

Apoptosis en la Espermatogénesis de Heterocigotos Robertsonianos Múltiples de *Mus musculus domesticus*

Apoptosis in Spermiogenesis of Multiple Robertsonian Heterozygotes of *Mus musculus domesticus*

Marisel González*; Raúl Fernández-Donoso* & Soledad Berríos*

GONZÁLEZ, M.; FERNÁNDEZ-DONOSO, R. & BERRÍOS, S. Apoptosis en la espermatogénesis de heterocigotos Robertsonianos múltiples de *Mus musculus domesticus*. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 2(4):589-601, 2015.

RESUMEN: *Mus musculus domesticus* es una especie que se caracteriza por poseer un número diploide de 40 cromosomas, todos ellos telocéntricos (acrocéntricos). En las poblaciones naturales de *Mus* se producen con alta frecuencia translocaciones Robertsonianas (Rbs) o fusiones a nivel del centrómero entre dos cromosomas telocéntricos autosómicos, lo que produce cromosomas metacéntricos Rbs y una gran variedad de subespecies con dotaciones cromosómicas diploides inferiores a 40. Los cromosomas Rbs no afectan la viabilidad de los individuos pero sí su fertilidad, principalmente la de los heterocigotos Rbs. En la meiosis de los heterocigotos Rb el cromosoma metacéntrico y los telocéntricos homólogos se reúnen formando un trivalente, sin embargo, ocurren problemas durante la sinapsis y segregación entre estos cromosomas. En este trabajo se realizó un análisis comparativo de la espermatogénesis, considerando el número de células germinales y su pérdida por apoptosis entre machos heterocigotos $2n=32$, que en la meiosis forman 8 trivalentes Rbs; y los homocigotos $2n=40$ y $2n=24$. Se encontró que el número de espermátocitos en profase I se encuentra conservado en los distintos estados del epitelio seminífero en los ejemplares de todas estas constituciones cromosómicas. En los heterocigotos $2n=32$ observamos una significativa disminución en el número de espermátidas, lo que se vio reflejado en la proporción de espermátocitos y espermátidas que fue de 1:1,7. Las células en apoptosis, positivas para la caspasa 3, fueron considerablemente más numerosas en los heterocigotos que en los homocigotos parentales, concentrándose principalmente en el estado XII del epitelio seminífero y correspondiendo a espermátocitos en metafase meiótica. La apoptosis aumentada en los espermátocitos divisionales de los heterocigotos Rbs, posiblemente refleje la eliminación selectiva de células portadoras de anomalías en la alineación o segregación de los cromosomas, lo cual es consistente con el menor número de espermátidas y la sub-fertilidad relativa observada en los híbridos Rb $2n=32$.

PALABRAS CLAVE: Espermatogénesis; Apoptosis; Heterocigotos Rb; *Mus musculus domesticus*.

INTRODUCCIÓN

Hace décadas se conoce que las alteraciones cromosómicas pueden ser causa de infertilidad masculina. Principalmente ello se debe a que los cromosomas reordenados se ven comprometidos en errores en la segregación de la meiosis I o II de la espermatogé-

nesis. Como consecuencia se produce una reducción de la fertilidad del individuo por pérdida de gametos o resultan gametos con desbalance en el número de cromosomas los que si llegan a fecundar generan aneuploidías en la descendencia.

* Programa Genética Humana, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Santiago, Universidad de Chile. Proyecto FONDECYT N° 1120160

Las translocaciones Robertsonianas (Rbs) balanceadas son la anomalía cromosómica estructural más frecuente en mamíferos (King, 1993). En la especie humana también se producen estos reordenamientos entre los cromosomas acrocéntricos, los que generalmente no tienen mayores consecuencias para el desarrollo del individuo portador. En algunos varones heterocigotos para un cromosoma Rb se produce oligozoospermia. Aunque mayoritariamente los gametos producidos son normales o balanceados, algunos de ellos pueden ser, sin embargo, portadores de desbalances cromosómicos que se manifestarán en sus hijos (Anahory *et al.*, 2005; Moradkhani *et al.*, 2006).

En *Mus m. domesticus* las translocaciones Rbs ocurren frecuentemente en las poblaciones naturales y los individuos portadores de estos reordenamientos cromosómicos son capaces de reproducirse y dejar descendencia (Garagna *et al.*, 2014). Sin embargo, pueden ocurrir problemas cuando se encuentran y cruzan poblaciones homocigotas ancestrales $2n=40$ con otras homocigotas para cromosomas Rbs (Castiglia & Capanna, 2000). En estos casos se producen individuos híbridos, que en su meiosis cada cromosoma metacéntrico Rb debe realizar sinapsis, recombinar y segregarse en relación a los cromosomas telocéntricos que le dieron origen (Manieu *et al.*, 2014). En general los heterocigotos Rbs presentan una fertilidad reducida por la dificultad de producir gametos viables debido a alteraciones de la sinapsis y segregación de los cromosomas que están involucrados en el reordenamiento (Eaker *et al.*, 2001; Garagna *et al.*, 2001; Merico *et al.*, 2003; Sans-Fuentes *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2014).

Esta situación puede revestir mayor exigencia en la meiosis de individuos que son portadores de varios metacéntricos Rbs lo que puede llevar a una menor fertilidad a causa de errores meióticos y probablemente a una mayor apoptosis selectiva de las células germinales (Wallace *et al.*, 2002).

