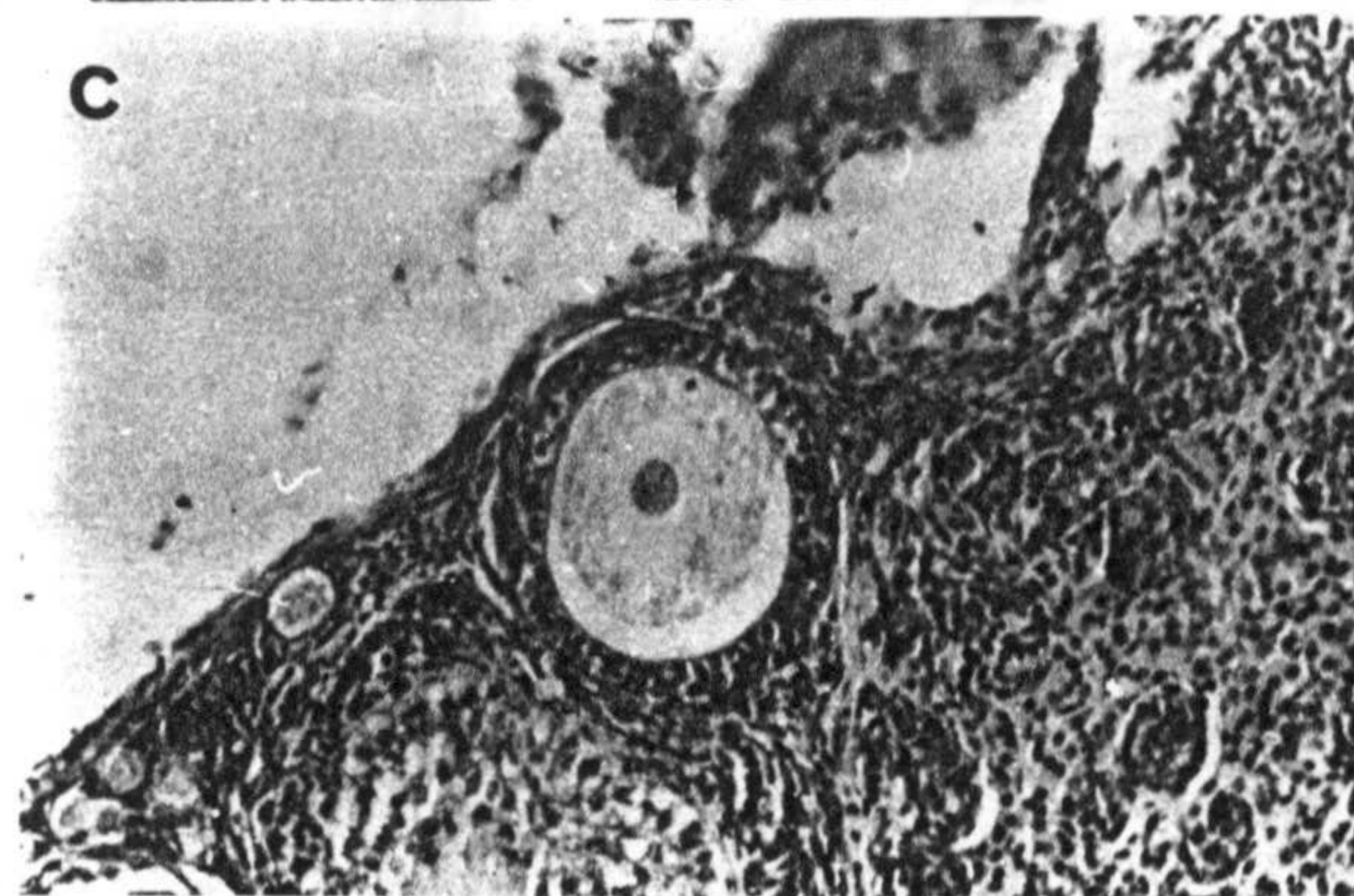
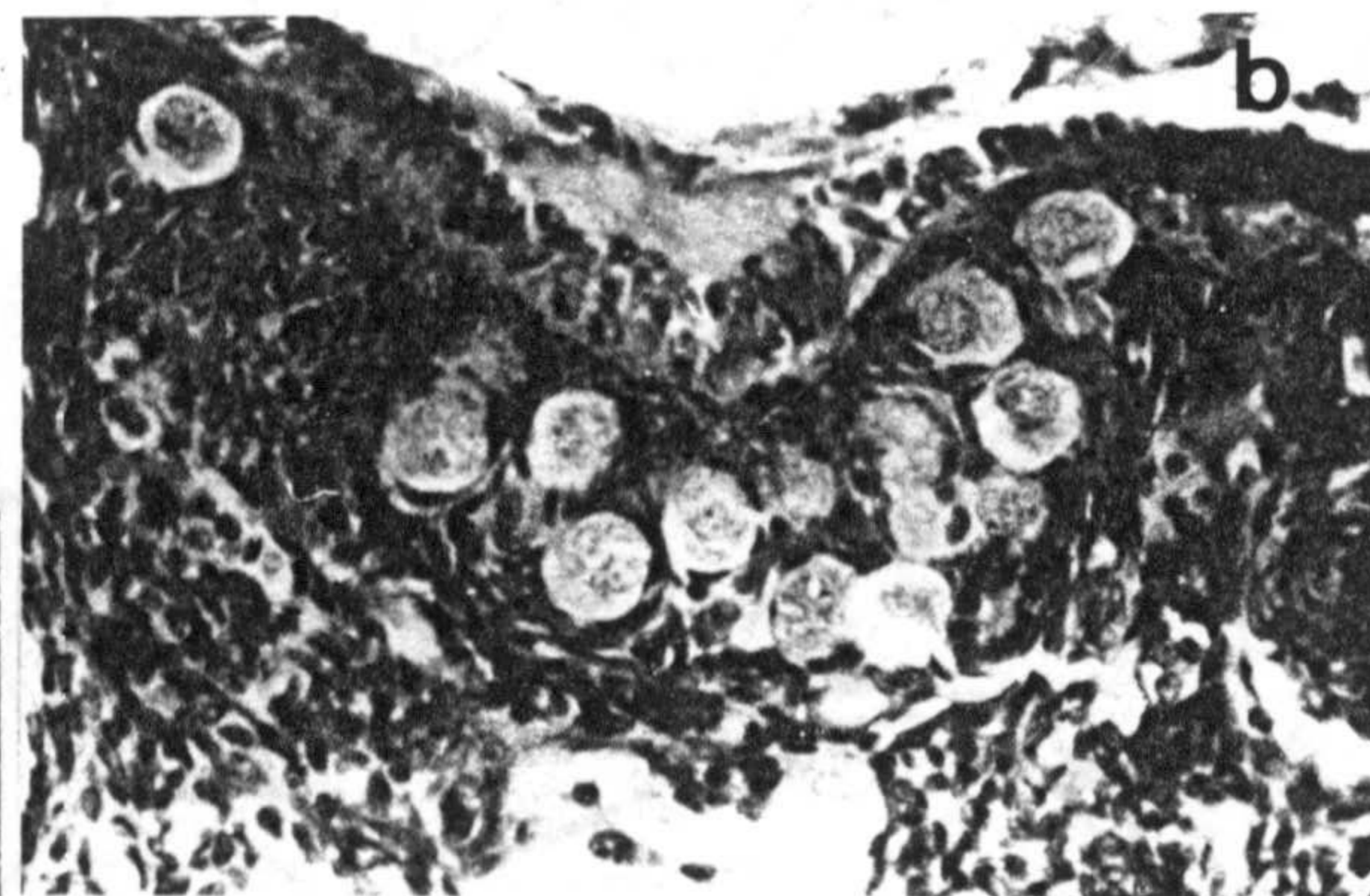
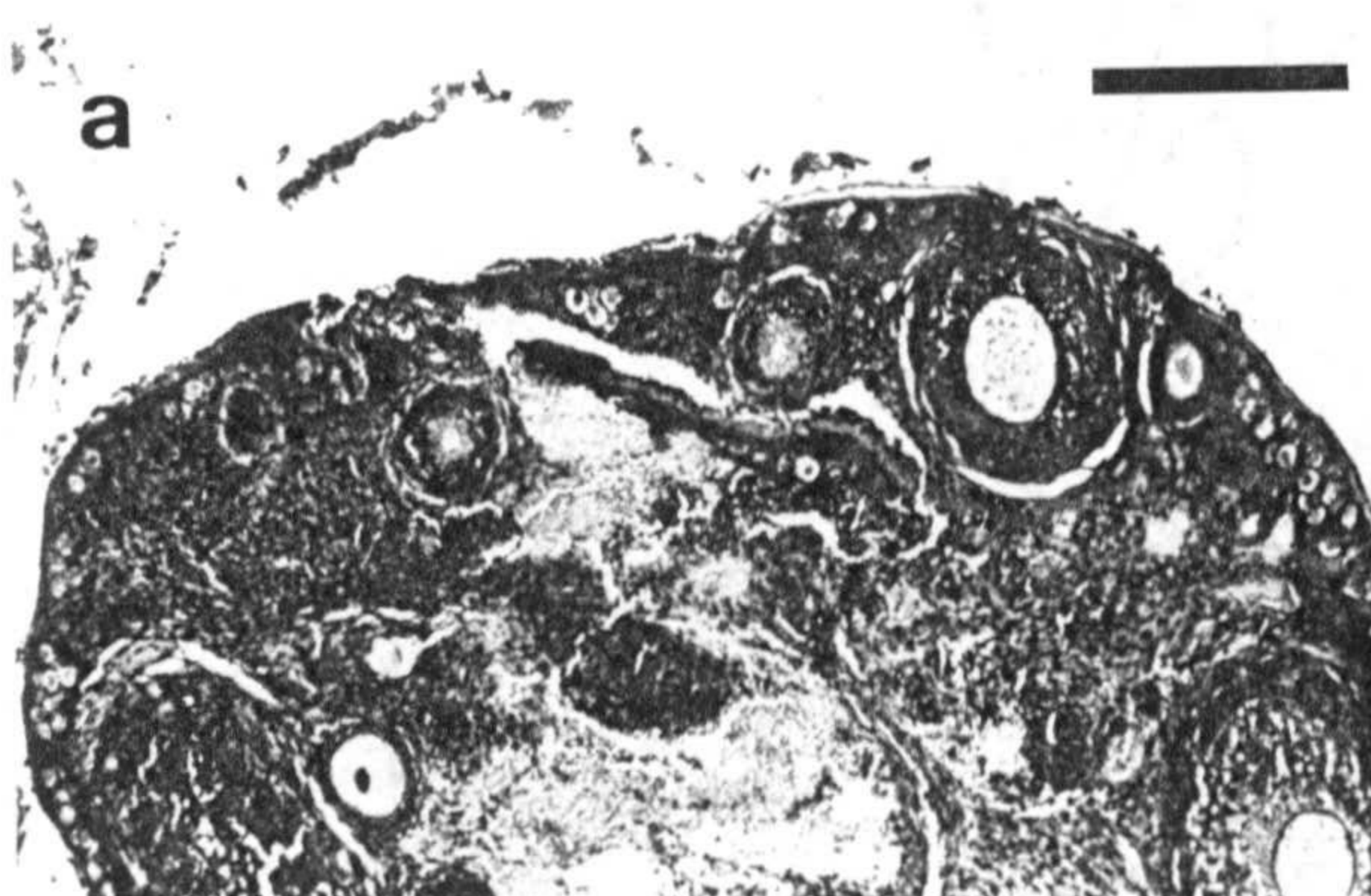
Todos los intersexos analizados presentaban sus dos gónadas del mismo tipo, ovotestes, es decir, con características propias de testículo y de ovario. En ninguno de ellos se observaron configuraciones asimétricas del tipo ovario y

Fig. 24.- Cortes histológicos de las gónadas de un macho XX. **a)** Bajo aumento: no existen tubos seminíferos sino cordones sexuales macizos englobados en una densa matriz intersticial de células de Leydig; sus características son claramente disgenésicas. **b)** Detalle de uno de los cordones en el que se observa un único tipo celular semejante a la célula de Sertoli, estando ausente cualquier otro tipo propio de un epitelio germinativo. Barra = 200 μm en a y 25 μm en b.

Fig. 25.- Cortes histológicos en ovarios de hembras normales. **a)** Aspecto de la gónada a poco aumento en donde se observa la matriz interna y la corteza externa con abundantes folículos en diferentes estadios de maduración. **b)** Detalle de un grupo de folículos primordiales próximos a la periferia del órgano, el cual muestra un epitelio externo típico de células cúbicas. **c)** Folículo primario. **d)** Folículo secundario en donde se observa la formación del antro folicular y el cúmulo ovífero. **e)** Folículo maduro o de Graff. Barra = 400 μm en a; 50 μm en b; 100 μm en c, d y e.



24



25

testículo, ovario y ovoteste, o testículo y ovoteste, tal como se han descrito en hermafroditas de otras especies de mamíferos.

Aunque, como se indicó anteriormente, todos los intersexos obedecen a un mismo patrón desde el punto de vista anatómico, o sea, fenotipo externo femenino y presencia de vagina, útero birrámeo y ovotestes, existe sin embargo una notable variabilidad en cuanto a la constitución histológica de unos individuos a otros. Mientras algunos intersexos presentan en sus gónadas características predominantemente testiculares, otros muestran ovotestes en donde la fracción ovárica está muy desarrollada y se asemeja considerablemente a un ovario funcional.

En el primer caso, la gónada, que presenta una mínima porción de tejido ovárico diferenciado, tiene forma ovoidea y superficie lisa sin abultamientos foliculares (fig. 26a) y su cubierta se asemeja mucho a la túnica albugínea de un testículo. Internamente, se observan túbulos seminíferos de aspecto infantil muy parecidos a los de un macho inmaduro. Dentro de estos túbulos existen células similares a las células de Sertoli, con núcleo ovoideo y junto a ellas, hay otras células que se pueden asemejar a espermatogonias dado el aspecto claro de su citoplasma.

La observación histológica de estos túbulos seminíferos permite comprobar la existencia de vesículas de fagocitosis rellenas de material nuclear dentro del citoplasma de las células de Sertoli, de modo que aparecen en forma de pequeños rosarios o grupitos de vesículas picnóticas (fig. 26b), lo que denota la existencia de muerte celular y posterior fagocitosis por parte de las células de Sertoli.

Además de estas gónadas con características claramente

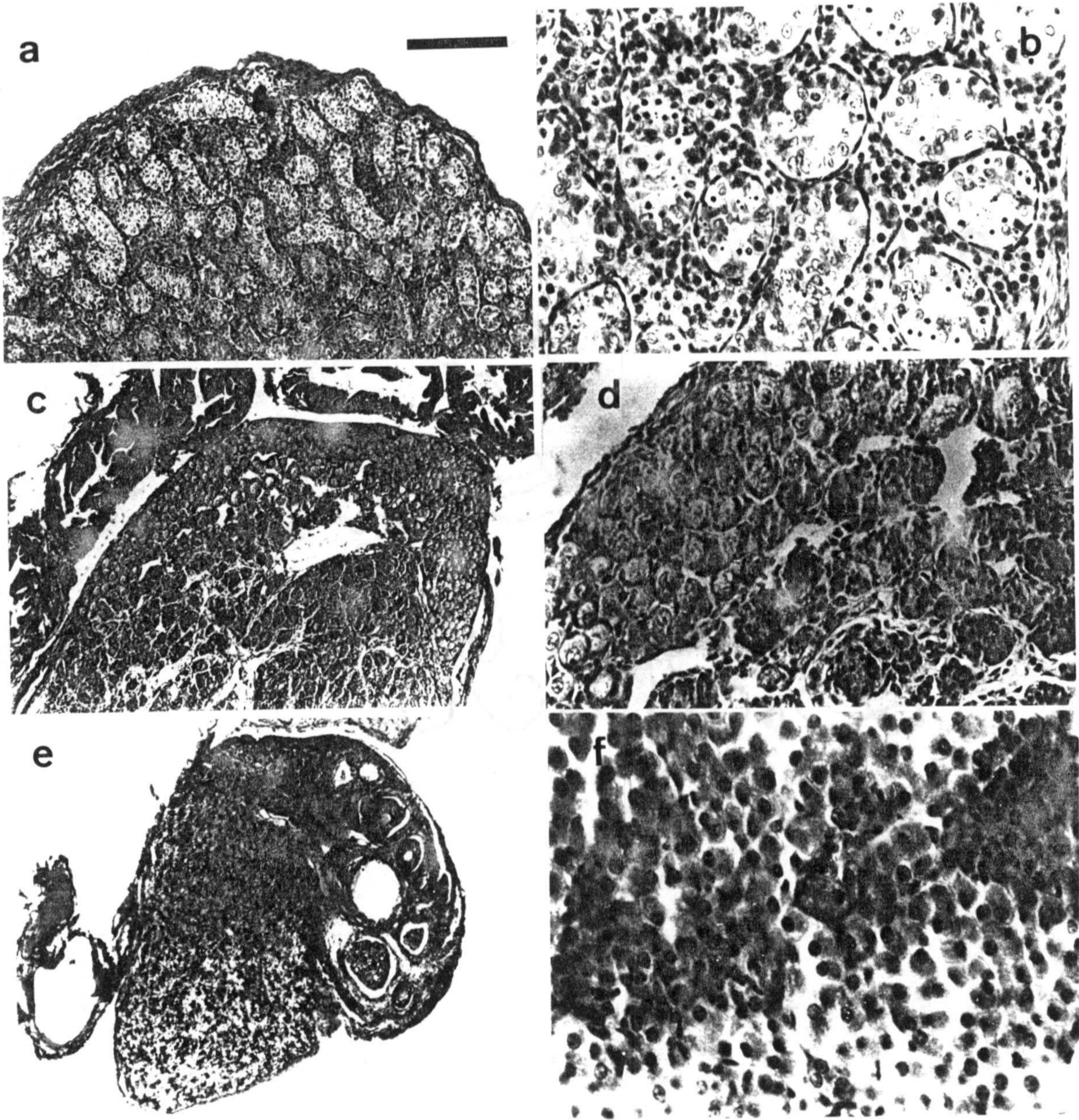
testiculares, existen otras en los intersexos que, a pesar de presentar también escaso tejido ovárico, muestran una histología diferente. Aquí no se puede hablar de túbulo seminíferos sino de cordones sexuales macizos de aspecto claramente disgenésico o fetal (fig. 26c y d). Su morfología es idéntica a la descrita anteriormente para los testículos de los machos XX. Los delgados cordones sexuales, que solo cuentan con un único tipo de células en su interior (tipo Sertoli), se encuentran inmersos en una amplia matriz intersticial de células semejantes a las células de Leydig.