La infertilidad reproductiva o disminución de gametos en organismos portadores de reordenamientos cromosómicos pareciera originarse en que las células germinales no pueden continuar progresando por las diferentes

etapas de su desarrollo o que los controles tisulares y celulares eliminan selectivamente las células que presentan alteraciones (de Rooij & de Boer, 2003; Cohen *et al.*, 2006; Borg *et al.*, 2010). Se han propuesto distintos niveles en los que pueden verse afectados los individuos con anomalías cromosómicas, los que incluyen: alteración de la actividad transcripcional de cromosomas autosómicos y sexuales (Burgoyne *et al.*, 2009); deterioro de la sinapsis y la recombinación meióticas (Barchi *et al.*, 2005; Hamer *et al.*, 2008), alteración de la arquitectura nuclear durante la profase I de la meiosis (Fernández-Donoso, 1982; Garagna *et al.*, 2001; Berríos *et al.*, 2014); incorrecta orientación y segregación de los cromosomas durante las divisiones meióticas (Eaker *et al.*; Manieu *et al.*); y silenciamiento transcripcional de la cromatina en asinapsis que inactivaría genes esenciales para el transcurso normal de la meiosis y como consecuencia ocurriría una detención de ella en la fase de paquiteno (Turner *et al.*, 2005; Burgoyne *et al.*; Manterola *et al.*, 2009).

Estudios de la espermatogénesis en poblaciones naturales de *Mus m. domesticus* portadores de cromosomas Rbs han comprobado que en los heterocigotos Rbs se mantiene la cantidad de espermatogonias pero hay una disminución del número de espermatocitos. Aparentemente la causa principal de la disminución de los espermatocitos sería por apoptosis, posiblemente debido a que no logran pasar el control existente en el estadio de paquiteno de la meiosis, ya que presentarían alteraciones en la sinapsis y recombinación de los cromosomas (Sans-Fuentes *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha descrito que los espermatocitos que logran superar los controles de la Profase I, Metafase I y II continúan con la diferenciación a espermatidas (Garagna *et al.*, 2001; Manterola *et al.*). En efecto, heterocigotos Rb $2n=31$ de *Mus domesticus* presentan espermatidas pero en una proporción reducida (1:2,4) respecto del número esperado de 4 veces el de espermatocitos, lo que sugiere que la pérdida de células germinales por apoptosis ocurriría en la meiosis de la espermatogénesis (Garagna *et al.*, 2001).

La apoptosis es un proceso normal durante la espermatogénesis que limita el número de células germinales y asegura así que la célula

de Sertoli sea capaz de proporcionar los nutrientes necesarios para sustentar a una generación continua de células germinales (Lee *et al.*, 2006; Shaha *et al.*, 2010). Hemos descrito que los reordenamientos cromosómicos afectan el transcurso normal de la espermatogénesis por alteraciones en las subetapas de la meiosis, lo que lleva a una pérdida selectiva de células germinales posiblemente por muerte celular programada o apoptosis.

El estudio de la gametogénesis de machos heterocigotos Rb $2n=36$ de *Mus domesticus* mostraron se producía un incremento de la apoptosis en espermatocitos que se encontraban en metafase y con mal alineación de cromosomas, lo que sugería la participación de un mecanismo de control de errores en esta etapa (Eaker *et al.*, 2001). Un análisis similar realizado en heterocigotos Rb múltiples $2n=32$ reveló una alta proporción de túbulos seminíferos defectuosos con asociaciones celulares atípicas y también con pérdidas severas de células germinales (Merico *et al.*, 2008). Aunque en este estudio no se determinó cuáles células germinales se encontraban disminuidas sí se demostró muerte celular por apoptosis al detectar DNA fragmentado a través de la metodología del TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling). En secciones transversales de túbulos seminíferos de estado XII las células positivas para TUNEL eran nueve veces más en los heterocigotos que en el epitelio seminífero de los ratones parentales (Merico *et al.*, 2008). Estos autores además demuestran que se activa la vía intrínseca de la apoptosis (mecanismo mitocondrial) y que sería esta la vía que llevaría a la muerte de las células germinales aunque no descartan la existencia de otros mecanismos (Merico *et al.*, 2008).

Además del control celular que existiría a nivel de la metafase meiótica se ha descrito por Odorisio *et al.* (1998) un control meiótico previo que participaría en el monitoreo de la sinapsis de los cromosomas homólogos durante la profase temprana. Células germinales con errores sinápticos y/o que no logran resolver la reparación de los cortes programados del DNA (DBSs) que ocurren tempranamente en la profase meiótica, serían también eliminadas por apoptosis por un mecanismo independiente de

p53 (Odorisio). Los estudios de apoptosis en la espermatogénesis de machos de *Mus* se basan principalmente en la detección de DNA fragmentado en las células germinales, por el método de TUNEL (Merico *et al.*, 2008). Las células germinales aquí estudiadas son definidas en apoptosis luego de detectar en ellas la presencia de caspasa 3 activada que es una enzima que se constituye en una señal que revela que la vía apoptótica está en ejecución. Con este instrumento analizaremos cualitativa y cuantitativamente las células germinales en apoptosis.

En este trabajo se describen las alteraciones en la espermatogénesis y la frecuencia de células germinales en apoptosis, en relación a los estados particulares del epitelio seminífero de machos de *Mus m. domesticus* heterocigotos para múltiples cromosomas Rbs.

MATERIAL Y MÉTODO

Ejemplares estudiados. Se estudió la espermatogénesis de ratones *Mus m. domesticus* adultos cuya edad varió entre 3 a 7 meses. Se mantuvieron a una temperatura de 22 °C con alimentación ad libitum y bajo un fotoperíodo normal (12/12 h), según las condiciones establecidas en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los animales se sacrificaron por medio de dislocación cervical, siguiendo el protocolo establecido en el proyecto FONDECYT #1120160, el cual fue aprobado por la Comisión de Ética de la investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (CBA #0441) y por el comité de ética de FONDECYT – CONICYT. Considerando un nivel de confianza del 95 %, una potencia de 90 y una disminución de la diferencia entre razones espermatocito I: espermátida de 0,25 (de 1:4 a 1:2), se estimó un tamaño muestral de 10 ratones *Mus domesticus* heterocigotos para cromosomas Rbs, asumiendo un 20 % de pérdidas. La varianza para el cálculo muestral fue extraída del estudio de Mérico *et al.* (2003) ($S^2= 0,02$ para la razón espermatocito I: espermátida). Los animales estudiados fueron los siguientes: dos ejemplares de *Mus m. domesticus* CD1 $2n=40$ (CD1): homocigoto estándar con todos los

cromosomas telocéntricos, 19 pares autosómicos mas el par sexual XY; dos ejemplares de *Mus m. domesticus* Milano II $2n=24$ (Mi II): homocigoto para 8 cromosomas metacéntricos Robertsonianos Rb 2.12, 3.4, 5.15, 6.7, 8.11, 9.14, 10.13 y 16.17; Diez ejemplares de *Mus m. domesticus* $2n=32$: heterocigotos descendientes F1 del cruzamiento entre un ejemplar $2n=24$ y otro $2n=40$. Presentan 8 cromosomas metacéntricos Rbs: 2.12, 3.4, 5.15, 6.7, 8.11, 9.14, 10.13, 16.17, 22 autosomas telocéntricos y los cromosomas sexuales X e Y.

Cortes histológicos y tinción PAS Hematoxilina. Inmediatamente de la dislocación cervical de cada *Mus musculus domesticus* se obtuvieron ambos testículos para ser fijados por inmersión en la mezcla fijadora Bouin (solución acuosa de ácido pícrico saturado, más formol y ácido acético). Al cumplir una hora de la fijación se realizaron cortes de ambos polos de cada testículo y a las dos hora de fijación se seccionaron transversalmente para una mejor penetración de la mezcla fijadora. Luego de 7 h de fijación las muestras fueron lavadas en etanol de 70° para luego ser deshidratadas en alcoholes ascendentes hasta 100°. Posteriormente las muestras de testículos deshidratados pasaron por el líquido intermediario xilol y finalmente fueron impregnados e incluidos en paraplast. Se realizaron cortes seriados de 5µm de grosor en un micrótopo rotatorio de tipo minot los que fueron adheridos en portaobjetos silanizados y secados en una estufa a 37 °C por toda la noche. Los cortes desparafinados y rehidratados fueron luego teñidos con PAS-hematoxilina según el protocolo de McManus (1946). El Ácido peryódico-Shiff o PAS permite distinguir diferencialmente las espermátidas redondas por su acrosoma, el cual se tiñe de un rosado intenso, especialmente las espermátidas de los estadios VI al VIII del epitelio seminífero y además esta tinción permite diferenciar los túbulos seminíferos cortados transversalmente al teñir su lámina basal. Se usó hematoxilina de Mayer para teñir los núcleos.

Diámetro tubular y número de espermocitos y espermátidas. Los cortes teñidos fueron observados en el microscopio de luz NIKON Optiphot y con la cámara Nikon digital sight DS-SM se obtuvieron microfotografías de

15 túbulos en los estados VI, VII o VIII del epitelio seminífero por cada ejemplar de *Mus domesticus* con un aumento de 200X. Con el software "Image J" se midió el diámetro menor del túbulo en micrómetros (mm). En cada microfotografía de corte transversal de túbulo seminífero se trazó una línea que asimilara el diámetro menor del túbulo, luego el software contabilizaba los pixeles del trazo y con una escala incorporada lo representaba en micrómetros.

Para estimar el número de espermocitos y espermátidas por sección utilizamos la fórmula de Abercromie que corrige el número de núcleos en secciones de micrótopo (Abercromie, 1946).

$$P = A (M / L + M)$$

Donde P es el número corregido de núcleos, A el recuento de núcleos visto por sección, M grosor del corte en micrómetros y L la longitud del núcleo en micrones. Con esta fórmula entonces obtuvimos el número de espermocitos I y espermátidas redondas ajustadas y finalmente la razón espermátida/espermocito I ajustada por cada sección de túbulo seminífero de los 15 observados por cada ejemplar.

Células germinales en apoptosis. Se utilizó inmunodetección de la caspasa 3 activa. Los cortes luego de desparafinados y rehidratados fueron sometidos a una recuperación antigénica con tripsina al 0,05 % en PBS, luego se bloqueó la unión inespecífica del anticuerpo primario con albumina de suero bovino (Marca WINKLER) al 4 % por 10 min. Se incubó toda la noche a 4 °C o por 45 min a 37 °C en anticuerpo primario anti-caspasa 3 activa policlonal de conejo con una dilución de 1:50 (Abcam 2302). Se usó el sistema de detección ABC (complejo streptavidina biotina), específicamente el kit 4plus HRP Universal Detection (Biocare medical). El cual consiste en un anticuerpo secundario conjugado con biotina el que reconoce específicamente anticuerpos de ratón y conejo. La estreptavidina conjugada con la peroxidasa del rábano picante (HRP) se une a la biotina del anticuerpo secundario y al agregar el sustrato diaminobencidina (DAB) reacciona formando un sustrato cromógeno insoluble. Luego como con-

traste se usó hematoxilina para distinguir los núcleos de las distintas células germinales. Como control negativo se utilizaron cortes incubados sin anticuerpo primario y como control positivo un corte de testículo de *Mus* 2n= 40 sometido previamente a calor para inducir apoptosis. Ambos controles fueron procesados en paralelo con los cortes de testículo de parentales e híbridos.

RESULTADOS

Epitelio seminífero en ejemplares de *Mus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32

La observación y comparación al microscopio de las secciones de los túbulos seminíferos entre las diferentes subespecies de *Mus m. domesticus* reveló que había diferencias en los diámetros tubulares siendo comparativamente menor los de la subespecie 2n=24 que la de los ejemplares 2n=40 y aún mucho menor el diámetro de los túbulos seminíferos de los ejemplares híbridos (Fig. 1). Esta observación fue consistente con el tamaño comparativamente menor de los testículos de los ejemplares 2n=32, respecto de la de los homocigotos parentales.