En las gónadas de este tipo de intersexos es posible observar la presencia de folículos primordiales, nunca desarrollados a estadios de crecimiento posteriores, que se encuentran invariablemente localizados en la periferia del órgano (fig. 26c y d). El porcentaje de área ocupado por este tejido ovárico puede variar en estos individuos desde un 3% a un 11%, aproximadamente. En estos casos, la parte testicular del órgano es idéntica a la descrita anteriormente (cordones sexuales macizos y amplia matriz intersticial).

Por último, existen intersexos portadores de ovotestes en donde la parte testicular se encuentra considerablemente involucionada mientras que la ovárica muestra un desarrollo casi normal (fig. 26e).

Los cordones sexuales de la porción testicular de estos ovotestes son aún menos complejos que los descritos anteriormente, pues en muchos casos parecen estar desorganizados y diluidos entre la matriz intersticial (fig. 26f). Se puede decir por tanto que el grado de disgenesia testicular de estos ovotestes es el más alto encontrado en este estudio.

Fig. 26.- Cortes histológicos en los ovotestes de los intersexos. **a)** Ovoteste muy semejante a un testículo, con túbulos seminíferos de pequeño diámetro y túnica albugínea multiestratificada y fibrosa. **b)** Detalle de los túbulos seminíferos del ovoteste anterior que muestran pequeñas vesículas picnóticas en el citoplasma de las células de Sertoli, denotando un proceso de degeneración celular. **c)** Imagen a poco aumento de un ovoteste con una relativamente amplia porción de tejido ovárico periférico. **d)** Detalle del corte anterior que muestra abundantes folículos primordiales. **e)** Imagen de un corte longitudinal de un ovoteste completo que muestra en su extensa porción ovárica abundantes folículos en muy diversos estadios de maduración. **f)** Detalle de la porción testicular del ovotete anterior en donde se observa un mínimo desarrollo de los cordones sexuales en este tipo de gónada. Barra = 400 μm en e; 200 μm en a y c; 100 μm en d y 50 μm en b y f.



Por el contrario, la fracción ovárica del ovoteste alcanza aquí un alto grado de desarrollo. El porcentaje de area que ocupa puede llegar hasta el 42% de la total del órgano. En la misma se aprecian claramente una corteza en donde abundan folículos de todos los tipos descritos anteriormente en el caso de los ovarios de las hembras, y una médula interna que cuenta con numerosos vasos sanguíneos de gran calibre y sección irregular (fig. 26e).

La maduración de los folículos de estos órganos parece seguir un proceso totalmente normal. Desde los folículos primordiales hasta los folículos maduros, todos los estadios intermedios están presentes y se producen al parecer muy activamente, pues todos ellos son realmente tan abundantes como en un ovario normal.

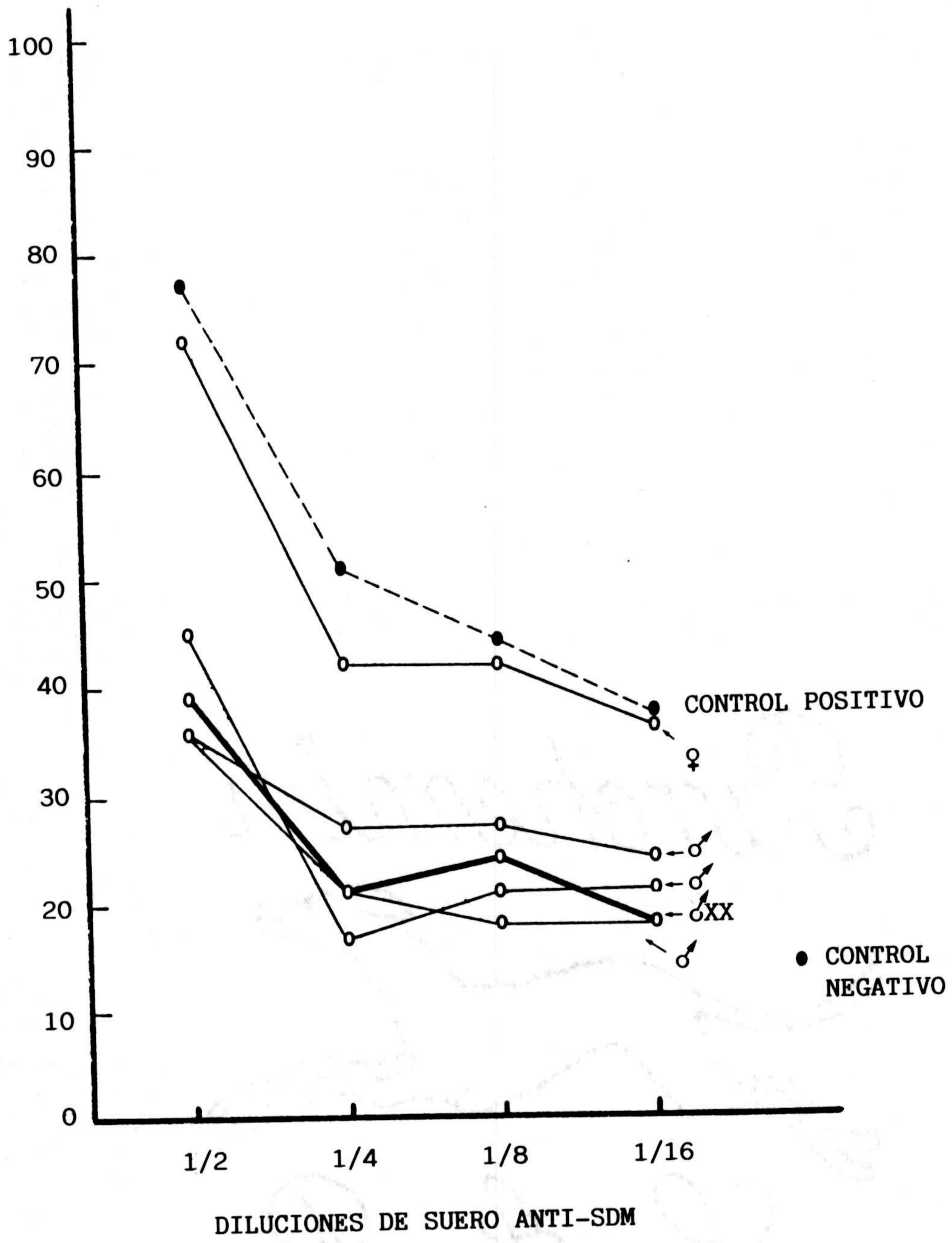
NIVELES DE ANTIGENOS MASCULINOS (SDM)

El estudio serológico de los distintos tipos de individuos de esta población se ha llevado a cabo mediante la realización de una serie de ensayos de citotoxicidad, cuya metodología fue descrita en el apartado correspondiente de "Material y Métodos"; cada uno de los tests se llevó a cabo por duplicado con el fin de contrastar los resultados.

En una primera prueba se analizaron tres machos 34,XY, un macho de sexo revertido 34,XX y una hembra normal 34,XX. Los resultados de estos análisis están reflejados en la gráfica de la figura 27. Como podemos ver, todos los machos, incluido el macho XX, muestran niveles de antígeno similares entre sí y superiores a los de la hembra (por tratarse de un test indirecto de citotoxicidad, las curvas que aparecen en la parte inferior de la gráfica corresponden a individuos con niveles altos de antígenos masculinos, mientras que los

Fig. 27.- Gráfica representativa de los resultados obtenidos en el primer ensayo serológico para la detección de los niveles de antígenos masculinos (SDM). El macho XX (trazo grueso) posee niveles antigénicos similares a los de los machos normales XY, y muy superiores a los de las hembras.





individuos con niveles bajos presentan curvas situadas en la zona alta de la misma). Es decir, a pesar de su constitución cariotípica femenina (34,XX), los machos de sexo revertido poseen los niveles de antígenos esperados para el fenotipo masculino.

En un segundo ensayo se compararon los niveles antigénicos de un macho XY normal y una hembra XX también normal, con los de dos intersexos 34,XX. Como podemos comprobar en la gráfica de la figura 28, los intersexos muestran niveles intermedios entre los de macho y los de hembra, aunque están situados en la gráfica más cerca de los de macho. Es interesante hacer notar aquí que ambos intersexos muestran valores muy similares entre sí, independientemente del grado de masculinización que tienen sus ovotestes.

Se realizó una tercera prueba con objeto de dilucidar la posible existencia de variabilidad en cuanto a los niveles antigénicos que presentan las hembras. Los resultados están representados en la gráfica de la figura 29. En esta experimento se analizaron conjuntamente un macho, dos intersexos y cuatro hembras. El macho y los intersexos muestran resultados consecuentes con los obtenidos en el test anterior, mientras que las hembras denotan un cierto grado de dispersión, de modo que sus curvas ocupan una zona relativamente amplia de la gráfica. Por lo tanto, las hembras pueden poseer distintos grados de contenido antigénico, aunque en ningún caso se ve afectado su desarrollo femenino normal.

En cada una de las gráficas resultantes de los distintos ensayos serológicos realizados, el valor correspondiente a cada punto (expresado en porcentaje de células muertas), ha sido transformado en un valor estimado del nivel de antígenos masculinos de cada individuo. Estos valores "x" han sido obtenidos aplicando la fórmula $x=100-(a-c/b-c)100$

Fig. 28.- Gráfica representativa de los resultados del segundo ensayo serológico. Ambos intersexos muestran niveles antigénicos similares entre sí e intermedios entre los de macho y hembra, aunque muy próximos a los de aquel.



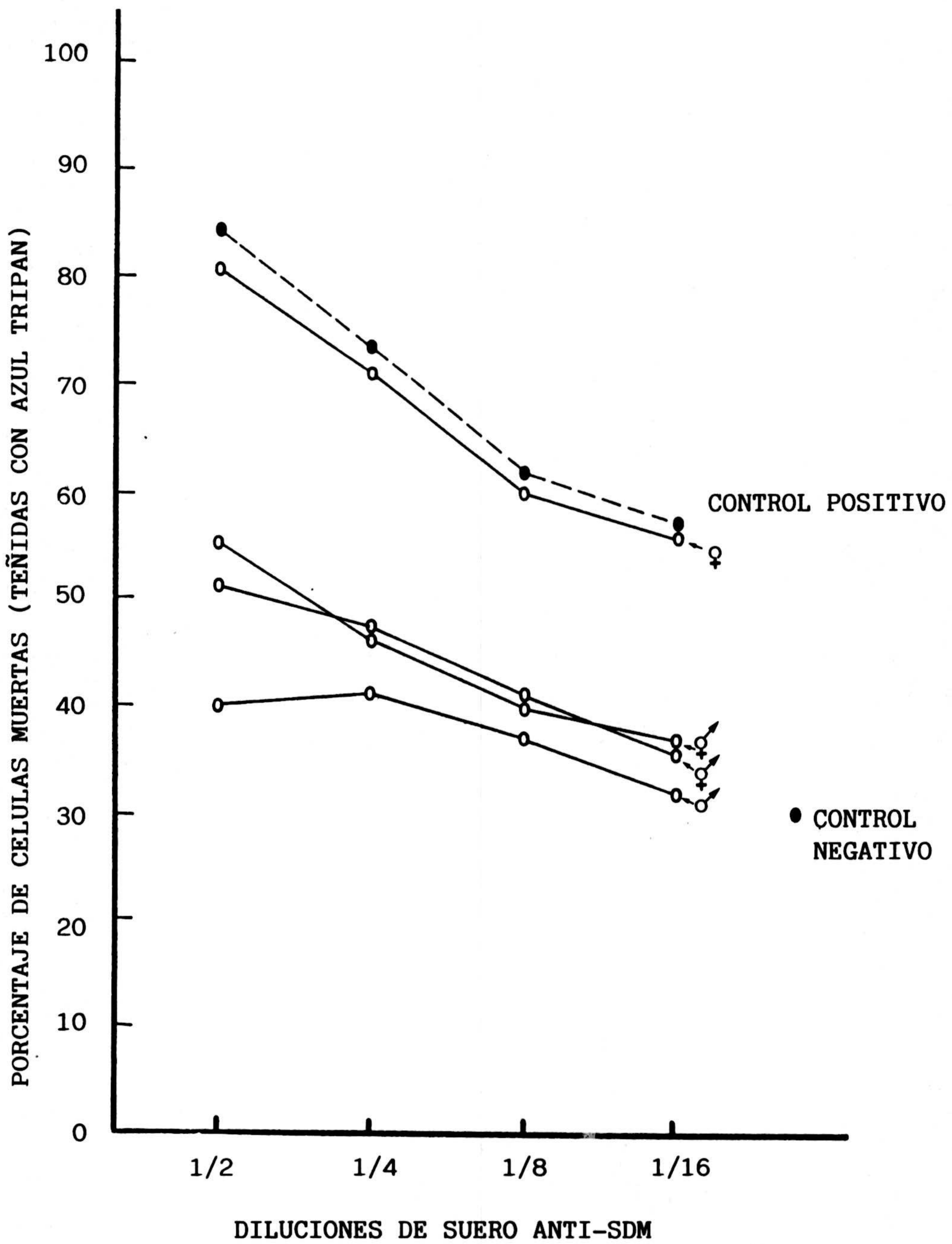
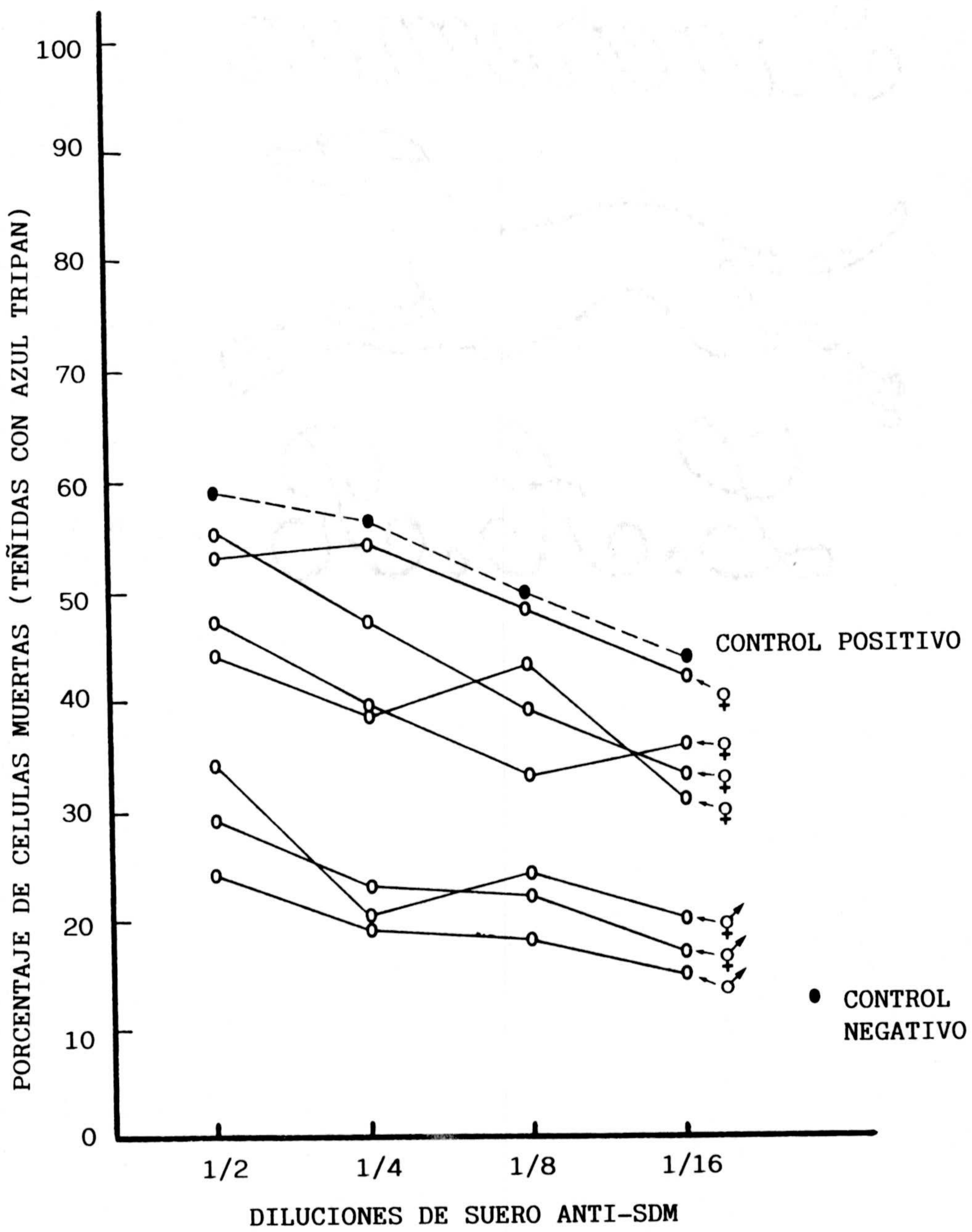


Fig. 29.- Gráfica representativa de los resultados del tercer ensayo serológico. Obsérvese la dispersión que muestran los niveles antigénicos de las hembras, así como la constancia de resultados con respecto al test anterior (Fig. 28), en cuanto a los niveles de antígenos en el macho y los intersexos.



para cada punto y en cada dilución. En la fórmula, "a" es el porcentaje de células muertas correspondiente al punto en cuestión, "b" es el porcentaje de células muertas en el control positivo para la dilución en cuestión y "c" el porcentaje de células muertas en el control negativo. De esta forma, en cada dilución, el control positivo (porcentaje de células muertas cuando son tratadas con suero diluido aunque no absorbido, más complemento) representa el 0% de niveles de antígenos, y el control negativo (porcentaje de células muertas no tratadas) representa el 100% de tales niveles. Los resultados obtenidos en estos tests están recogidos en la tabla XI. Los valores medios, calculados a partir de estos resultados, muestran que en los machos los niveles de antígenos SDM oscila alrededor del $74.7\% \pm 8.3$, en las hembras es de $19.7 \pm 14.4\%$ y en los intersexos es de 67.6% con un valor mínimo de 65% .

Handwritten text, possibly a signature or name, appearing as a faint, illegible scribble.

DISCUSSION

DISCUSION

Aunque el tema central del presente trabajo es el estudio del fenómeno de reversión sexual que tiene lugar en determinados individuos de la población analizada, existen sin embargo otros aspectos de interés, tales como la variabilidad en la expresión NOR o las peculiaridades del proceso meiótico, que necesitan ser tratados en apartados separados, con objeto de evitar extensas desviaciones en el esquema de la discusión del tema principal.

VARIABILIDAD EN LA EXPRESION NOR

Las dos formas cariotípicas, correspondientes a macho y a hembra, encontradas en esta población de *T. occidentalis*, coinciden plenamente con las descritas anteriormente para esta especie (Jiménez y col. 1984a), por lo que respecta a las principales características de las mismas, tanto morfológicas como de bandeo.

En el estudio de los autosomas mediante distintas técnicas de bandeo cromosómico, uno de los hechos más destacables y poco frecuentes en mamíferos, es la presencia de un solo par de cromosomas portadores de regiones NOR en posición intersticial, lo que hace de esta especie un material idóneo para incidir en un tema objeto de numerosas investigaciones recientes. Se trata del estudio de la interrelación existente entre la presencia de constricción secundaria visible en tinción con giemsa en cromosomas mitóticos, la capacidad de tinción con plata de esta región y la actividad transcripcional de la misma en la interfase precedente.

El nitrato de plata se ha utilizado por los citogenetistas

para la tinción de las NORs, como un método adecuado para su localización en el cariotipo. Sin embargo, en los últimos años ha surgido una profunda controversia sobre el significado biológico de este tipo de tinción. Generalmente se ha admitido una correlación directa entre la tinción con plata y un estado transcripcionalmente activo de los genes ribosómicos. Esta idea ha sido apoyada por numerosos investigadores (ver Hubbell, 1985, como revisión). Sin embargo, varios autores rechazan esta interpretación basándose bien en estudios bioquímicos de inhibición de la síntesis del ARNr (Raman y Sperling, 1981; Goessens y Lepoint, 1982; Medina y col., 1983; Sánchez-Pina y col., 1984), o bien en la demostración de que no existe síntesis de ARNr en los NORs metafásicos, los cuales, a pesar de ello, mantienen su tinción argéntica (Hsu y col., 1965; Fan y Penman, 1971; Goessens y Lepoint, 1979; Fakan y Puvion, 1980; Mirre y Stahl, 1981; Risueño y col., 1982). Por otra parte, y de acuerdo con Sánchez-Pina y col. (1984), la inhibición de la transcripción no tiene efecto sobre la condensación de la cromatina de las NORs (constricciones secundarias visibles) por lo que los autores concluyen que la tinción argéntica realmente detecta cromatina NOR descondensada aunque sea transcripcionalmente inactiva. Medina y col. (1983) llegaron a conclusiones similares en sus investigaciones en células de plantas.

Nuestros resultados demuestran la existencia de una correlación positiva entre la tinción con plata de la NOR y la presencia de constricción secundaria visible (estado descondensado de la cromatina NOR), lo cual apoya claramente la idea de que tal estado descondensado es un requisito necesario para la impregnación argéntica, tal como concluyen Medina y col. (1983). Sin embargo, este requisito, aunque necesario, no parece ser suficiente. En nuestro análisis 13 células mostraban uno de los dos cromosomas del par 3 con

una constricción secundaria claramente visible y, sin embargo, no se había producido la tinción con plata.

King (1980) demostró la existencia de algunas constricciones secundarias en cromosomas de anfibios, cuya presencia era variable y no se teñían con nitrato de plata. El autor indica que estas constricciones secundarias son presumiblemente análogas a las constricciones despirilizadas inducidas por frío descritas por Rudak y Callan (1976) que no son portadoras de cistrones ribosómicos. Por lo tanto, parece deducirse que para que haya una tinción positiva con plata de las NORs, deberá ser necesario algo más que el estado descondensado de la cromatina.

Muchas investigaciones han demostrado una correlación directa entre la actividad NOR y la tinción argéntica (ver Hubbell, 1985). Además, aunque las NORs mitóticas son transcripcionalmente inactivas y la inhibición de la síntesis de ARNr con cicloheximida (CHM) no impide la tinción con plata (Medina y col. 1983), podría considerarse que la actividad transcripcional es ciertamente necesaria para conservar la capacidad de tinción argéntica, aunque en nuestra opinión, esto no deba de ocurrir necesariamente en el momento en el que el material es fijado y procesado en la técnica citogenética. Según Hubbell (1985), esta tinción podría poner de manifiesto determinados materiales atrapados durante la condensación cromosómica o bien una actividad génica residual (producción de ARNr) inferior al nivel susceptible de ser detectado por la técnicas bioquímicas usadas.

En conclusión, sobre la base de nuestros resultados y las tesis de los autores citados, nosotros sugerimos que para la tinción argéntica de las NORs mitóticas, existen por lo

menos dos requisitos previos:

- a) La cromatina NOR ha de estar en un estado descondensado.
- b) Estas NORs han de haber sido transcripcionalmente activas en la anterior interfase del ciclo celular.

Otro aspecto interesante es la variabilidad que muestran las regiones NOR frente a la tinción con fluorocromos de distinta especificidad. En principio, podemos hacer algunas consideraciones acerca de la composición nucleotídica de las NORs de *T. occidentalis*. La constancia en la tinción negativa con DAPI (fluorocromo que tiñe específicamente secuencias de ADN ricas en pares de bases A-T) y la tinción positiva, aunque variable, que muestran frente a la cromomicina A₃ (CMA) (específico para secuencias ricas en G-C) nos permite afirmar que las NORs de esta especie poseen secuencias ricas en pares de bases G-C organizadas en "clusters", o bien, que éstas han de estar presentes en una proporción significativamente mayor que las secuencias ricas en A-T.

Con respecto al variable comportamiento de las regiones NOR frente a la tinción con CMA, hay que tener en cuenta que solamente aparece tinción positiva en preparaciones tratadas con la técnica de triple tinción (Schweizer, 1980, 1981) aunque generalmente, solo uno de los cromosomas del par 3 da respuesta positiva a la tinción. Cuando las preparaciones son sometidas a la tinción simple de CMA con contratinción de distamicina A (DA), la respuesta es siempre neutra. Por lo tanto, no cabe duda de que la técnica empleada en la tinción deberá jugar un papel preponderante en esta variabilidad, probablemente debido al efecto de contratinción que también debe ejercer el DAPI en la tinción triple, el cual no está presente en la tinción simple.

Aparte de ésto, la variabilidad intracelular observada respecto a la respuesta de fluorescencia en tratamiento con CMA en la tinción triple, denota que el estado estructural y/o funcional del cromosoma representa también una importante causa de variabilidad en la tinción. Posiblemente, el estado de condensación y la actividad transcripcional de la cromatina NOR también pueda tener influencia en la capacidad de ésta para ligarse al fluorocromo, de una manera similar a como acabamos de ver que influye en la capacidad de impregnación argéntica.

ESTUDIO DE LA MEIOSIS

De los resultados obtenidos en el análisis citogenético al microscopio óptico de esta especie, dos fenómenos merecen ser destacados en la meiosis de los machos XY normales. Uno de ellos está relacionado con el comportamiento del bivalente sexual durante la profase meiótica, y el otro con la existencia de un particularmente frecuente fenómeno de polimeiosis. Estas dos particularidades, aunque también se han descrito en otros mamíferos como fenómenos anecdóticos, se presentan en *T. occidentalis* con frecuencias relativamente altas.

La obtención de células polinucleadas es posible mediante tratamiento con agentes químicos tales como el γ -hexaclorexano o la cafeína, que inhiben la citocinesis sin afectar la cariocinesis (Kihlman y Levan, 1949; Gonzalez-Fernandez, 1967). Este último autor ha investigado el comportamiento de las células polinucleadas en mitosis pero no en meiosis, como es el caso que nos ocupa. El comportamiento de células polinucleadas en meiosis, obtenidas mediante tratamiento con cafeína ha sido analizado por de la Peña y col. (1981) en *Secale cereale*.

Según nuestros resultados, se pueden dar dos posibles explicaciones para este fenómeno de polimeiosis:

a) alteración total o parcial del mecanismo que controla la citocinesis;

b) fusión celular.

Hay dos hechos que apoyan la primera posibilidad. En primer lugar, la existencia en la línea germinal de metafases mitóticas con un número de cromosomas múltiplo de $2n$ demuestra que la formación de células polinucleadas ocurre en un ciclo celular anterior a la meiosis. Sin embargo, en la línea somática no han aparecido células mitóticas con números cromosómicos múltiples. Todos los núcleos de una célula polinucleada son sincrónicos en el proceso de meiosis, presentando, tanto los bivalentes sexuales como los autosómicos, un mismo aspecto en los distintos núcleos.

Un fenómeno similar se ha descrito en hombres intervenidos de tuberculosis testicular o de cáncer de próstata (Sasaki, 1964), y en *Lagurus lagurus* y *Phodopus sungorus* (Pogosianz y Bruyako, 1969). Sin embargo, en ambos casos, el fenómeno se refirió como poliploidía y no como polimeiosis.

En nuestro estudio no se han detectado configuraciones multivalentes, aunque los núcleos de una misma célula están juntos y sincrónicos. Además, todas las metafases II derivadas de una célula polinucleada son resultado de anafases I normales. Todos estos hechos parecen indicar que la cariomixis ocurre en profase I, después de que la sinapsis cromosómica ya ha comenzado, probablemente tras la desorganización de la membrana nuclear.

Referente al bivalente sexual, la proporción de células

paquiténicas o cigoténicas en las que se puede apreciar la existencia de una vesícula sexual típica es aproximadamente del 1%, lo que en principio podría reflejar un bajo grado de diferenciación de los cromosomas sexuales, especialmente del X (Ohno, 1965; Ohno y Weiler, 1961), de acuerdo con la posición de los insectívoros en la escala evolutiva de los mamíferos.

Según las investigaciones de Lima de Faria y Jaworska (1968) y de Zakarov (1968) sobre la relación entre la heterocromatinización, el grado de condensación, tiempo de replicación y actividad funcional del cromosoma, podría asumirse que la condensación retrasada del segmento diferencial del cromosoma X, refleja un estado funcional activo en la profase meiótica. Casos similares a éste fueron encontrados en tres especies de hamsters, *Cricetus cricetus*, *Mesocricetus auratus* (Fredga y Santesson, 1964; Fraccaro y col., 1969) y *Phodopus sungorus* (Pogosianz, 1970).

Aparte de estas consideraciones, resulta interesante el estudio de las distintas configuraciones que adopta el cromosoma X durante la profase meiótica, bien en relación consigo mismo, o en relación con el cromosoma Y.

La observación de núcleos profásicos preparados por las técnicas citogenéticas convencionales (Ford y Evans, 1968; Meredith, 1969) para el estudio de la meiosis de mamíferos, ofrece pocas posibilidades en cuanto al establecimiento claro de las relaciones sinápticas entre ambos cromosomas sexuales, sobre todo en casos como el que nos ocupa, en que el cromosoma Y es de muy reducido tamaño. Únicamente es posible establecer la proporción de casos en que la asociación XY es de tipo terminal o lateral, aunque, como veremos seguidamente en el estudio de complejos sinaptonémicos, tales observaciones no reflejan

necesariamente diferencias de comportamiento sináptico entre las diferentes células, sino más bien, distintos estadios en dicho proceso sináptico no diferenciables al microscopio óptico.

Sin embargo, es posible extraer más información de la observación de las configuraciones que adopta en meiosis el segmento diferencial del cromosoma X. En nuestro estudio se han observado cuatro configuraciones diferentes: lineal, anillo simple, anillo doble y anillo múltiple. Este comportamiento sugería la posibilidad de que el cromosoma X fuese total o parcialmente un isocromosoma (Jiménez y col., 1984b), idea que se veía apoyada por el hecho de que el patrón de bandas G del mismo es simétrico respecto del centrómero. Las relaciones sinápticas entre los cromosomas X e Y y entre los dos brazos del cromosoma X, han sido objeto de un estudio mucho más profundo y detallado, en el análisis ultramicroscópico de los complejos sinaptonémicos.

La observación al microscopio electrónico de los espermatocitos de *T. occidentalis*, permite diferenciar distintos tipos celulares, en cada uno de los cuales el bivalente sexual presenta una morfología distinta y característica del mismo. Para una comprensión inequívoca y funcional de las relaciones sinápticas en dicho par sexual, era necesario, por lo tanto, llevar a cabo una caracterización precisa de cada una de las subetapas de las distintas fases de la profase meiótica, que permitiera obtener una visión cronológica de todo el proceso. Por esta causa, el primer paso en el estudio de los complejos sinaptonémicos fué el establecimiento de la subdivisión de cigotene y paquitene, es decir, aquellas fase en que existen complejos sinaptonémicos visibles en esta especie.

Greenbaum y col. (1986) llamaron la atención sobre la

necesidad del establecimiento de un criterio general para la subdivisión de cigotene y paquitene en mamíferos en varias subetapas, y proponen un esquema, principalmente basado en la progresión de la sinapsis autosómica. La aplicación de tal esquema a nuestro material da lugar a una subdivisión racional y útil de estas etapas. Además, el estudio del proceso sináptico en un nuevo taxón, (Talpidae, Insectivora), proporciona una documentación más amplia sobre la naturaleza y magnitud de la variabilidad en el mecanismo sináptico de los mamíferos.

La fácil distinción entre las distintas subetapas está garantizada por la observación combinada de varios aspectos en cada núcleo concreto, aunque algunas de las subetapas muestran características y apariencia muy similares. Así, la cigotene tardía es bastante parecida a la paquitene tardía en muchos aspectos, sobre todo a nivel de microscopía óptica. En ambas subetapas los complejos sinaptonémicos son largos, delgados y tenuemente teñidos y el nucleoplasma está generalmente cubierto de un fino precipitado de plata. Sin embargo, otras características de paquitene tardía (P_5), tales como 1) la ausencia de regiones asinápticas, 2) la estructura dispersa del nucleolo y 3) la morfología del bivalente sexual, permite discernir claramente entre ambas subetapas.

Moses (1980) en *Cricetulus griseus* y Greenbaum y col. (1986) en *Peromyscus*, establecen la subdivisión de la paquitene en cinco subetapas, a pesar de que para ello, centraron su atención en características diferentes. En nuestra opinión, tal subdivisión es también la más adecuada a las características de nuestro material, lo que parece indicar cierta uniformidad entre los diferentes taxones de mamíferos en relación con los hechos que tienen lugar durante la paquitene. Por el contrario, no parece ocurrir lo mismo con

relación a la cigotene.