El diámetro tubular promedio fue $360 \pm 42 \mu\text{m}$ para *Mus* 2n=40, $338 \pm 22 \mu\text{m}$ para *Mus* 2n=24 y $269 \pm 14 \mu\text{m}$ para los híbridos 2n=32 (Fig. 1). El diámetro tubular promedio en los híbridos 2n=32 se observó reducido en un 25 % respecto del diámetro tubular promedio de

los ejemplares homocigotos, diferencia estadísticamente significativa en ambas comparaciones ($p < 0,0001$). La diferencia entre los diámetros de los túbulos seminíferos de los homocigotos no resultaron estadísticamente significativas.

La observación detallada de los tipos celulares que componen el epitelio seminífero mostró que las asociaciones que presentaban las células germinales en *Mus m.* 2n=40 y 2n=24, eran consistentes con la organización normal descrita para los estados del epitelio seminífero de *Mus* (Russell *et al.*, 1990). En cambio, en el epitelio seminífero de los machos híbridos 2n=32 se encontraron asociaciones atípicas que hacían, en algunos casos, difícil definir los estados observados. Estas alteraciones se observaron principalmente en los que debían corresponder a los estados I, II, XI y XII. En los estados VI, VII y VIII no se observó alteraciones en las asociaciones de las células germinales esperadas para esos estados, tanto en los heterocigotos como en los homocigotos parentales (Fig. 2).

Estimación numérica de espermatoцитos I y espermátidas redondas

Las estimaciones del número promedio de espermatoцитos I en paquíteno (ES) y espermátidas (SP) y las estimaciones ajustadas según la corrección Abercrombie tanto para el número de ES, SP y la razón SP/ES se resumen en la Tabla I. El ejemplar 2n=40 promedió 70 espermatoцитos en paquíteno por túbulo seminífero, el 2n=24 61 espermatoцитos I y los

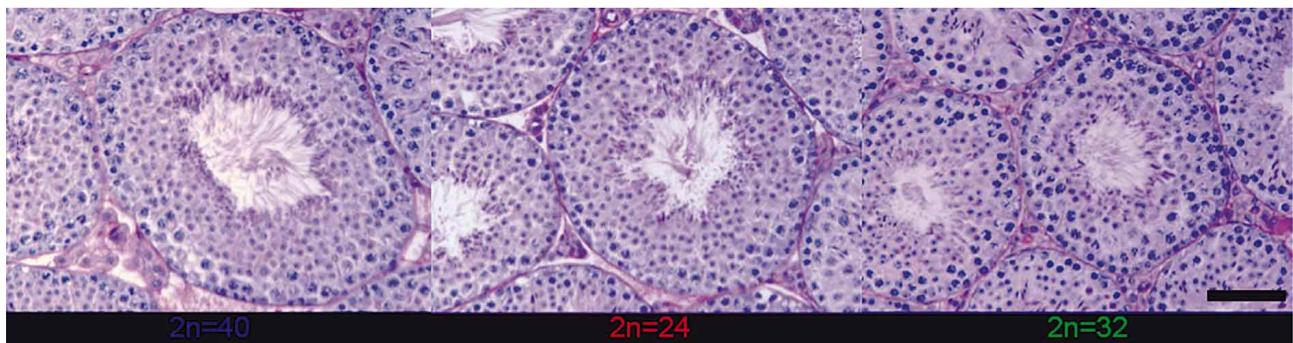


Fig. 1. Secciones histológicas de túbulos seminíferos de *Mus m. domesticus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32. Microfotografías de cortes transversales de túbulos seminíferos fijados y teñidos con PAS hematoxilina. Se observa que en los parentales 2n=40 y 2n=24 el diámetro tubular y altura del epitelio germinal es similar. En el híbrido 2n=32, se observa que el diámetro de los túbulos seminíferos y la altura del epitelio seminífero es menor que en los parentales. Barra= 10 μm .