La cigotene es probablemente la etapa menos uniforme de la profase meiótica, de acuerdo con las características descritas para diferentes especies. Estas diferencias atañen principalmente al inicio y progresión de la sinapsis, ya sea autosómica o de los cromosomas sexuales. Algunos autores (Moses, 1977a, 1980, en espermatoцитos de hamster chino; Speed, 1982 y Dietrich y Mulder, 1983, en ovario fetal de ratón; Dietrich y Boer, 1983, en espermatoцитos de ratón; Speed, 1985, en oocitos fetales humanos; y el presente estudio en el topo) solamente distinguen dos subetapas en cigotene, que generalmente son referidas como cigotene temprana y tardía. Sin embargo, las características de cada una de ellas son distintas en las diferentes especies analizadas.

Así, nuestras observaciones en cigotenes tempranas de espermatoцитos de topo son bastante diferentes de los de otras especies tales como *Peromyscus sp.* (Greenbaum y col., 1986), hamster chino (Moses 1977a) o ratón de laboratorio (Dietrich y Boer, 1983), en las que se han descrito extensas áreas de elementos axiales no sinapsados. De manera similar, tampoco hemos observado ningún núcleo cigoténico en el que los ejes del X y del Y no hubiesen comenzado ya el proceso sináptico. Estas diferencias pueden ser explicadas si asumimos que el proceso de sinapsis es muy rápido en el topo, lo que dificultaría mucho su observación, o bien que el ensamblaje de las moléculas que constituyen los ejes sinaptonémicos es más tardío en el topo que en otras especies, de manera que se forman incluso después de iniciada la sinapsis cromosómica. Esto implicaría que la formación previa de los elementos axiales no es un requisito esencial para el inicio de la sinapsis en esta especie.

En cualquier caso, estas diferencias reflejan una notable desigualdad entre los roedores estudiados y el topo, o quizás los insectívoros en general, en relación con el patrón de comportamiento en el inicio de la sinapsis. Posteriores investigaciones en otras especies de insectívoros podrán corroborar o descartar esta hipótesis.

La progresión de la profase meiótica según la observación de los complejos sinaptonémicos bien de espermatocitos o de oocitos de varias especies de mamíferos, muestra, respecto a la intensidad de la tinción o impregnación por plata del conjunto nucleoplasma-cromatina, un patrón constante y característico en cada etapa o subetapa. Es general la observación de que en cigotene temprana y en paquitene tardía, la tinción del nucleoplasma es más intensa que en midpaquitene siendo cigotene temprana y paquitene tardía las que muestran una tinción más intensa del nucleoplasma. El precipitado de plata en el nucleoplasma ha sido atribuido generalmente a la existencia de restos de cromatina que han quedado preservados en aquellas etapas de alta condensación cromosómica, tales como las paquitenes tardías (Moses 1977a). Sin embargo, su existencia en cigotene temprana o su ausencia en midpaquitene han sido insuficientemente discutidas hasta ahora.

Aparte de la tinción de la cromatina y de posibles artefactos técnicos, la tinción del nucleoplasma también puede obedecer, en nuestra opinión, a otras causas biológicas tales como la dispersión del nucleolo y el ensamblaje o desensamblaje de los ejes sinaptonémicos. Es sabido que los nucleolos sufren una dispersión progresiva desde cigotene hasta diplotene (ver Greenbaum y col., 1986), dando lugar de esta manera a un material granular muy fino con capacidad de teñirse con plata, que se disemina por todo el nucleoplasma. Esta es probablemente la causa de la mayor

parte de la tinción nucleoplasmática que aparece en paquitene tardía, pero no explicaría su observación en cigotene temprana ni su disminución en midpaquitene. En nuestra opinión esto puede ser debido a la presencia en el nucleoplasma de partículas protéicas destinadas a ensamblarse en la posterior formación de los ejes sinaptonémicos o los elementos axiales. Esta suposición es compatible con la ligera tinción de los complejos sinaptonémicos o los elementos axiales observados en cigotene temprana. En esta subetapa, todavía estarían incompletos y más delgados que en midpaquitene, donde el ensamblaje es completo, dando lugar a un nucleoplasma libre de precipitado argéntico. El proceso opuesto a éste, sería la causa de la ligera tinción de los complejos sinaptonémicos durante paquitene tardía.

En su esquema para la subdivisión de cigotene y paquitene, Greenbaum y col. (1986) consideraban la evolución de los nucleolos en *Peromyscus*, como un criterio interesante para el reconocimiento de cada una de las subetapas. Aunque el nucleolo de *T. occidentalis* muestra ciertamente una tendencia general a sufrir un proceso de fragmentación y dispersión conforme avanza la profase meiótica, no se puede establecer, sin embargo, un paralelismo preciso entre el estado del nucleolo y alguna subetapa concreta. Así, nucleos con características claramente paquiténicas pueden presentar menor grado de dispersión nucleolar que otros catalogables como cigoténicos. Por esta razón, pensamos que la evolución del nucleolo no es un buen parámetro para ser utilizado en la subdivisión de las etapas de la profase meiótica en espermatocitos de *T. occidentalis*.

El proceso de sinapsis entre los cromosomas X e Y de esta especie también ofrece varios aspectos de gran interés. El más destacado de ellos es el hecho de que el cromosoma Y

sinapsa en toda su longitud con el segmento aparante del X, incluida la región centromérica de aquel, formándose además un complejo sinaptonémico de aspecto totalmente normal. Este hecho supone, de una parte el apareamiento homólogo entre los segmentos apareantes del X e Y, y de otra, un apareamiento supuestamente no homólogo entre ambos segmentos diferenciales, lo cual representa un claro ejemplo de apareamiento heterólogo y ajuste sináptico, que puede ser sumado a los numerosos casos que han sido descritos en otras especies en investigaciones precedentes (Ashley y col., 1981; Davisson y col., 1981; Moses y Poorman, 1981; Poorman y col., 1981 a y b; Moses y col., 1982; Speed, 1985). Este ajuste sináptico es evidente en la región centromérica del Y, donde no hay homología entre ambos cromosomas sexuales. Es de esperar que la región de sinapsis homóloga esté situada en el extremo distal del X y del Y puesto que, de lo contrario, un posible entrecruzamiento daría lugar a productos cromosómicos aberrantes (segmentos acéntricos y dicéntricos) que no se han observado en las preparaciones citogenéticas.

Otro resultado que apoya que la sinapsis entre los elementos diferenciales del Y y del X sea heteróloga es el retraso en la terminación de la sinapsis X-Y con respecto a la sinapsis autosómica. Aunque ambos se inician simultáneamente en Z_2 , la sinapsis X-Y no se completa hasta P_2 . Además, el segmento del Y que aparee tardíamente con el X, sufre generalmente un proceso de engrosamiento mientras no está sinapsado. Un proceso similar afecta a determinados segmentos autosómicos que aparean tardíamente, tales como el brazo corto heterocromático de la pareja 16, que también muestra engrosamiento (Fig. 12d).

Speed (1985) sugiere que el retraso o fallo en el apareamiento podría estar relacionado con un estado de

inactividad genética y/o replicación tardía. Como consecuencia, también estaría relacionado con el engrosamiento e intensa tinción de los ejes correspondientes a estos segmentos cromosómicos. En nuestra opinión, estas características también podrían ser un reflejo de apareamiento heterólogo en los cromosomas sexuales de *T. occidentalis* y, probablemente, un mecanismo para evitar el entrecruzamiento en esta región de apareamiento no homólogo.

En relación con el comportamiento del resto del segmento diferencial del cromosoma X no apareado con el Y, no cabe duda de que el hecho más llamativo es el proceso de autoapareamiento que tiene lugar desde las primeras subetapas de la paquitene (P_1 y P_2) hasta P_3 . Paralelamente a este proceso, tiene lugar un fenómeno de engrosamiento y aumento de la heteropicnosis, que culmina con la aparición de estructuras adyacentes a los ejes del cromosoma X, en forma de excrecencias y anastomosis que, en paquitene tardía, confieren al bivalente sexual un alto grado de complejidad.

Este proceso de engrosamiento y aumento de la heteropicnosis de los ejes es un fenómeno comúnmente observado en células paquiténicas tanto de oocitos como espermatoцитos, cuando tales ejes se encuentran asinapsados. Este es el caso del segmento diferencial del cromosoma X de la mayoría de los mamíferos analizados (Speed y Chandley, 1983; Chandley, 1984; Speed, 1985).

El autoapareamiento de los elementos axiales no es un fenómeno nuevo. Este ha sido descrito previamente tanto para el cromosoma X como para univalentes autosómicos en una variedad de situaciones en donde falta el cromosoma homólogo correspondiente, por ejemplo, el cromosoma X de machos XO de *Drosophila* (Cooper, 1964), ratones XO (Speed, 1986a) y

ciertos saltamontes (John y Lewis, 1965), en haploides del tomate (Menzel y Price, 1966) y la cebada (Sadasivaiah u Kasha, 1971; Gillies, 1974), y en *Lilium* (Moens, 1968; Holm, 1977), trigo (Holboth, 1981), *Psammomys obesus* (Ashley y col., 1981), *Bombyx* (von Wettstein y col., 1984), maiz (Gillies, 1983) y *Tradescantia* (Hasemkamf, 1984). En todas estas situaciones, el complejo sinaptonémico formado en la autosinapsis era indiferenciable del formado entre cromosomas homólogos.

Esto nos revela un primer punto de contraste en relación con nuestras observaciones, ya que el segmento diferencial del X de *T. occidentalis*, sufre el proceso de engrosamiento incluso cuando se encuentra autosinapsado.

En oocitos de ratones XO (Speed, 1986), la iniciación del autoapareamiento del univalente X puede ocurrir al azar en diversos sitios del mismo, progresando siempre hacia los telómeros. Cuando tal autoapareamiento se inicia en posición central, da lugar a configuraciones características en forma de horquilla o doble anillo, mientras que si el comienzo del mismo está desplazado hacia uno de los telómeros, se puede originar una variedad de estructuras parcialmente autoapareadas, en las cuales los segmentos asinápticos se engruesan y vuelven heteropicnóticos o bien interfieren en la sinapsis de los complejos autosómicos.

Aquí encontramos un segundo punto de discordancia entre el comportamiento de tales univalentes X de ratones XO y el segmento diferencial del X del topo, ya que en éste, el comienzo y la progresión del autoapareamiento sigue un proceso radicalmente contrario. La autosinapsis se inicia entre la región telomérica libre (no apareada con el Y) y la región intersticial del X donde se acaba el segmento de apareamiento X-Y, extendiéndose posteriormente hacia el

interior del bucle formado hasta cerrarlo por completo.

Otro aspecto interesante es el momento en que se inicia la autosinapsis del segmento diferencial del X. Ha sido ampliamente aceptada la afirmación de diversos autores que que la cigotene es aquella fase en donde únicamente se produce sinapsis entre regiones cromosómicas homólogas (Moses, 1977; von Wettstein y col., 1984). Esta regla general tiene, sin embargo, algunas excepciones en especies donde se ha demostrado apareamiento heterólogo durante la cigotene (Speed, 1986; Holm, 1977; Holboth, 1981; Hasenkamf, 1984). En *T. occidentalis*, la sinapsis homóloga entre el X y el Y tiene lugar durante la cigotene y de forma sincrónica con la de los bivalentes autosómicos. Sin embargo, el autoapareamiento del segmento diferencial del X no comienza hasta después del inicio de la paquitene (P_1 o P_2).

El aspecto que más nos interesa del autoapareamiento del cromosomas X, es discutir la posibilidad de que existan regiones homólogas en ambos brazos del mismo, o dicho en otras palabras, la posibilidad de que su origen sea el de un isocromosoma.

Los resultados obtenidos nos ofrecen razones a favor y en contra de tal hipótesis. De una parte, el engrosamiento de los ejes sexuales y el retraso de su autosinapsis en relación con los autosomas y con el segmento de homología XY, son características generales del apareamiento heterólogo (Moses, 1977b); Rasmussen, 1977; Ashley, 1983; Ashley y col., 1983). Sin embargo, en ciertas especies como el lemur (Moses y col., 1979) y *Rattus norvegicus* (Joseph y Chandley, 1984), en las cuales el apareamiento entre el X y el Y se retrasa claramente hasta midpaquitene, los ejes de ambos cromosomas aparecen extremadamente engrosados antes de la sinapsis. Por otra parte, el análisis ultramicroscópico

de los complejos sinaptonémicos de los machos de esta especie, ofrece algunos aspectos que apoyan esta hipótesis. En este sentido es importante resaltar la constancia en el sitio de iniciación del proceso de autoapareamiento. En ningún caso se ha observado que dicho autoapareamiento se lleve a cabo por un proceso diferente al descrito anteriormente, iniciándose siempre entre el extremo libre del X y la zona proximal al segmento de apareamiento con el Y. Esta observación contrasta con la realizada en otras especie, donde el univalente X o Y se autoaparea por diversos sitios aparentemente determinados por el azar. Por otra parte, es interesante tener en cuenta que nuestras observaciones se han hecho en espermatoцитos de machos fértiles, carentes de algún tipo de alteración cromosómica visible, en contraposición con los casos de autoapareamiento descritos por otros autores en otras especies, en que las circunstancias eran anormales de una u otra forma (individuos XO, haploides, aneuploides, etc...). En todos estos casos el autoapareamiento se produce en elementos univalentes, carentes de otro cromosoma con el que llevar a cabo un apareamiento homólogo normal. El caso de *T. occidentalis* se produce pues en individuos normales, en los que existen ambos cromosomas sexuales.

De este comportamiento y de la comparación con otros casos de la bibliografía, parece desprenderse que, si no en toda su longitud, ciertas regiones de los brazos del cromosoma X pueden mantener algún grado de homología, al menos en el sitio de iniciación del autoapareamiento, si bien el resto de los brazos cromosómicos podrían secundar un apareamiento heterólogo.

Por último, Mahadevaiah y col. (1988) han demostrado muy recientemente que el autoapareamiento de los univalentes X de ratones portadores de la mutación "Sxr" se ve favorecida

por la presencia de la mutación. Este hecho introduce una última posibilidad en cuanto al origen del proceso de autosinapsis del cromosoma X de *Talpa occidentalis*, y es que pueda estar originada por la presencia en el mismo de algún tipo de mutación, la cual, como discutiremos posteriormente, llevaría a la aparición de mutantes similares a los descritos en el ratón para la mutación *Sxr*.

REVERSION SEXUAL

Según Eicher y Washburn (1986), se pueden considerar dos tipos de reversión sexual, tanto en el caso de hembras con constitución cromosómica XY, como en el de machos XX:

a) Aquellos en los cuales haya en el cariotipo delección o presencia de secuencias de ADN relacionadas con la diferenciación testicular, aunque éstas no sean citológicamente detectables. En el caso de machos XX, estas secuencias podrían estar translocadas a uno de los cromosomas X o a un autosoma. En el caso de hembras XY se trataría de un Y anormal por delección de dichas secuencias.

b) Verdaderas reversiones sexuales, condición resultante de una mutación en un locus, ya sea ligado al cromosoma X, al Y o a un autosoma, la cual puede modificar el proceso normal de diferenciación sexual.

En relación con los resultados observados en nuestro estudio de *T. occidentalis*, es conveniente destacar cinco características principales:

1) Todos los especímenes estudiados en este trabajo fueron capturados en una población natural.

2) Hembras normales, intersexos y algunos machos (sexo revertido) presentan idéntica constitución de cromosomas sexuales, 34,XX.

3) Los intersexos muestran ovotestes con tamaño variable y diferencias en la cantidad relativa de tejidos testicular y ovárico, pero idénticos niveles de antígenos masculinos SDM.

4) Los machos XX y los intersexos no muestran actividad espermatogénica.

5) La frecuencia de individuos afectados en esta población es relativamente alta (0.27).

Cualquier hipótesis que se proponga con el fin de explicar el origen de la reversión sexual en *Talpa occidentalis*, deberá contemplar necesariamente todos estos hechos de la forma más simple posible y a la luz de los conocimientos que existen en la actualidad sobre el determinismo genético y la diferenciación del sexo en mamíferos.

Se ha considerado de forma general que la presencia del cromosoma Y es necesaria para el desarrollo del fenotipo masculino en mamíferos. Sin embargo, se han descrito diversos casos en donde esta norma general no se cumple. Reversión sexual en individuos XX que externamente presentan fenotipo masculino han sido descritos esporádicamente en distintas especies: cabras (Soller y Angel, 1964; Generke, 1964, 1967; Hard y Eisen, 1965; Hard, 1967; Somlev y col., 1970), perros (Selden y col., 1978), ratón de laboratorio (Cattanach y col., 1971) y humanos (Therkelsen, 1964; de la Chapelle y col., 1964, 1981; Cout-Brown y col., 1965; De Grouchy y col., 1967, etc...).

La gran mayoría de estos trabajos son puramente

descriptivos, habiéndose profundizado en la etiología de la reversión del sexo exclusivamente en humanos y en ciertas cepas de ratones de laboratorio, sin que exista hasta ahora concordancia en cuanto a los resultados y la interpretación de los mismos en los diferentes casos.

Por lo que respecta a la especie humana, son muy numerosos los casos descritos de reversión sexual de hombres con constitución cromosómica 46,XX. Sin embargo, las lógicas trabas éticas con que se encuentra la investigación en este campo, hacen que el estado actual de conocimientos sobre el mismo, sea aún insuficiente para poder determinar su etiología.

Los varones 46,XX presentan normalmente una estatura inferior a la media e inferior a la de sus progenitores, así como un menor desarrollo dental, pequeños testículos, esterilidad y anormal desarrollo de las características sexuales secundarias (de la Chapelle, 1972). Su incidencia es de uno entre cada 20.000-25.000 hombres (Burgoyne, 1984). Aunque en algunos casos se ha descrito un comportamiento sexual normal, la totalidad de los varones XX son estériles y muestran alteraciones de mayor o menor grado en la estructura histológica y la funcionalidad de sus gónadas.

Desde el punto de vista histológico, los testículos de los varones XX muestran túbulos seminíferos de escaso diámetro, en cuyo interior solo se observan células de tipo Sertoli, faltando las células germinales (espermatogonias y espermatocitos). La lámina propia de los tubos seminíferos está considerablemente engrosada por acumulación de fibras elásticas (de la Chapelle, 1981).

Actualmente, el caso de reversión sexual de machos XX mejor estudiado es el de una cepa de ratones de laboratorio

conocido como mutantes "Sxr" (Cattanach y col., 1971; Bennet y col., 1977; Tres, 1978; Winsor y col., 1978; Chandley y Fletcher, 1980; McLaren, 1980; Evans y col., 1980; Singh y Jones, 1982; Evans y col., 1982; McLaren y Monk, 1982; Cattanach y col., 1982; McLaren y col., 1984; Chandley y Speed, 1987; Mahadevaiah y col., 1988). Cattanach y col. (1971) describen la existencia de machos XX y XO en el ratón de laboratorio. En ambos casos, los individuos son estériles y portadores de pequeños testículos, aunque el aspecto histológico de los mismos es casi normal, con túbulos seminíferos cuyo diámetro es solo ligeramente inferior al de los machos normales, en los cuales existen células germinales (espermatogonias). Estas comienzan el proceso meiótico, pero éste se interrumpe a nivel de espermatocito primario, resultando finalmente estériles. La lámina propia es de aspecto normal y la cantidad de tejido intersticial es solo ligeramente superior a la de los machos XY.

La anatomía de los machos XX de *T. occidentalis* presenta similitudes y diferencias con respecto a los casos anteriormente comentados. Desde el punto de vista fenotípico externo, tienen apariencia normal de macho, igual que ocurre en el hombre y en el ratón. Sin embargo, internamente muestran alteraciones aún más severas que las descritas para estas especies. En comparación con el caso de los ratones Sxr, los machos XX de topo muestran una mayor atrofia testicular. El tamaño del testículo está sumamente reducido y el estudio histológico revela un alto grado de disgenesia, de manera que sus gónadas son muy similares a las presentes en estadios fetales indiferenciados.

El hecho de que los dos machos XX analizados en este estudio fuesen individuos jóvenes, nos indujo a pensar que este mínimo desarrollo de los testículos, podría ser consecuencia directa de la corta edad, y no tanto de su constitución

cromosómica. Sin embargo, el análisis histológico de diversos machos XY cariotípicamente normales y de edades semejantes a la de los machos XX, demostró que existen claras diferencias entre ambos tipos, sobre todo en el desarrollo de los túbulos seminíferos. Por otra parte, hay que destacar el hecho de que el aspecto histológico de los testículos de los machos XX es indiferenciable del que muestra la porción testicular de los ovotestes en los intersexos. Por lo tanto, resulta evidente que la atrofia testicular que sufren los machos XX de esta población, debe ser atribuida a su condición genética.

Cattanach y col. (1971) demostraron mediante estudios de herencia que en las cepas Sxr de ratón de laboratorio, existen machos XY portadores de la mutación capaces de transmitirla a la descendencia. Estos machos portadores XY,Sxr se caracterizan fenotípicamente por poseer testículos cuyo peso medio es inferior al de los machos normales XY no portadores. Esta cualidad fenotípica permite reconocer a estos machos mediante una simple palpación del animal y sin necesidad de llevar a cabo la disección del mismo, lo que representa una gran ventaja en el estudio genético de la mutación Sxr, ya que facilita extraordinariamente su selección.

La observación de un alto grado de variabilidad en los machos XY de nuestra población de *T. occidentalis* nos indujo a pensar que, posiblemente, también en esta especie podrían existir machos portadores de la mutación causante de la reversión sexual, que expresasen una disminución significativa del peso testicular. La demostración de tal hipótesis presenta dificultades adicionales cuando se trabaja con animales procedentes directamente de una población natural, puesto que en estas condiciones, no se conocen "a priori" determinados parámetros tales como la

edad, o el grado de actividad sexual en función de la estación climatológica, los cuales pueden conducir a conclusiones erróneas. Para salvar esta inconveniente se llevó a cabo una caracterización lo más completa posible de todos los machos analizados, mediante la estimación de parámetros tales como el peso testicular, diámetro de los túbulos seminíferos, histología testicular, peso corporal, niveles de producción de espermatozoides, edad relativa, cariotipo, bandeo G, medidas craneales y fecha de captura.

Los resultados obtenidos en este estudio nos demuestran claramente que existen dos causas fundamentales de variabilidad en el peso testicular, como muestra la figura 17. En primer lugar, la edad permite establecer dos grupos de individuos claramente diferenciados: machos jóvenes y adultos. Por su parte, los machos jóvenes, probablemente nacidos durante el invierno, muestran un bajo peso testicular durante toda la primavera y el verano y alcanzan la madurez sexual a principios del otoño, uniendo su curva a la de los machos adultos. Estos machos jóvenes poseen testículos que muestran la histología normal de una gónada inmadura, aunque no atrofiada, lo cual descarta definitivamente la supuesta existencia de una anomalía genética.

En segundo lugar, nuestros resultados demuestran también la existencia de un ciclo estacional de actividad sexual que provoca claras variaciones en el peso testicular de los machos adultos, por lo que tales diferencias podrían no ser atribuibles a supuestas diferencias genéticas entre los distintos machos, sino más bien a la diferente época de captura de cada uno de ellos.

Podemos concluir, por tanto, que aunque nuestros resultados no permiten negar la existencia de machos portadores de la

mutación, tales individuos, en caso de existir, pueden quedar enmascarados por la variabilidad en el peso testicular que muestran los machos normales, como consecuencia de la variación estacional, lo cual dificulta evidentemente su detección.

Una variabilidad estacional similar a ésta, también ha sido observada en cuanto al tamaño y desarrollo del útero en hembras e intersexos, lo que parece demostrar que ambos tipos de individuos son similares en relación con su capacidad y respuesta hormonal.

Por el contrario, la variabilidad detectada en los ovotestes de los intersexos parece obedecer a una etiología diferente. Dicha variabilidad se manifiesta en dos sentidos: el tamaño y la composición de tejidos testicular y ovárico.

Con relación al tamaño, nuestros resultados infieren que los intersexos de mayor edad poseen ovotestes que muestran pequeñas diferencias de peso, mientras que en los más jóvenes, estas variaciones son mucho más acentuadas. En otras palabras, podemos decir que los ovotestes deberán sufrir cambios, a lo largo de la vida del animal, que tiendan a conseguir un tamaño más o menos homogéneo en los ovotestes de todos los individuos de edad avanzada.

En cuanto a la histología de estas gónadas, parece deducirse que solo los individuos de edad adulta alcanzan un alto grado de desarrollo en la porción ovárica del ovoteste, desarrollo que alcanza niveles cercanos a los de las hembras normales. En estos ovotestes, la porción testicular está generalmene bastante reducida. Por el contrario, los ovotestes de individuos jóvenes, presentan escaso desarrollo de la porción ovárica y una muy variable proporción de tejido testicular.

Todos estos acontecimientos quedarían explicados si asumimos que paralelamente al avance de la edad del animal, tienen lugar dos acontecimientos: 1) la porción testicular va reduciéndose paulatinamente como consecuencia del adverso ambiente hormonal en que se encuentra, y 2) la porción ovárica va adquiriendo, por el contrario, un paulatino desarrollo que la lleva a alcanzar características similares a las de un ovario de una hembra adulta.

McLaren (1980) demuestra que los oocitos presentes en testículos de machos XX,Sxr de ratón, relativamente abundantes en los primeros días postparto, degeneran rápidamente, de modo que al cabo de pocas semanas han desaparecido por completo, lo cual, a primera vista, parece contradecir nuestra hipótesis. El autor asume que tal degeneración se produce como consecuencia del adverso ambiente hormonal en que se encuentran los oocitos en el momento en que el macho que los porta en sus testículos, comienza el proceso de madurez sexual. Sin embargo, esta aparente contradicción no lo es si tenemos en cuenta varios aspectos:

1) En los machos XX,Sxr de ratón, los oocitos se encuentran aislados e inmersos en la trama de túbulos seminíferos del testículo (de aspecto casi normal), mientras que en los ovotestes de los intersexos de *T. occidentalis*, los oocitos están localizados en una porción ovárica de aspecto aparentemente normal, claramente delimitada y separada de la porción testicular (de características disgenésicas);

2) En el caso de los ratones XX,Sxr, los individuos son fenotípicamente machos, mientras que los intersexos de topo, son fenotípicamente hembras;

3) Finalmente, el ambiente hormonal que rodea a los oocitos

de los machos XX, Sxr de ratón es claramente adverso pues tales individuos probablemente produzcan andrógenos, mientras que, como acabamos de ver, los intersexos parecen mostrar respuestas hormonales similares a los de las hembras, que indudablemente favorecerá el desarrollo de la porción ovárica de los ovotestes.

De esta forma, y refiriéndonos de nuevo al caso de los intersexos de *T. occidentalis*, un ovoteste juvenil de gran tamaño (cuyo volumen estaría ocupado principalmente por la porción testicular), tendería a reducir su volumen total ya que la disminución de la porción testicular será preponderante sobre el incremento de la porción ovárica. De manera contraria, un ovoteste joven de pequeño tamaño tenderá a aumentar su volumen total pues aquí el crecimiento de la porción ovárica será más importante que la disminución de la porción testicular. Desde este punto de vista, los resultados de la figura 22 son fácilmente comprensibles.

Futuros estudios probablemente lleguen a demostrar que determinados intersexos puedan alcanzar un grado de desarrollo en la porción ovárica de sus ovotestes que les permita tener alguna tasa de fertilidad, lo que indudablemente supondría una aportación de gran interés.

Esta variabilidad, en relación con la edad, de la cantidad relativa del tejido ovárico presente en los ovotestes, contrasta con la estabilidad de los niveles relativos de antígenos SDM (antígenos masculinos detectados serológicamente) encontrados en los intersexos.

Aunque la idea originaria de que el antígeno H-Y (antígenos masculinos detectados mediante tests de histoincompatibilidad tisular) es el inductor de la diferenciación hacia testículo del primordio gonadal es

actualmente poco consistente (McLaren y col., 1984). Sin embargo, la relación existente entre los niveles de antígeno SDM (Silvers y col., 1982) y el grado de desarrollo testicular permanece fuera de duda.

Nuestros resultados siguen apoyando esta relación. Los machos XX de *T. occidentalis*, que presentan en sus gónadas tejido testicular exclusivamente, muestran niveles de antígeno SDM similares a los de los machos normales fértiles, lo que pone de manifiesto que en estos individuos, la reversión del sexo ha sido completa, tanto a nivel histológico como serológico. Por otra parte, el caso de los intersexos XX es de más difícil interpretación ya que, presentando estos individuos diferentes cantidades relativas de tejidos testicular y ovárico, siempre muestran niveles de antígeno similares, muy próximos a los de los machos. A lo largo de su vida, en estos intersexos parece ocurrir una paulatina feminización al ir aumentando la cantidad de tejido ovárico de sus ovotestes y disminuyendo en relación a ella, la cantidad de tejido testicular. Sin embargo, los niveles de antígeno SDM permanecen constantes. Además, el comportamiento de los órganos sexuales de estos animales, como por ejemplo los cambios estacionales en el tamaño del útero, nos inducen a pensar en un ambiente hormonal típicamente femenino. Esto nos lleva a la conclusión de que el tejido testicular de las gónadas de estos intersexos, conservando aún un acusado carácter embrionario, no está lo suficientemente diferenciado como para inducir un ambiente hormonal masculino.

En esta situación en que la diferenciación sexual masculina se encuentra bloqueada al no haber podido completarse ésta, probablemente porque los niveles de antígeno SDM son insuficientes, puede proseguir la diferenciación del sexo constitutivo, es decir, el femenino, dando lugar a la

progresiva feminización de la gónada a la que aludíamos anteriormente. Este proceso viene a demostrar que los niveles de antígeno SDM se determinan antes de que la gónada se haya diferenciado, apoyando un cierto papel de este antígeno en la diferenciación sexual.

La presencia de gónadas con distinta cantidad de tejidos testicular y ovárico ha sido detectada en hermafroditas de distintas especies de mamíferos, incluida la humana. En ciertos casos, los individuos portadores de tales gónadas eran mosaicos para la constitución de cromosomas sexuales, por ejemplo XO/XY o XO/XY/XYY (Eicher y col., 1980). Siendo la gónada más o menos masculina en función de la proporción de células portadoras de cromosoma Y.

Por otra parte, y como hemos indicado antes, la existencia de machos, intersexos y hembras con constitución cromosómica sexual XX, ha sido descrita y profundamente estudiada en los mutantes Sxr de ratón. Aunque en un principio los estudios de herencia llevados a cabo por Cattanaach y col. (1971) con estos mutantes, llevaron a los autores a considerar que la causa de tal reversión era una mutación autosómica dominante, más recientemente, estudios citogenéticos (Evans y col., 1982) y moleculares (Singh y Jones, 1982), han demostrado que el origen de tal mutación es la presencia, en uno de los cromosomas X de los individuos de sexo revertido, de un fragmento del cromosoma Y (factor Sxr). Este factor Sxr pasa desde el cromosoma Y al X mediante un entrecruzamiento regular que tiene lugar en la meiosis de los machos portadores XY,Sxr, los cuales presentan en su cromosoma Y dos copias de tales secuencias masculinizantes Sxr.

Este mismo origen de reversión sexual ha sido demostrado en el caso un hombre XX, aunque la mutación es aquí

citológicamente inapreciable (de la Chapelle y col., 1984). Sin embargo, el propio autor admite que en otros casos no se pueden rechazar otras posibles alternativas, tales como mutaciones génicas, translocación(es) Y-autosoma(s) o pequeñas deleciones en el cromosoma X (de la Chapelle, 1981).

En *Talpa*, los cromosomas X de los machos XX o de los intersexos, no presentan ninguna diferencia citogenéticamente apreciable con los cromosomas X de las hembras o los machos normales, a pesar de que dicho estudio comparativo se ha realizado utilizando distintas técnicas de marcado cromosómico, como se describe en los resultados.

Por otra parte, el cromosoma Y no resulta marcado diferencialmente con ninguna de las técnicas de bandeo cromosómico utilizadas, lo que, unido a su pequeño tamaño, dificulta la detección de una posible translocación de la totalidad o parte de dicho cromosoma Y a algún autosoma o al cromosoma X, aunque, en cualquier caso, esto no implica que no haya podido ocurrir.

Otros estudios que pudiesen aportar alguna evidencia de la presencia del cromosoma Y en los machos XX o en los intersexos, fueron los estudios de meiosis. Tras comprobar que los individuos afectados son totalmente carentes de actividad espermatogénica, nuestra atención se centró en la espermatogénesis de los machos fértiles XY. El interés estaba en encontrar entre estos individuos, alguno que tuviese un comportamiento meiótico semejante al de los machos portadores XY,Sxr de ratón, o bien alguna particularidad en el proceso sináptico del par sexual que nos indujese a considerar un posible intercambio especial entre ambos cromosomas sexuales.

Nuestros resultados, tal como hemos discutido anteriormente, no permiten sospechar la presencia de material propio del cromosoma Y asociado al X o a algún autosoma.

De cualquier forma, parece razonable admitir que tanto los machos XX como los intersexos (en su amplia variabilidad), deben representar diferentes expresiones fenotípicas de una misma mutación que tuviese la capacidad de expresarse con mayor o menor rigor.

Dos posibles alternativas podrían explicar esta hipótesis: a) No disyunción mitótica de los cromosomas sexuales en los primeros estadios del desarrollo, lo que originaría mosaicos para dichos cromosomas, y b) localización de la mutación en el cromosoma X, lo que permitiría que dicha mutación pudiera verse afectada por el fenómeno de inactivación de este elemento en los individuos XX. Por otra parte, parece evidente que los individuos mutantes provienen de embriones potencialmente hembras, como se deduce del hecho de que la relación de cariotipos XY:XX (machos normales : hembras+intersexos+machos XX) es 76:54, proporción que se ajusta a la 1:1 ($\chi^2=3.72$, $p=0.05$), mientras que la proporción de sexos ♂:♀ es 76:18, la cual se aleja significativamente de la 1:1 ($\chi^2=35.78$, $p=0.05$).