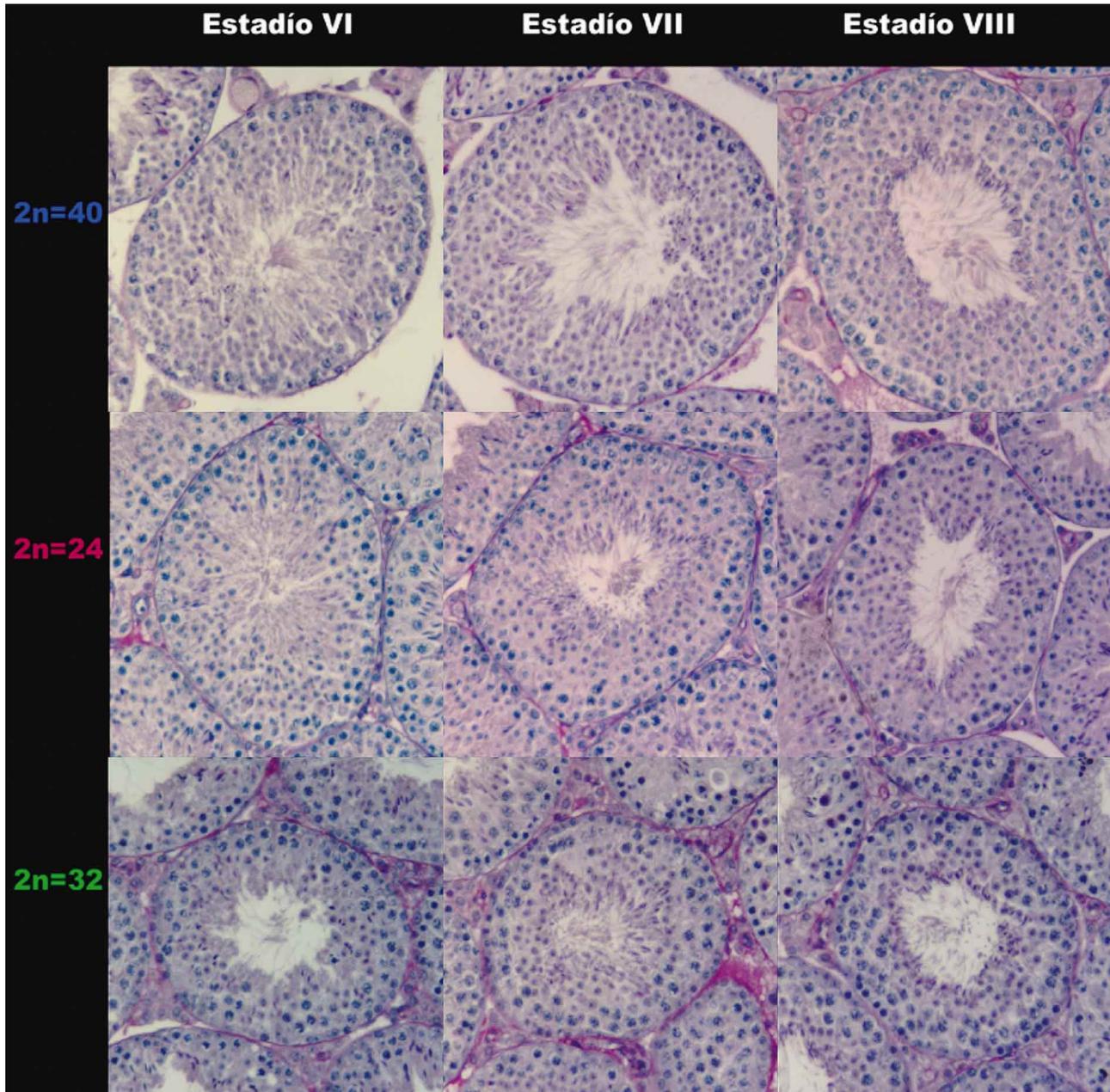


Fig. 2. Secciones transversales de túbulo seminífero en los estados VI, VII y VIII de *Mus m. domesticus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32: Panel de microfotografías representativas de los estados VI, VII y VIII, que fueron elegidos para contabilizar los espermatoцитos I y las espermátidas redondas. En el panel se puede observar que las asociaciones celulares son similares entre las subespecies de *Mus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32 y se ajustan a las descritas previamente para esos estados del epitelio seminífero. Barra= 100 μ m.

híbridos 2n=32 promediaron 60 espermatoцитos I. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los números absolutos de espermatoцитos I por sección de túbulo seminífero entre *Mus domesticus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32.

En el epitelio seminífero de los híbridos 2n=32 se encontró una significativa reducción en el número de espermátidas respecto de los homocigotos parentales. En el ejemplar 2n=40 se estimó un número promedio de 217,6 espermátidas redondas por túbulo seminífero,

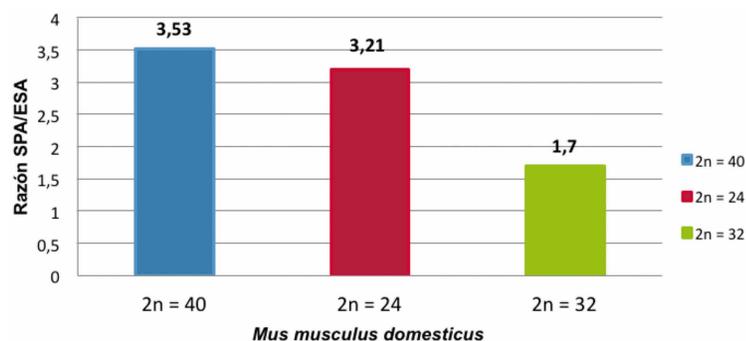
Tabla I. Número promedio de espermatoцитos y espermátidas redondas; y razón espermátida redonda : espermatoцитo I en *Mus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32. Se describe el número promedio de espermatoцитos (ES) y de espermátidas observados al microscopio en 15 cortes de túbulos seminíferos de cada ejemplar.

<i>Mus domesticus</i>	Espermatoцитos en profase (ES)	Espermátidas (SP)	Razón SP/ES	Espermatoцитos ajustado (ESA)	Espermátida ajustada (SPA)	Razón ajustada SPA/ESA
2n=40	70,3±2,3	217,6±34,5	3,1±0,4	22,0±0,7	77,7±12,3	3,5±0,5
2n=24	61,6±6,6	172,5±1,7	2,9±0,2	19,3±2,1	61,6±0,6	3,2±0,3
2n=32	60,2±4,5	90,5±23,3*	1,5±0,3*	18,8±1,5	32,3±8,3*	1,7±0,4*

El método empleado para el ajuste de valores se explica en M & M. Fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) las diferencias entre el número promedio de espermátidas por sección de túbulo seminífero en los híbridos respecto de los homocigotos parentales. También fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) las diferencias entre la razón SP/ES o SPA/ESA de los híbridos respecto de las de los machos homocigotos. \pm = desviación estándar. * = diferencia estadísticamente significativa $p < 0,0001$.

en 2n=24 de 172,5 y en 2n=32 de 90,5 (Tabla I). Encontramos diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,0001$) entre los promedios de espermátidas en las secciones de túbulos seminíferos de *Mus* 2n=32 y 2n=40 y entre *Mus* 2n=32 y 2n=24. Entre los homocigotos parentales no se encontraron diferencias significativas (Tabla I).

En *Mus* 2n=40 se determinó una proporción ajustada de espermatoцитos: espermátidas de 1:3,5 que no presentó diferencias estadísticas significativas ($p > 0,0001$) con la razón teórica esperada de 1:4 al aplicar un test t-student. Para evaluar las diferencias de la variable razón ajustada espermátidas : espermatoцитos I entre los ejemplares de *Mus* de distinta constitución cromosómica, se aplicó un test de Kruskal-Wallis. Se verificaron diferencias significativas entre la razón estimada para *Mus* 2n=32 (1,35) con respecto a las estimadas para *Mus* 2n=40 (3,53) y 2n=24 (3,21). Los homocigotos parentales no presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar las respectivas razones espermátidas : espermatoцитos (Fig. 3).