Cattanach y col. (1982) y McLaren y Monk (1982) llevaron a cabo análisis genéticos en ratones XX que portaban en uno de ellos el factor Sxr y en el otro una translocación del cromosoma 16 (individuos T16H/X,Sxr). En estos animales, el X portador del factor Sxr se mantiene en estado inactivo en todas las células y, sin embargo, los individuos se pueden desarrollar como machos XX, intersexos o hembras fértiles. De estos resultados se puede deducir que, aunque el cromosoma X está inactivado, el factor Sxr puede escapar de la inactivación en un porcentaje variable de células. De

este modo, el desarrollo fenotípico sexual de estos individuos dependerá de la proporción de células que porten el factor Sxr activo. Los autores postulan la existencia de un umbral mínimo en la proporción de células con poder masculinizante, que ha de ser superado para que el animal alcance el desarrollo testicular, de manera que por debajo del mismo se produciría un desarrollo femenino y en sus proximidades se producirían intersexos. Según estos autores, tal umbral estaría situado en el ratón alrededor del 30% de células Sxr activas.

La existencia en nuestra población de *T. occidentalis* de intersexos que muestran características similares a las de los descritos en experimentos con ratones Sxr (constitución cromosómica XX y presencia de ovotestes), nos hace sospechar que el factor causante de la reversión sexual, aunque no es citológicamente detectable, debe estar localizado sobre uno de los cromosomas X de tales intersexos. Esto permitiría explicar la ocurrencia de distintas expresiones fenotípicas de una misma información genética, en base a las diferentes proporciones relativas de cromosomas X, portadores de la mutación, que se encuentran en estado activo o inactivo. Cuando en un embrión indiferenciado desde el punto de vista sexual, el número de células que portan dicho factor en estado activo está justo en el umbral que delimita el paso de desarrollo femenino al masculino, el individuo se desarrollará como un intersexo. Si esta proporción es más baja, el desarrollo será de hembra, y si es más alta, de macho.

De los tests serológicos realizados en nuestro material podemos deducir que, asumiendo que los niveles de antígenos SDM estén en relación directa con la proporción de células que portan el factor de reversión sexual en estado activo, los intersexos se producirían cuando esta proporción de

células fuese superior al 65% (tabla XI) y no alrededor del 30% como se ha postulado para el ratón. Si la inactivación de los cromosomas X se produce al azar, la proporción de células con el factor causante de la reversión sexual en estado activo, sería normalmente del 50%, lo que llevaría a un desarrollo fenotípico de hembra. Ahora bien, entre los 54 animales XX analizados, 34 son intersexos y dos son machos XX, lo que parece indicar que la inactivación de dicho factor no es al azar. Esto supondría que, bien existe una inactivación preferencial del X no portador del factor de reversión, o bien que éste puede escapar de la inactivación del X en que está localizado.

Tal como indicamos anteriormente, la observación de las diferentes configuraciones que puede adoptar el segmento diferencial del cromosoma X durante la profase meiótica de espermatocitos de esta especie, junto con el patrón de bandas G de dicho cromosoma X, nos hace sospechar en un posible origen de isocromosoma parcial para este elemento. Este comportamiento del X nos permite poder plantear un esquema alternativo que explique la producción de intersexos y de machos XX, basándonos en un reciente modelo para el determinismo genético del sexo, que a su vez se basa en la inactivación del cromosoma X (Chandra, 1985b). La demostración de que no todas las especie poseen mayor cantidad de secuencias Bkm en el cromosoma Y que en el X (ratón), sino en que algunas de ellas esta cantidad es similar en ambos cromosomas sexuales (humanos) (Singh y Jones, 1982), permitió a Chandra (1985b) a emitir un nuevo modelo para el determinismo genético del sexo en mamíferos, en el cual juega un papel fundamental el proceso de inactivación del los cromosomas X en las hembras, de manera que éstas solo tienen una sola copia de estas secuencias en estado activo, mientras que en los machos habría dos.

TABLA XI.— Estimación de los niveles de antígeno SDM en cada uno de los individuos incluidos en los tests de citotoxicidad representados en las Figs. 27 (test 1), 28 (test 2) y 29 (test 3).

	INDIVIDUO	NIVELES DE ANTIGENO SDM (%)				MEDIA (%)
		DILUCIONES DEL SUERO ANTI-SDM				
		1/2	1/4	1/8	1/16	
TEST 1	♂ 1	65	81	87	83	79
	♂ 2	51	92	77	70	72.5
	♂ 3	65	65	58	52	60
	♂ XX	60	81	68	83	73
	♀ 1	6	22	10	4	10.5
TEST 2	♂ 4	82	75	78	87	80.5
	♀ 1	67	73	74	84	74.5
	♀ 2	57	66	65	73	65.3
	♀ 2	7	7	6	-	6.6
TEST 3	♂ 5	75	84	74	91	83.5
	♀ 3	65	75	71	87	74.5
	♀ 4	54	-	68	75	65.6
	♀ 3	33	41	-	37	37
	♀ 4	27	36	45	-	36
	♀ 5	-	5	5	6	5.6
	♀ 6	10	20	29	34	23.2

- : datos omitidos por considerarse anómalos.

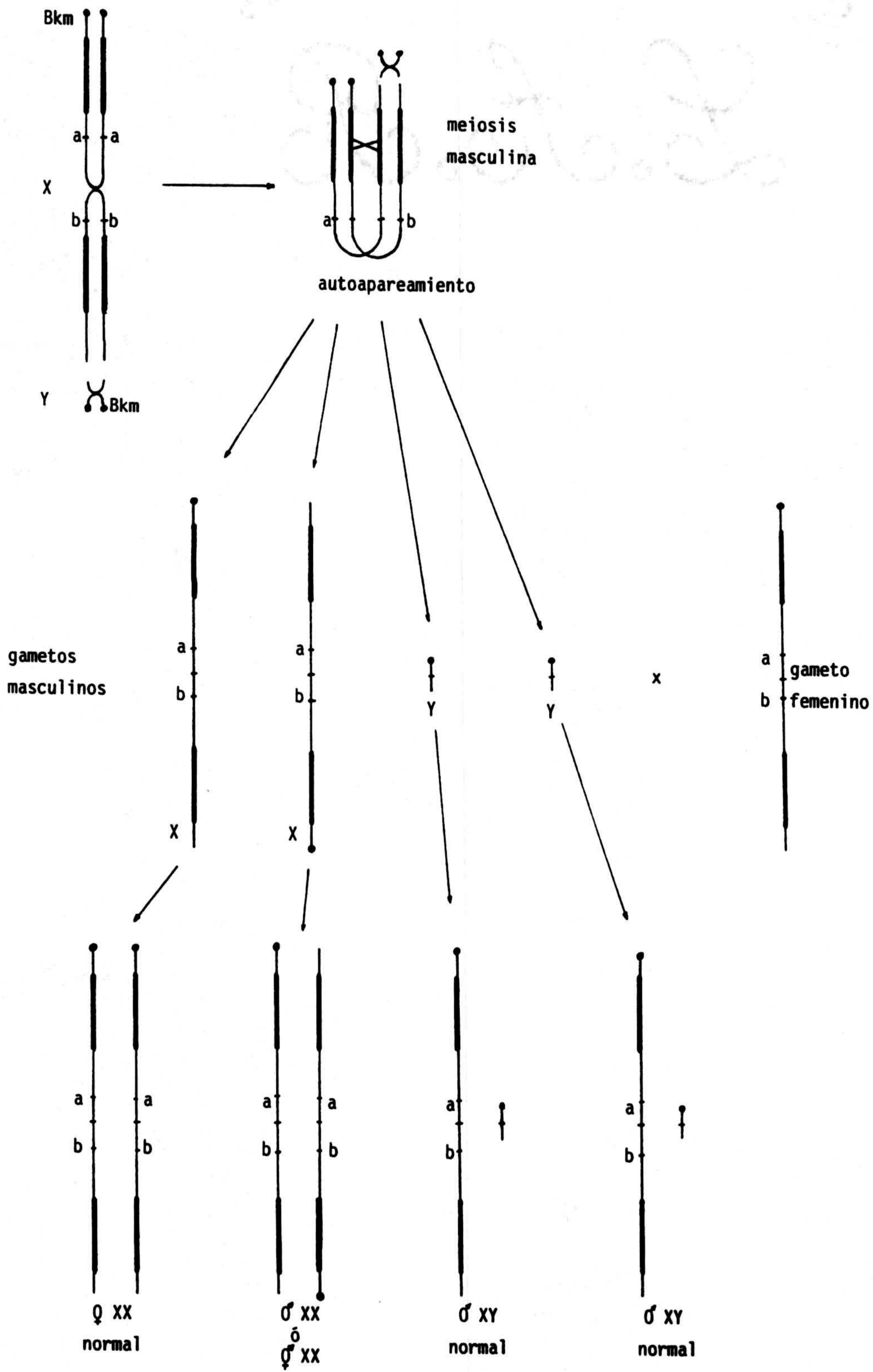
Aplicando este modelo a nuestro caso (fig. 30) y teniendo en cuenta el carácter del cromosoma X del topo, el autoapareamiento de éste permitiría en ciertos casos la formación de un quiasma que tendría como consecuencia que cierta información genética relacionada con el sexo (secuencias masculinizantes, siguiendo a Chandra), sufriría un cambio de posición respecto a los brazos cromosómicos y/o a otros marcadores genéticos que le permitiría escapar de la inactivación. En aquellos cigotos que llevasen un X recombinante y otro no recombinante, aunque la inactivación de los cromosomas X sea al azar, se podría alcanzar una proporción de células con secuencias masculinizantes activas, suficiente para desarrollar intersexos o machos XX. Un fenómeno de escape de la inactivación por efecto de posición, similar al que acabamos de postular, ha sido demostrado por McLaren (1984) en ratones Sxr, en donde la inactivación del X no se extiende al fragmento Sxr cuando está presente el alelo *b* de la *Pgk-1*, haciéndolo en mayor proporción cuando está presente el alelo *a*.

Hasta ahora y a lo largo de esta discusión, hemos analizado dos modelos distintos como posible origen de un fenómeno de reversión sexual, en función de nuestros resultados en *T. occidentalis*. El primero de ellos se basa en el esquema del proceso que da lugar a la reversión sexual en ratones XX portadores de la mutación Sxr. El segundo analiza las posibles implicaciones que podría tener el autoapareamiento del cromosoma X de *Talpa* durante la profase meiótica.

Ya sea un origen basado en el modelo "Sxr" de ratón, o en el que acabamos de ver, relacionado con el autapareamiento del cromosoma X en la meiosis, la producción de cromosomas X mutantes se realizaría a base de procesos de recombinación entre X e Y o del X consigo mismo, respectivamente, lo que facilita la producción de cromosomas X mutantes en una

Fig. 30.- Representación esquemática del modelo hipotético propuesto para el origen del fenómeno de reversión sexual en *Talpa occidentalis* (Ver texto).





frecuencia relativamente alta, hecho que no sería explicable mediante una simple mutación recurrente. Por otra parte, y en relación con la transmisión de la mutación, hemos de recordar que ciertos intersexos podrían alcanzar cierto grado de fertilidad, como consecuencia del desarrollo secundario del tejido ovárico.

Handwritten notes at the top of the page, including a list of items and a signature.

CONCLUSIONES

Handwritten notes at the bottom of the page, including a signature.

CONCLUSIONES

- 1) La respuesta de las regiones NOR a la tinción argéntica depende del estado descondensado de su cromatina y del grado de actividad transcripcional de la misma durante la interfase precedente.
- 2) En base a su respuesta al tratamiento con fluorocromos de distinta especificidad, se puede concluir que las regiones NOR de *Talpa occidentalis* están constituidas por ADN rico en pares de bases G-C. La respuesta positiva con CMA depende, no obstante, del tipo de contratinción empleada y del estado de condensación de la región NOR.
- 3) El fenómeno de polimeiosis detectado en la espermatogénesis de esta especie tiene su origen en la formación de células polinucleadas, como consecuencia de fallos en el mecanismo que controla la citocinesis.
- 4) La cariomixis de éstas células ocurre en profase I, después de iniciada la sinapsis, de modo que ésta no se ve alterada, permitiendo así una meiosis correcta en todos los núcleos y no perturbándose, por tanto, la fertilidad de los machos.
- 5) El estudio ultramicroscópico de los complejos sinaptonémicos de *Talpa occidentalis* permite constatar la existencia de diferencias apreciables con respecto a otras especies de mamíferos en relación a los procesos de inicio y progresión de la sinapsis, que tienen lugar en cigotene.
- 6) Los cromosomas sexuales de esta especie llevan a cabo un apareamiento homólogo entre el extremo distal de uno de los brazos del cromosoma X y uno de los brazos del cromosoma Y, y un apareamiento de tipo heterólogo, con ajuste sináptico,

que comprende toda la región centromérica y el otro brazo del cromosoma Y.

7) Los resultados de los estudios citogenéticos, tanto de la mitosis como de la meiosis, así como el análisis ultramicroscópico de los complejos sinaptonémicos, aportan diversas pruebas que apoyan un origen de isocromosoma, al menos parcialmente, para el cromosoma X de *T. occidentalis*.

8) La variabilidad detectada en el peso testicular de los machos normales XY de esta población depende de factores como la edad y la estación climatológica y demuestra la existencia de un ciclo estacional de actividad sexual que provoca la esterilidad de todos los machos durante el verano.

9) Las alteraciones anatómicas e histológicas que muestran los machos XX de esta especie obedecen a un origen genético y son independientes de variables tales como la edad o la estación climatológica.

10) El desarrollo uterino de los intersexos sigue un ciclo estacional similar y paralelo al que afecta al desarrollo testicular de los machos XY.

11) El volumen de los ovotestes que poseen los intersexos es independiente de los ciclos estacionales y muestra una tendencia a hacerse más homogéneo conforme avanza la edad del animal.

12) La porción ovárica de los ovotestes de los intersexos de mayor edad alcanza un grado de desarrollo similar al de un ovario de una hembra normal, lo que abre la posibilidad de que algunos de estos individuos puedan alcanzar la fertilidad en algún momento de su vida.

13) Todos los intersexos tienen niveles parecidos de antígeno SDM, independientemente del volumen de sus ovotestes y de la relación de tejido testicular y ovárico que posean éstos.

14) Estos niveles de antígeno SDM son intermedios entre los de macho y hembra, aunque siempre localizados más próximos a los de macho.

15) Los estudios serológicos e histológicos de los individuos afectados permiten concluir que se trata de una anomalía que afecta a la diferenciación sexual primaria, originando gónadas con un grado de diferenciación insuficiente para conseguir el desarrollo de machos funcionalmente normales.

16) La expresión gradual del proceso de reversión sexual, que se manifiesta por la existencia de machos XX y de intersexos con diferente grado de masculinidad, apoya fuertemente la posibilidad de que el factor causante de la misma esté localizado en uno de los dos cromosomas X de estos individuos de modo que fuese susceptible de verse afectado por el proceso de inactivación.



BIBLIOGRAFIA

Adinolfi, M., Polani, P. y Zenthon, J., 1982: Genetic control of H-Y antigen synthesis. A hypothesis. Hum. Genet. 61:1-2.

Ashley, T., 1983: Non homologous synapsis of the sex chromosomes in the heteromorphic bivalents of two X-7 translocations in male mice. R5 and R6. Chromosoma 88: 178-183.

Ashley, T., Moses, M.J. y Solari, A.J., 1981: Fine structure and behaviour of a pericentric inversion in the sand rat, *Psammomys obesus*. J. Cell Sci. 50:105-119.

Ashley, T., Russell, L.B. y Cacheiro, N.L.A., 1983: Synaptonemal complex analysis of two X-7 translocations in male mice: R2 and R6 quadrivalents. Chromosoma 88:171-177.

Bennett, D., Boyse, E.A., Lyon, M.F., Mathieson, B.J., Scheid, M. y Yanagisawa, K., 1975: Expression of H-Y (male) antigen in phenotypically female Tfm/Y mice. Nature 257:236-238.

Bennett, D., Mathieson, B.J., Scheid, M., Yanagisawa, K., Boyse, E.A., Wachtel, S. y Cattanach, B.M., 1977: Serological evidence for H-Y antigen in Sxr,XX sex-reversed phenotypic males. Nature 256:255-257.

Billinghan, R.E. y Silvers, W.K., 1959: Inbred animals and tissue transplantation immunity. Transplant. Bull. 6:339-406.

Boczkowski, K., 1971: Sex determination and gonadal differentiation in man. Clin. Genet. 2:379-386.

Bridges, C.B., 1925: Sex in relation to chromosomes and genes. *Amer. Natur.* 59:127.

Bridges, C.B., 1932: The genetics of the sex in *Drosophila*. In sex and internal secretions (1st edition), pp. 59-93. The Willianes and Wilkeing Co. Baltimore.

Bulatova, N.S. y Rajabli, S.I., 1974: Trypsin-banding procedure for avian chromosomes. *J. Hered.* 65:188.

Burgos, M., Jiménez, R. y Díaz de la Guardia, R., 1986: A rapid, simple and reliable combined method for G-banding mammalian and human chromosomes. *Stain Technology* 61(5):257-260.

Burgos, M., Jiménez, R. y Díaz de la Guardia, R., 1988: Y-chromosomes responsible for sex reversal y X-Y females of *Microtus cabreræ*. Enviado para publicación a *Cytogenet. Cell Genet.*

Burgoyne, P., 1984: The origins of men with two X chromosomes. *Nature* 304:109.

Burgoyne, P.S., Lay, E.R. y McLaren, A., 1986: Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen. *Nature* 320:170-173.

Buys, H.C.M. y Osinga, J., 1982: A relation between G-, C- and N-band patterns as revealed by a progressive oxidation of chromosomes, and a note on the nature of N-bands. *Genetica* 58:3-9.

Cabrera, A., 1914: Fauna Iberica. Mamíferos. Ed. por Museo Nac. Cienc. Nat. Madrid.

Cantwell, G., Jonhston, E.F. y Zeller, J.H., 1958: The sex chromomatin of swine intersexes. *J. Hered.* 49:199-202.

Castro-Sierra, E. y Wolf, V., 1968: Studies on the male meiosis of *Ellobius lutescens* Th. Cytogenetics 7:241-248.

Cattanach, B.M., Pollard, C.E. y Hawkes, S.G., 1971: Sex reversed mice XX and XO males. Cytogenetics 10:318-337.

Cattanach, B.M., Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. y Barlow, J., 1982: Male, female and intersex development in mice of identical chromosome constitution. Nature 300:445-446.

Celada, F. y Welshous, W.J., 1963: Genetics 48:139.

Cole, C.I. y Leavens, C.R., 1971: Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique. Herpetol. rev. 3:T 102.

Cooper, K.W., 1964: Meiotic conjunctive elements not involving chiasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 52:1248-1255.

Counce, S.J. y Meyer, G.F., 1983: Differentiation of the synaptonemal in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy. Chromosoma (Berl.) 44:231-253.

Court Brown, W.M., Harnden, D.G., Jacobs, P.A., Maclean, N. y Mantle, D.J., 1965: Abnormalities of sex chromosome complement in man. Med. Res. Conc. Special Report Series, Nº 305.

Chandley, A.C., 1984: Infertility and chromosome abnormality. In: Clarke J.R. (ed) Oxford reviews of reproductive biology. Oxford Univ. Press. Oxford, pp:1-46.

Chandley, A.C. y Fletcher, J.M., 1980: Meiosis in Sxr male mice. I. Does a Y-autosome rearrangement exist in the sex-reversed (Sxr) mice ?. Chromosoma 81:9-17.

Chandley, A.C. y Speed, R.M., 1987: Cytological evidence that the Sxr fragment of XY,Sxr mice pairs homologously at meiotic prophase with the proximal testis-determining region. *Chromosoma* 95:345-349.

Chandra, H.S., 1984: A model for mammalian male determination based on a pasive Y chromosome. *Mol. Gen. genet.* 139:384-388.

Chandra, H.S., 1985a: Sex determination: A hypothesis based on noncoding DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:1165-1169.

Chandra, H.S., 1985b: Is human X chromosome inactivation a sex-determining device?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:6943-6949.

Chandra, H.S., 1986: X chromosomes and dosage compensation. *Nature* 319:18.

Chapelle de la A., 1972: Analytic review: nature and origin of males with XX sex chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 24:71-105.

Chapelle dela A., 1981: The etiology of malenes in XX men. *Hum. Genet.* 58:105-116.

Chapelle de la A., Hortling, H., Niemi, M. y Wennström, J., 1964: XX sex chromosomes in a human male. first case. *Acta. Med. Scan. (suppl)* 412:25-38.

Chapelle de la A., Schröder, J., Murros, J. y Tallquist, G., 1977: Two XX males in one family and additional observations bearing on the etiology of XX males. *Clin. Genet.* 11:91-106.

Chapelle de la A., Simola, K., Simola, P., Knuutila, S., Gahmberg, N., Pajunen, L., Lundquist, G., Sarna, S. y

Murros, T., 1979: Heteromorphic X chromosomes in 46,XX males?. Hum. Genet. 52:157-167.

Chapelle, de la A., Tippett, P.A., Westterstrand, G. y Page, D., 1984: Genetic evidence of X-Y interchange in a human XX male. Nature 307:170-171.

Chapelle de la A., Koo, G.C. y Wachtel, S.S., 1978: Recessive sex-determining genes in human XX male syndrome. Cell 15:837-842.

Darlington, C.D., 1931: Meiosis. Biol. Revs. Biol. Proc. Cambridge Phil. Soc. 6:221-264.

Darlington, C.D., 1932: Recent advances in cytology. Churdril. London, (Existe una edición más reciente, 1965, actualizada con una segunda parte: 1937-1964.)

Davisson, M.T., Poorman, P.A., Roderick, T.H. y Moses, M.J., 1981: A pericentric inversion in the mouse. Cytogenet Cell Genet 30:70-76.

De Grouchy, J., Cannivet, J., Canlorbe, P., Mantel, O. y Pottont, M., 1967: Deux observations d'hommes 46,XX. Ann. Génét. 10:193-200.

De la Peña, A., Puertas, M.J. y Merino, F., 1981: Bimeiosis induced by caffeine. Chromosoma 83:241-248.

Díaz de la Guardia, R., Burgos, M. y Jiménez, R., 1984: Hembras fértiles de constitución XY en *Microtus cabreræ*. XX Jornadas Luso-Españolas de Genética. Salamanca.

Dietrich, A.J.J. y Mulder, R.J.P., 1981: The staining of the synaptonemal complex for light microscopy study in the mouse. Stain Technol. 56,3:163-167.

Dietrich, A.J.J. y Boer, P.de, 1983: A sequential analysis of the development of the synaptonemal complex in spermatocytes of the mouse by electron microscopy using hydroxiurea and agar filtration. *Genetica* 61:119-129.

Dietrich, A.J.J. y Mulder, R.J.P., 1983: A light- and electron microscopic analysis of the meiotic prophase in female mice. *Chromosoma* 88:377-385.

Dresser, M.E. y Moses, M.J., 1979: Silver staining of synaptonemal complexes in surface spreads for light and electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 121:416-419.

Dresser, M.E. y 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 and silver staining. *Chromosoma (Berl.)* 76:1-22.

Dutrillaux, B. y Lejeune, J., 1971: Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 272:2638.

Eicher, E.M., Beamer, W.G., Washburn, L.L. y Whitten, W.K., 1980: A cytogenetic investigation of inherited true hermaphroditism in BALB/cwt mice. *Cytogenet Cell Genet.* 28:104-115.

Eicher, E.M. y Washburn, L.L., 1983: Inherited sex reversal in mice: identification of a new primary sex-determining gene. *J.Exp. Zool.* 228:297-304.

Eicher, E.M. y Washburn, L.L., 1986: Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann. Rev. Genet.* 20:327-360.

Eichwald, E.J. y Silmser, C.R., 1955: Comunication. Transplant. Bull. 2:148-149.

Engel, W.B., Kleinme y Ebrecht, A., 1981: Serological evidence for H-Y antigen in XO female mice. Hum. Genet. 57:68-70.

Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. y Brown, B.B., 1980: Meiosis in Sxr male mice. II. Further absence of cytological evidence for a Y-autosome rearrangement in Sex-reversed (Sxr) mice. Chromosoma 81:19-29.

Evans, E.P., Burtenshaw, M.D. y Cattanach, B.M., 1982: Meiotic crossing-over between the X and the Y chromosomes of male mice carrying the sex-reversing (Sxr) factor. Nature 300:443-445.

Evans, H.J., Buckton, K.E., Spowart, G. y Carotherrs, A.D., 1979: Heteromorphic X chomosomes in 46,XX males: Evidence for the involvement of X-Y interchange. Hum. Genet. 49:11-31.

Facan, S. y Puvieu, E., 1980: The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. Int. Rev. Cytol. 65:255-300.

Fan, H. y Penmon, S., 1971: Regulation of synthesis and processing of nucleolar component in metaphase arrested cells. J. Mol. Biol. 59:27-42.

Fletcher, J.M., 1979: Light microscope analysis of meiotic prophase chromosomes by silver staining. Chromosoma 72:241-148.

Ford, C.E. y Evans, E.P., 1968: Meiotic preparation from mammalian testes. En K. Benirschke ed.: Comparative

Mammalian Cytogenetics pp. 461-464. (Springer Verlag, Berlin)

Fraccaro, M., Gustavsson, I., Hulten, M., Lindsten, J. y Tepolo, M., 1969: Late-replicating Y-chromosome in spermatogonia of the Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). Cytogenetics 8:263-271.

Fredga, K. y Santesson, K.B., 1964: Male meiosis in Syrian, Chinese and European hamsters. Hereditas 52:36-48.

Fredga, K., Gropp, A., Winking, H. y Frank, F., 1976: Fertile XX and XY type female in the wood lemming *Myopus schisticolor*. Nature 261:225-228.

Fredga, K., Gropp, A., Winking, F. y Frank, F., 1977: A hypothesis explaining the excepcional sex ratio in the wood lemming (*Myopus schisticolor*). Hereditas 85:101-104.

Gallimore, P.H. y Richardson, C.R., 1973: An improbeb banding technique exemphified in the karyotype analysis of the two strains of rats. Chromosoma 41:259-263.

Generke, W.K., 1964: The karyotype of a gonadal male pig intersex. Sth. Afr. J. Sci. 60:347-351.

Generke, W.K., 1967: Cytogenetical investigations on normal and malformed animals, with special reference to intersexes. Duderstepoort J. red. Sci. 34:219-300.

Gillies, C.B., 1974: The nature and extent of synaptonemal complex formation in haploid barley. Chromosoma 48:441-453.

Gillies, C.B., 1983: Ultrastructural studies of the association of homologous and non-homologous parts of chromosomes in the mid-prophase of meiosis in *Zea mays*. Maydica XXVIII:265-287.

Gilmore, D.G., 1967: Histocompatibility antigen in the heterogametic sex in the chicken. *Transplantation* 5:609-709.

Goessens, G. y Lepoint, A., 1979: The nucleolus Organizing Regions (NOR's). Recent data and hypothesis. *Biol. Cell* 35: 211-220.

Goessens, G. y Lepoint, A., 1982: Localization of Ag-NOR-proteins in Ehrlich tumour cell nucleole. *Biol. Cell* 43:139-142.

González-Fernández, A., 1967: Formación y desarrollo de células binucleadas: bimitosis. *Genet. Ibérica* 19:1-98.

Greenbaum, I.F., Hale, D.W. y Fuxa, K.P., 1986: The mechanism of autosomal synapsis and the substaging of zygonema and pachynema from deer mouse spermatocytes. *Chromosoma (Berl.)* 93:203-212.

Gropp, A., 1969: Cytologic mechanisms of karyotype evolution in insectivores. En "Comparative Mammalian Cytogenetics", pp. 247-266. Ed. por K. Benirschke, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Hamerton, J.L., 1968: Significance of sex chromosome derived heterocomatin in mammals. *Nature* 219:910-914.

Hard, W.L. y Eisen, J.D., 1965: Phenotypic male swine with female karyotype. *J. Hered.* 56:255-258.

Hard, W.L., 1967: The anatomy and cytogenetics of male pseudohermaphroditism in swine. *Anat. Rec.* 157:225.

Hartmann, M., 1939: *Geschlecht und Geschlechtsbestimmung im Tier-und Pflanzenreich*. Walter de Gruyter, Berlin. (Existe una traducción en español por H. Enríquez, 1961. El sexo y

su determinación en animales y vegetales. UTEHA Mexico, 134 p.)

Hasenkampf, C.A., 1984: Synaptonemal complex formation in pollen mother cells of *Tradescantia*. *Chromosoma* 90:275-284.

Hildermann, W.H., Morgan, L. y Frantnick, 1970: Transplantation Proc. 2:24.

Hobolth, P., 1981: Chromosome pairing in allohexaploid wheat var Chinese Spring. Transformation of multivalents into bivalents, a mechanism for exclusive bivalent formation. *Carlsberg Res. Commun* 46:129-173.

Holm, P.B., 1977: Three-dimensional reconstruction of chromosome pairing during the zygotene stage of meiosis in *Lilium longiflorum* (Thunb). *Carlsberg Res. Commun* 42:103-151.

Howell, W.M. y Black, D.A., 1980: Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014-1015.

Hsu, T.C., Arrighi, F.E., Klevecz, R.R. y Brinkley, B.R., 1965: The nucleoli in mitotic divisions of mammalian cells in vitro. *J. Cell Biol.* 26:539-553.

Hsu, T.C., 1974: Procedures for inducing C-bands and G-bands in mammalian chromosomes. *Mammal. Chrom. Neusl.* 15:88-96.

Hsu, T.C. y Patton, J.L., 1969: Bone marrow preparations for chromosome studies. En " *Comparative Mammalian Cytogenetics*. pp. 454-460. Ed. por K. Benirschke, Springer Verlag. Heidelberg. New York.

Hubbell, H.R., 1985: Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technology* 60(5):258-294.

Jiménez, R., 1982: Estudio comparativo de los cariotipos en algunos generos del Orden Insectivora. Memoria de Licenciatura. Fac. Ciencias Universidad de Granada.

Jiménez, R., Burgos, M. y Díaz de la Guardia, R., 1984a: Karyotype and chromosome banding in the wole (*Talpa occidentalis*) from the South-East of the Iberian Peninsula. Implications on its taxonomic position. *Caryologia* 37(3):253-258.

Jiménez, R., Burgos, M. y Díaz de la Guardia, R., 1984b: Meiotic behaviour of sex chromosomes and polymeiosis in three species of insectivores. *Genetica* 65:187-192.

Jiménez, R., Burgos, M. y Díaz de la Guardia, R., 1988: A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 60:125-127.

John, B. y Lewis, K.R., 1965: The meiotic system. *Protoplasmatologia* 6:1-335.

Joseph, A.M. y Chandley, A.C., 1984: The morphological sequence of XY pairing in the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Chromosoma* 89:381-386.

Jost, A., 1947: Recherche sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin III. Prôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl.* 36:271-315.

Jost, A., 1960: Hormonal influence in the sex development of bird and mammalian embryos. En "Sex différenciation and development (C.R. Austin, editor), pp. 49-61. Cambridge Univer. Press London.

Kasdan, R., Nankin, H.R., Troen, P., Wald, N., Pan, S. y Yanaihara, T., 1973: Paternal transmission of maleness in XX human beings. *N. Engl. J. Med.* 288:539-545.

Keller, K. y Tandler, J., 1917: Über das Verhalten der Eihäute bei Zwillingsfruchtigkeit des Rindes. *Wien. tierarztl. Mschr.* 3:513-527.

Kihlman, B. y Levan, A., 1949: The cytological effect of caffeine. *Hereditas* 35:109.

King, M., 1980: C-banding studies on Australian Hylid frogs: secondary constrictions structure and the concept of euchromatin transformation. *Chromosoma (Berl.)* 80:191-217.

Koo, G.C., Wachtel, S.S., Krupen-Brown, K., Mittl, L.R., Breg, W.R., Genel, M., Rosenthal, I.M., Borgaonkar, D.S., Miller, D.A., Tantravahi, R., Schreck, R.R., Erlanger, B.F. y Miller, O.J., 1977: Mapping the locus of the H-Y gene on the human Y chromosome. *Science* 198:940-942.

Lee, M.R. y Elder, F.F.B., 1980: Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations. *Cytogenet. Cell Genet.* 26:36-40.

Lillie, F.R., 1917: The freemartin: A study of the action of sex hormones in the foetal of cattle. *J. Exp. Zool.* 23:371-422.

Lima de Faria, A. y Jaworska, H., 1968: Late DNA synthesis in heterochromatin. *Nature* 127:138-142.

Lyon, M.F., 1986: X chromosomes and dosage compensation. *Nature* 320:313.

Lyon, M.F., Cattanach, B.M. y Charlton, H.M., 1981: *Mechanisms of sex differentiation in mammals* (ed. C.R.

Austin and R.G. Edwards), pp. 329-386. New York: Academic Press.

Madan, K. y Walker, S., 1974: Possible evidence for Xp+ in an XX male. *Lancet* I:1223.

Mahadevaiah, S., Setterfield, L.A. y Mittwoch, U., 1988: Univalent sex chromosomes in spermatocytes of Sxr-carrying mice. *Chromosoma* 97:145-153.

Matthey, R., 1964: Etude sur les chromosomes d'*Ellobius lutescens* Th. (Mammalia-Muridae-Microtinae). II Informations complementaires sur les divisions meiotiques. *Rev. Suisse Zool.* 71:401-410.

McClung, C.E., 1901: Notes on the accessory chromosomes. *Anat. Anz.* 20:220.