Apoptosis de células germinales en el epitelio seminífero

En las secciones de túbulos seminíferos de *Mus* 2n=40 observamos escasas células germinales positivas a caspasa 3, las que correspondieron principalmente a espermatoцитos I en paquiteno. Contabilizamos de 1 a 2 espermatoцитos en apoptosis por túbulo seminífero de estados del epitelio entre IV y IX, además encontramos que ciertos túbulos seminíferos, específicamente del estadio XII, presentaban 1 a 2 células en metafase con detección de caspasa 3 (Figura 4 A y C) y todas las otras metafases sin reacción positiva a la caspasa (Fig. 4B) (Tabla II).

En las secciones de túbulos seminíferos de *Mus* 2n=24 se observó un número mayor de células germinales que resultaron positivas para la caspasa 3. Generalmente correspondieron a espermatoцитos en metafase. Estimamos entre 2 a 6 metafases positivas a caspasa por sección de túbulo seminífero del estado XII (Figs. 4 D, E y F), sin embargo el número de espermatoцитos I en paquiteno positivos para la reacción

Fig. 3. Comparación de la Razón ajustada espermátidas: espermatoцитos I observada en ejemplares homocigotos y heterocigotos Rb de *Mus m. domesticus*. En el gráfico es posible apreciar una razón SP/ES ajustada de 3,5 en *Mus* 2n=40 y de 3,2 en *Mus* 2n=24. Para los híbridos en cambio se encontró una razón SP/ES considerablemente menor de 1,7 y que es estadísticamente significativa respecto de las razones encontradas para los machos homocigotos ($p < 0,0001$).

Tabla II. Número de Células Germinales en vía apoptótica por corte transversal de túbulos seminíferos de *Mus domesticus* 2n=40, 2n=24 y 2n=32.

	2n=40	2n=24	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	XH
Número de Células germinales en apoptosis	14	8	38	53	74	94	82	79	81	84	65	103	75,3
Índice de Células germinales en apoptosis	0,7*	0,4*	1,9	2,7	3,7	4,7	4,1	4,0	4,1	4,2	3,3	5,2	3,8*

CH= Promedio de células germinales en apoptosis calculado a partir de cortes de túbulos seminíferos provenientes de 10 híbridos 2n=32.
 *= Diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05) en números promedios de células en apoptosis entre híbridos y machos homocigotos parentales.

inmunohistoquímica no fue estadísticamente diferente del observado en *Mus* 2n=40 (Tabla II).

En las secciones de túbulos seminíferos de *Mus* 2n=32, el número de células germinales positivas para la caspasa fue considerablemente mayor que el número promedio encontrado en los homocigotos 2n=40 y 2n=24 (Tabla II, Fig. 5). Los heterocigotos presentaron entre 10 a 30 células germinales en apoptosis por túbulo seminífero en estado XII (Figs. 4G y H). Las células germinales positivas a la detección de caspasa fueron mayoritariamente células meióticas en metafase I, anafase o metafase II (Fig. 4I). Incluso en estos estados encontramos un mayor número de metafases tanto apoptóticas como no apoptóticas que en los *Mus* homocigotos parentales.

En los demás estados del epitelio seminífero, como por ejemplo VI, VII y VIII, sólo detectamos 1 a 2 espermatocitos I en paquiteno con detección positiva a la caspasa 3 activa en los *Mus* 2n=32, al igual que sus parentales 2n=40 y 2n=24 (Tabla III).

DISCUSIÓN

Las translocaciones Robertsonianas (Rbs) balanceadas son la anomalía cromosómica estructural más frecuente en mamíferos (King, 1993; Rieseberg, 2001). En la especie humana también se producen estos reordenamientos, entre los cromosomas acrocéntricos, los que generalmente no tienen mayores consecuencias para el desarrollo del individuo portador, sino más bien, problemas en su fertilidad y descendencia (Anton *et al.*, 2004). En *Mus* estos reordenamientos suceden naturalmente generando distintas subespecies en las que varía el número diploide de cromosomas dependiendo del número de cromosomas telocéntricos y metacéntricos Rbs que posean (Piálek *et al.*, 2005). *Mus* con cromosomas Rbs generan descendencia a pesar de la subfertilidad que se asocia con este reordenamiento cromosómico.

Se ha descrito que existe una relación positiva entre el diámetro tubular y la actividad espermatogénica del testículo (Sinha Hikim & Swerdloff, 1989). Incluso se ha postulado que el diámetro tubular es mejor indicador, que la masa testicular, para discriminar entre diferentes niveles de alteraciones espermatogénicas (Russell *et al.*). Los machos híbridos 2n=32 aquí estudiados presentaron una disminución del 25 % del diámetro tubular (p < 0,0001) respecto a

Tabla III. Promedio de células germinales en apoptosis según el Estado del epitelio seminífero de machos 2n=40, 2n=24 y 2n=32 de *Mus Musculus domesticus*.

	2n=40	2n=24	2n=32
Estados del epitelio seminífero II-V	0	0	0,1
VI-IX	14	1	5
X-XII I	0	7	70,1*

La frecuencia de células germinales en vía apoptótica fue diferente según el estado del epitelio seminífero. Mayoritariamente las células germinales en apoptosis se encontraron en el estado XII del epitelio seminífero de los heterocigotos 2n=32. El promedio de 70 células de los heterocigotos resultó estadísticamente significativo al compararlo con todos los otros promedios (*p<0,05)

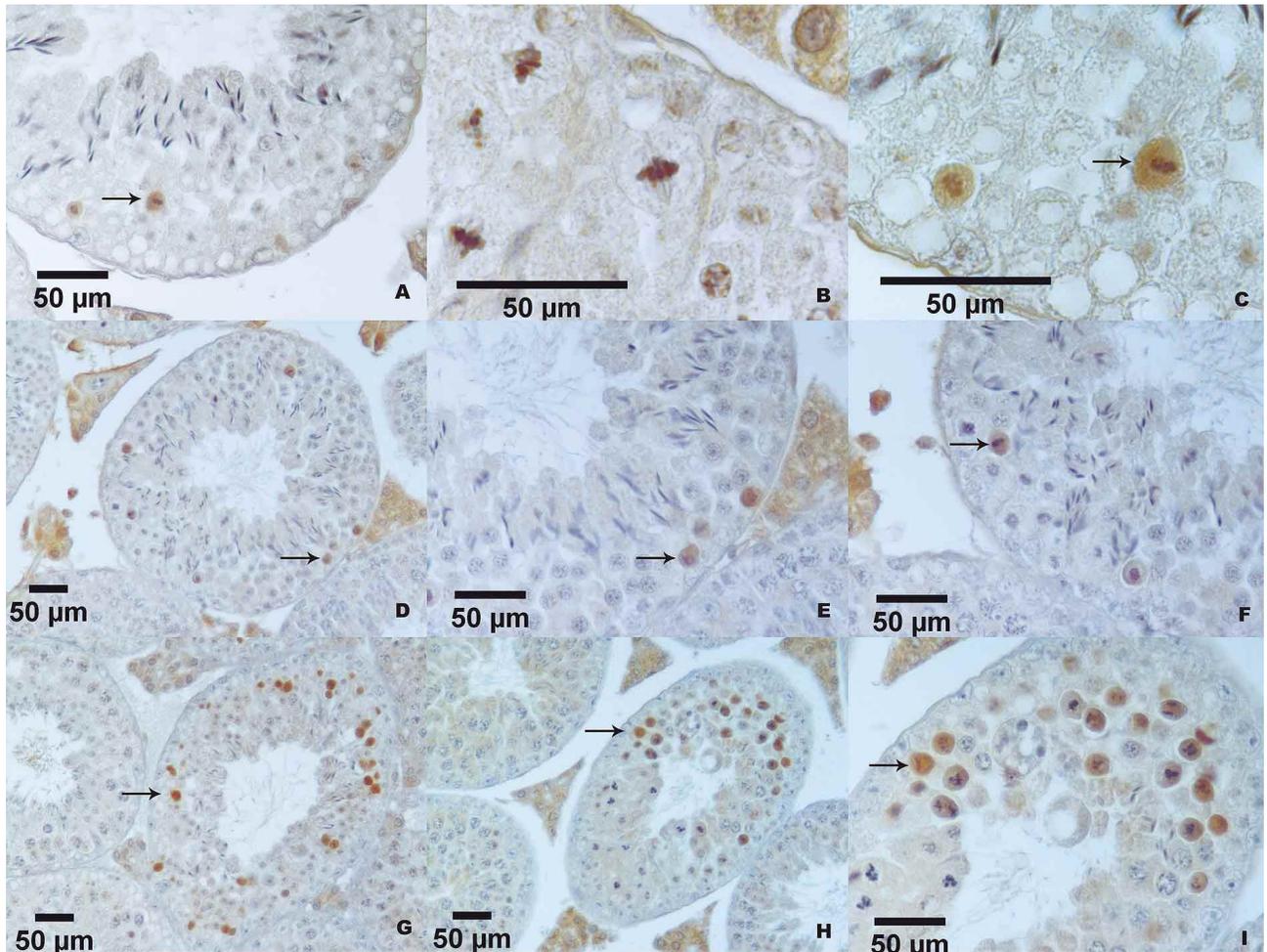


Fig. 4. Detección Inmunohistoquímica de caspasa 3 activa en secciones de túbulos seminíferos del estado XII de *Mus* 2n=40 (A, B y C), 2n=24 (D, E, y F) y 2n=32(G, H e I). Las células en apoptosis se observan de color café (flechas). Las microfotografías D, G y H a un aumento de 200X; A, E, I y F a un aumento de 400X y las B y C a un aumento de 1000X. Barra= 50 mm.

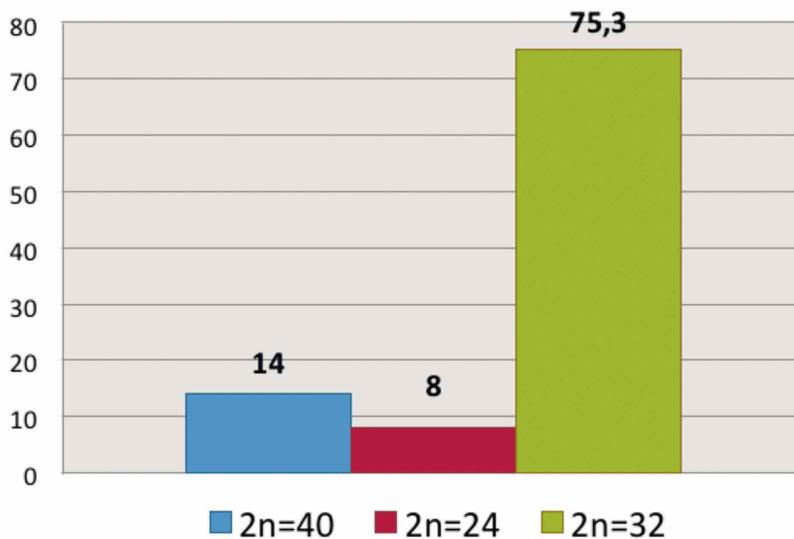


Fig. 5. Promedio de células germinales en apoptosis contabilizadas en 20 cortes transversales de túbulos seminíferos de cualquier Estado del epitelio seminífero de un ejemplar de *Mus* 2n=40, de uno de 2n=24 y de 10 ejemplares de 2n=32.