McClung, C.E., 1902: The accessory chromosome-sex-determinant?. *Biol. Bull.* 2:43-84.

McLaren, A., 1980: Oocytes in testis. *Nature* 283:688-689.

McLaren, A. y Monk, M., 1982: Fertile females produced by inactivation of an X chromosome of "sex-reversed mice". *Nature* 300:446-448.

McLaren, A., Simpson, E., Tomonari, K., Chandler, Ph. y Hogg, H., 1984: Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312:552-555.

Medina, F.J., Risueño, M.C., Sánchez-Pina, M.A. y Fernández-Gómez, M.E., 1983: A study on nucleolar silver staining in plant cells. The role of argyrophilic proteins in nucleolar physiology. *Chromosoma (Berl.)* 88:149-155.

- Melvold, R.W., Kohn, H.I., Yergarian, G. y Fawcett, D.W., 1977: Evidence suggesting the existence of two H-Y antigens in the mouse. *Inmunogenetics* 5:33-41.
- Mendel, G. (27-IX-1870): Gregor Mendel's letters to Carl Nägeli. *Genetics* 35, Suppl. (1950) 24-26.
- Menzel, M.Y. y Price, J.M. 1966: Fine structure of synapsed chromosome in F_1 *Lycopersicoides esculentum*-*Solanum Lycopersicoides* and its parents. *Am. J. Bot.* 53:1079-1086.
- Meredith, R., 1969: A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testes. *Chromosoma (Berl.)* 12:254-258.
- Miller, G.S., 1912: Catalogue of the mammals of Western Europe. Trust. Brit. Museum. London.
- Minowada, S., Kowayashi, K., Isurugi, K., Fukatani, K. Ikeuchi, H., Hasegana, T. y Yamada, K., 1979: Two XX-male Brothers. *Clin. Genet.* 15:399-405.
- Mirre, C. y Stahl, A., 1981: Ultrastructural organization, sites of transcription and distribution of fibrillar centres in the nucleolus of the mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 48:105-126.
- Mittwoch, U., 1983: Heterogametic sex chromosomes and the development of the dominant gonad in vertebrates. *Amer. Naturalist.* 122:159-180.
- Moens, P.B., 1968: The structure and function of the synaptonemal complex in *Lilium longiflorum* sporocytes.
- Moses, M.J., 1977a: Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). I.

Morphology of the autosomal complement in spread preparations. *Chromosoma* (Berl.) 60:99-125.

Moses, M.J., 1977b: Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of Chinese hamster (*Cricetulus griseus*). II. Morphology of the XY pair in spread preparations. *Chromosoma* 60:127-137.

Moses, M.J., 1980: New cytogenetic studies on mammalian meiosis. En "Serio, M. Martini, L. (Ed.) Animal models in human reproduction. Raman Press, New York pp. 169-190.

Moses, M.J., Kavatsis, P.A. y Hamilton, A.E., 1979: Synaptonemal complex analysis of heteromorphic trivalents in lemur hybrids. *Chromosoma* 70:141-160.

Moses, M.J. y Poorman, P.A., 1981: Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangements. II. Synaptic adjustment in a tandem duplication. *Chromosoma* 81:519-535.

Moses, M.J., Poorman, P.A., Roderick, T.H. y Davisson, M.T., 1982: Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangement. IV. Synapsis and synaptic adjustment in two paracentric inversions. *Chromosoma* 84:457-474.

Muller, J.H., 1932: Some genetic aspects of sex. *Amer. Natur.* 66:118-138.

Nicolis, G.L., Hsu, L.Y., Sabetghadam, R., Kardon, N.B., Chernay, P.R., Mathur, D.P., Rose, H.G., Hirschhorn, K. y Gabrilove, J.L., 1972: Klinefelter's syndrome in identical twins with the 46,XX chromosome constitution. *Am. J. Med.* 52:482-491.

Ohno, S., 1965: A phylogenetic view of the X chromosome in man. *Ann. Genet.* 8:3.

- Ohno, S., 1967: Sex chromosomes and sex-linked genes. Springer-Verlag, Berlin, X+192p.
- Ohno, S., 1969: Evolution of sex chromosomes in mammals. *Ann. Rev. Genet.* 3: 495-524.
- Ohno, S., 1976: Major regulatory genes for mammalian sexual development. *Cell* 7:315-321.
- Ohno, S. y Weiler, C., 1961: Sex-chromosomes behaviour pattern in germ and somatic cells of *Mesocricetus auratus*. *Chromosoma* 12:362-373.
- Ohno, S., Nagai, Y. y Ciccarese, S., 1978: Testicular cells lysostripped of H-Y antigen organize ovarian follicle-like aggregates. *Cytogenet. Cell Genet.* 20:351-364.
- Ohno, S., Nagai, I., Ciccarese, S. y Iwata, H., 1979: Testis-organizing H-Y antigen and the primary sex-determining mechanism of mammals. *Rec. Progr. Horm. Res.* 35:449.
- Palutke, W.A., Chen, Y. y Chen, H., 1973: Presence of brightly fluorescent material in testes of XX males. *J. Med. Genet.* 10:170-174.
- Pogosianz, H.E., 1970: Meiosis in the Dzungarian hamster I. General pattern of male meiosis. *Chromosoma* 31:392-403.
- Pogosianz, H.E. y Bunyako, E.T., 1969: Polyploid cells in mammalian meiosis. *Genetika* 5:176-178.
- Polani, P.E., 1962: Sex chromosome anomalies in man. Pages 73-139 in J.L. Hamerton, ed. *Chromosomes in medicine*. Heinemann, London.

Poorman, P.A., Moses, M.J., Davisson, M.T. y Roderick, T.H., 1981a: Synaptonemal complex analysis of the mouse chromosomal rearrangement III. Cytogenetic observations on two paracentric inversions. *Chromosoma* 83:419-429.

Poorman, P.A., Moses, M.J., Russell, L.B. y Cacheiro, N.L.A., 1981b: Synaptonemal complex analysis of mouse chromosomal rearrangement I. Cytogenetic observations on a tandem duplication. *Chromosoma* 81:507-518.

Quack, B. y Noel, B., 1977: The XY chromosome pair in mouse and human spermatocytes visualized by silver-staining. *Nature* 264:431-433.

Raman, R. y Sperling, K., 1981: Patterns of silver staining on NOR's of prematurely condensed chromosomes following RNA inhibition. *Exp. Cell Res.* 135:373-378.

Rasmussen, S.W., 1977: Chromosome pairing in triploid females of *Bombyx mori* analyzed by tree-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes. *Carlsberg Res. Commun* 42:163-197.

Risueño, M.C., Medina, F.J. y Moreno Díaz de la Espina, S., 1982: Nucleolar fibrillar centers in plant meristematic cells: ultrastructure, cytochemistry and autoradiography. *J. Cell Sci.* 58:313-329.

Rudak, E. y Callan, H.G., 1976: Differential staining and chromatin packing of the mitotic chromosomes of the newt *Triturus cristatus*. *Chromosoma (Berl.)* 56:349-362.

Rufas, J.S., Giménez Martín, G. y Esponda, P., 1982: Presence of chromatid core in mitotic and meiotic chromosomes of grasshoppers. *Cell Biol. Int. Rev.* 6:261-267.

Sachs, L., 1954: Sex linkage and sex-chromosomes in man. *Ann. Engen.* 18:255.

Sadasivaiah, R.S. y Kasha, K.J., 1971: Meiosis in haploid barley—an interpretation of non-homologous chromosome associations. *Chromosoma* 35:247-263.

Sánchez-Pina, M.A., Medina, F.J., Fernández Gómez, M.E. y Risueño, M.C., 1984: Ag-NOR proteins are present when transcription is impaired. *Biol. Cell* 5:119-202.

Sasaki, M., 1964: Notes on polyploidy in human male germ cells. *Hum. Chromes. Newsl.* 14:20.

Schäfer, R., Ali, S. y Epplen, J.T., 1986: The organization of the evolutionarily conserved GATA/GACA repeats in the mouse genome. *Chromosoma (Berl.)* 93:502-510.

Schweizer, D., 1976: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma* 58:307-324.

Schweizer, D., 1979: Fluorescent chromosome banding in plant: applications, mechanisms and implications for chromosome structure. *Proc. Stl. John Innes Symp.* 61-72.

Schweizer, D., 1980: Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cel Genet.* 27:190-193.

Schweizer, D., 1981: Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57:1-14.

Seabright, M.A., 1972; A rapid banding for human chromosomes. *Lancet* ii:971-972.

Selden, T.R., Wachtel, S.S., Koo, G.C., Haskins, M.E. y Peterson, D.F., 1978: Genetic basis of XX male syndrome and XX true hermaphroditism: Evidence in the dog. *Science* 201:644-646.

Shapiro, M., Erickson, R.P., 1981: Evidence that the serological determinant of H-Y antigen is carbohydrate. *Nature*, 290:503.

Sharp, A.J., Wachtel, S.S. y Benirschke, K., 1980: H-Y antigen in a fertile XY female horse. *J. Reprod. Fert.* 58:157-160.

Silvers, W.K. y Wachtel, S.S., 1977: H-Y antigen: Behaviour and function. *Science* 195:956-960.

Silvers, W.K., David, L., Gasser, D.L. y Eicher, M.E., 1982: H-Y antigen, serologically detectable male antigen and sex determination. *Cell* 28:439-440.

Singh, L., Purdom, I.F. y Jones, J.W., 1980a: Sex chromosomes associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma* 79:137-157.

Singh, L., Purdom, F. y Jones, K., 1980b: Conserved sex-chromosomes associated nucleotide sequences in eukaryotes. *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.* 45:805-813.

Singh, L. y Jones, K.W., 1982: Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent non reciprocal crossover involving de X and an aberrant Y chromosome. *Cell* 28:205-216.

Singh, L., Phillips, C. y Jones, K.W., 1984: The conserved nucleotide sequences of Bkm, which define Sxr in the mouse, are transcribed. *Cell* 36:111-120.

Solari, A.J., 1964: The morphology and ultrastructure of the sex vesicle in the mouse. *Expl. Cell Res.* 36:160-168.

- Solari, A.J., 1974: The relationship between chromosomes and axes in the chiasmatic XY pair of the Armenian hamster (*Cricetulus migratorius*). *Chromosoma* 48:89-106.
- Solari, A.J., 1980: Synaptonemal complexes and associated structures in microspread human spermatocytes. *Chromosoma (Berl.)* 81:315-337.
- Solari, A.J. y Ashley, T. 1977: Ultrastructure and behaviour of the achiasmatic, telosynaptic XY pair of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Chromosoma* 62:319-336.
- Soller, M. y Angel, H., 1964: Polledness and abnormal sex ratio in Saanen goats. *J. Hered.* 55:139-142.
- Soller, M., Padeh, B., Wysoki, M. y Ayalon, N., 1969: Cytogenetics of the saanen goats showing abnormal development of the reproductive tract associated with the dominant gene for polledness. *Cytogenetics* 8:51-67.
- Somlev, B., Melander, Y., Hausen-Melander, E., Aamdal, J. y Andersen, K., 1970: Another swine intersex with a female chromosome complement. *Hereditas* 64:296-297.
- Speed, R.M., 1982: Meiosis in foetal mouse ovary I. An analysis at the light microscope level using surface-spreading. *Chromosoma* 85:427-437.
- Speed, R.M., 1985: The prophase stages in human foetal oocytes studied by light and electron microscopy. *Hum. Genet.* 69:69-75.
- Speed, R.M., 1986 a: Oocyte development in XO fetuses of man and mouse: The possible role of heterologous X-chromosome pairing in germ cell survival. *Chromosoma* 94:115-124.

Speed, R.M., 1986 b: Prophase pairing in a mosaic 18p-;iso 18q human female foetus studied by surface spreading. Hum. Genet. 72:256-259.

Speed, R.M. y Chandley, A.C., 1983: Meiotic in the foetal mouse ovary. II Oocyte development and age related aneuploidy. Does a production line exist?. Chromosoma 88:184-189.

Stevens, N.M., 1905: Studies in spermatogenesis with special reference to the accesory chromosome. Carnegie Inst. Wash. Publ. 36.

Sumner, A.T., 1972: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Expl. Cell Res. 75:304-306.

Sumner, A.T., Evans, H.J. y Buckland, R.A., 1971: New technique for distinguishing between human chromosomes. Nature new Biol. 232:31-32.

Takanari, H., Pathak, S. y Hsu, T.C., 1982: Dense bodies in silver-stained spermatocytes of the Chinese hamster: Behaviour and cytochemical nature. Chromosoma 86:359-373.

Therkelsen, A.J., 1964: Sterile male with the chromosome constitution, 46,XX. Cytogenetics 3:207-218.

Todorovic, M., Soldatovic, B. y Dunderski, Z., 1972: Kariotipske odlike populacija roda *Talpa* iz Makenonije I Crne Gore. Arhiv. Biol. Nauka 24:131-139.

Tres, L., 1978: Translocation of the Y-paracentromeric region to an autosomal bivalent in Sxr,XY mouse spermatocyte. J. Cell Biol. 79:125.

- Utakoji, T., 1972: Differential staining patterns of human chromosomes treated with potassium permanganate. *Nature (Lond.)* 239:168-170.
- Wachtel, S.S., 1977: H-Y antigen and the genetics of sex determination. *Science* 198:797-799.
- Wachtel, S.S., 1982: H-Y antigen and biology of sex-determination. Grune and Stratton, New York p. 302.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C. y Boyse, E.A., 1975a: Evolutionary conservation of H-Y (male) antigen. *Nature* 254:270-272.
- Wachtel, S.S., Ohno, S., Koo, G.C. y Boyse, E.A., 1975b: Possible role of H-Y antigen in primary sex-determination. *Nature* 257:235-236.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Ohno, S., Gropp, A., Dev, V.G., Tatravahi, R., Miller, A.D. y Muller, J.O., 1976a: H-Y antigen and the origin of XY female wood lemming (*Myopus schisticolor*). *Nature* 264:638-639.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Breg, W.R., Thaler, H.T., Dillard, G.M., Rosenthal, I.M., Dosik, G., Gerald, P.S., Saenger, P., New, M., Lieber, E., Miller, O.J., 1976b: Serologic detection of a Y-linked gene in XX males and XX true hermaphrodites. *N. Engl. J. Med.* 295:750-754.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Breg, W.R. y Genel, L., 1980: H-Y antigen in X,i(Xq) gonadal dysgenesis: evidence of X-linked genes in testicular differentiation. *Hum. Genet.* 56:183-187.
- Wang, H.C. y Fedoroff, S., 1972: Banding in human chromosomes treated with trypsin. *Nature New Biol.* 235:52-53.

Wettstein, D. von, Rasmussen, S.W., Holm, P.B., 1984: The synaptonemal complex in genetic segregation. *Annu. Rev. Genet.* 18:331-413.

Westergaard, M., 1958: The mechanism of sex-determination in dioecious flowering plants. *Adv. Genet.* 9:217-281.

Wiberg, U., Mayerova, A., Müller, U., Fredga, K. y Wolf, U., 1982: X-linked genes of the H-Y antigen system in the wood lemming (*Myopus schisticolor*). *Hum. Genet.* 60:163-166.

Wilson, E.B., 1905: Studies on chromosomes. *J. Exp. Zool.* 2:507.

Winsor, E.J.T., Ferguson-Smith, M.A. y Shive, J.G.M., 1978: Meiotic studies in mice carrying the sex reversal (Sxr) factor. *Cytogenet. Cell Genet.* 21:11-18.

Wolf, U., Fraccaro, M., Mayerova, A., Hecht, T., Maraschio, H. y Hameister, E., 1980a: A gene controlling H-Y antigen on the X chromosome. *Hum. Genet.* 54:149-154.

Wolf, U., Fraccaro, M., Mayerova, A., Hecht, T., Zuflardi, O. y Hameister, H., 1980b: Turner syndrome patients are H-Y positive. *Hum. Genet.* 54:315-318.

Wolf, U., Müller, U. y Ohno, S., 1981: H-Y antigen and sex determination in mammals. En *chromosomes today*, vol. 7 (ed. by M.D. Bennet, M. Bobrow y G.M. Hewitt), George Allen and Unwin, London, pp. 258-270.

Yong, H.S., 1972: Robertsonian translocation in the Malayan house shrew, *Suncus murinus* (Insectivora, Soricidae). *Experientia*, 28:585-586.



Yosida, T.H., 1980: Cytogenetics of the black rat. Karyotype evolution and species differentiation. University of Tokio Press, pp. 254.

Yosida, T.H. y Sagai, T., 1972: Banding pattern analysis of polymorphic karyotypes in the black rat by a new differential staining technique. Chromosoma (Berl.) 37:387-394.

Zakarov, A.F., 1968: Heterochromatin and genetic inactivation in mammalian cells. Usp. Sovreem. Biol. 65:83-106.

Zenzes, M.T., Wolf, U., Günther, E. y Engel, W., 1978: Studies on the function of H-Y antigen: dissociation and reorganization experiments on rat gonadal tissue. Cytogenet. Cell Genet. 20:365-372.