Mus 2n=40, lo que es indicativo de la reducción del epitelio seminífero de los híbridos 2n=32. Nuestros datos son similares a los encontrados en un estudio realizado también en heterocigotos para metacéntricos Rbs de *Mus domesticus*, naturales de Barcelona, los cuales presentaron diámetros significativamente más pequeños que los túbulos seminíferos de *Mus* normales 2n=40 (Sans-Fuentes *et al.*). En los heterocigotos para cromosomas metacéntricos Rbs aquí analizados, fue difícil determinar los estados del epitelio seminífero debido a que no se presentaban las clásicas asociaciones celulares que han sido descritos para cada uno de ellos. Anteriormente Mérico *et al.* describió túbulos seminíferos defectuosos y alteraciones de las asociaciones de las células germinales que se explicarían por una posible pérdida de células germinales. Nosotros encontramos que en *Mus* 2n=32 había una significativa disminución del número de espermátidas redondas, con un 66,6 % menos que las espermátidas de *Mus* 2n=40. Esta reducción en el número de espermátidas también había sido observada en híbridos Rb 2n=31 de *Mus domesticus* (Garagna *et al.*, 2001). Para el caso de los machos homocigotos para cromosomas Rb 2n=24 la disminución de las espermátidas redondas no fue estadísticamente significativa, pero creemos que aumentando la muestra de células analizadas esta disminución respecto de *Mus* 2n=40 podría acentuarse.

De manera similar a lo descrito por Garagna *et al.* (2001) y Merico *et al.* no encontramos diferencias significativas en el número de espermátidas en paquiteno presentes en los túbulos seminíferos de *Mus* 2n=40 y en los de los híbridos 2n=32. Sin embargo, Merico *et al.* detectaron en *Mus* heterocigotos Rbs una disminución significativa de los espermátidas en paquiteno sólo en el estadio XI, lo que podría ser consecuencia del control de la sinapsis cromosómica propio de la profase I de la meiosis.

En *Mus* 2n=40 encontramos una proporción de espermátidas versus espermátocitos de 1:3,53 la cual es similar a la esperada de 1:4, considerando la duplicación celular de la primera y luego de la segunda divisiones meióticas. En los mismos términos, en este trabajo en los heterocigotos Rb múltiples 2n=32 encontramos una proporción de 1:1,7 la cual claramente se aleja de la relación cuantitativa esperada. Este

resultado es consistente con las razones encontradas por otros autores también en heterocigotos Rb múltiples y apunta a una pérdida significativa de las espermátidas posiblemente como consecuencia de la acción del segundo control celular de la meiosis que se presenta en la metafase (Hauffe & Searle, 1998; Garagna *et al.*, 2001; Mérico *et al.*, 2003; Sans-Fuentes *et al.*; Turner *et al.*, 2012).

Se ha descrito que la mayoría de los trivalentes de heterocigotos Rb múltiples finalmente se sinaptan en una profase prolongada por lo que no serían desencadenantes de una apoptosis masiva durante la profase meiótica. Aunque no es posible descartar que pueda ocurrir muerte selectiva de algunos espermátocitos portadores de trivalentes asinápticos la gran mayoría de ellos completa la sinapsis y sobrepasa la profase de la meiosis (Manterola *et al.*). Otros investigadores tampoco han encontrado que haya eliminación selectiva de espermátocitos en profase I (Eaker *et al.*; Mérico *et al.*, 2008). En consecuencia, la alteración de la razón espermátocito: espermátida en híbridos surgiría por la disminución significativa del número de espermátidas redondas.

El conjunto de evidencias señaladas apuntan a que no hay pérdida masiva de espermátocitos en profase I y que mayoritariamente las células germinales en vía apoptótica corresponden a células en metafase I, diacinesis y metafase II, las cuales están presentes en los estados XI y XII del epitelio seminífero. Podemos afirmar entonces que existe una selección de células meióticas o espermátocitos en división lo que daría cuenta del menor número de espermátidas presentes en el epitelio de los híbridos. Es posible que estas células presenten fallas en la alineación de los cromosomas, o en su segregación, derivadas de la presencia de 8 trivalentes y que no logren sobrepasar el control o checkpoint de la metafase meiótica descrito anteriormente como "checkpoint spindle" (Eaker *et al.*; Shaha *et al.*). De esta manera, la apoptosis celular en *Mus* 2n=32, resultaría específica al estado XII del epitelio seminífero. En un reciente trabajo sobre la gametogénesis de machos del complejo polimórfico Rb de *Mus m. domesticus* de Barcelona, la mayor apoptosis de células germinales también se observa en el estado XII del epitelio

seminífero, sin embargo, la apoptosis observada en el epitelio seminífero de los homocigotos Rb es significativamente superior a la de los heterocigotos Rb (Medarde *et al.*, 2015). Aunque en este estudio los animales homocigotos presentaban seis pares de cromosomas Rb y los heterocigotos solo tres cromosomas Rb, es claro que la alteración de la espermatogénesis no está exclusivamente relacionada a la condición de heterocigotos Rb (Medarde *et al.*).

La alineación anómala de los cromosomas puede llevar a segregaciones alteradas lo que conduciría a la formación de gametos aneuploides. Respecto de este problema Manieu *et al.*, utilizando la técnica de FISH (Fluorescent in situ hybridization) con sondas específicas para estudiar la conducta segregacional de los cromosomas derivados de los trivalentes, determinó que por trivalente sólo un 10% de las espermátidas redondas de los heterocigotos Rb $2n=32$ presentaban aneuploidías. Estos resultados contribuirían a reforzar la idea que la mayoría de las células meióticas con desbalance cromosómico no lograrían sobrepasar el "checkpoint" de la metafase.

En estudios similares realizados en humanos portadores balanceados de un cromosoma Rb indican que los espermatozoides con desbalance cromosómico se encuentran en bajos porcentajes (Anahory *et al.*; Moradkhani *et al.*). Anahory *et al.* encontraron una frecuencia de 86 % de espermatozoides normales y balanceados como resultado de una segregación alterna y de 12,79 % gametos desbalanceados como resultado de una segregación adyacente. De esta manera, los varones portadores de un cromosoma Rb, tienen una alta probabilidad de tener una descendencia sana ya que la mayoría de sus gametos son normales o balanceados. Según nuestras observaciones en heterocigotos Rb múltiples de *Mus*, posiblemente, esto se debería a que selectivamente se eliminan en metafase los espermatozoides con alteraciones cromosómicas que podrían dar lugar a gametos aneuploides.

CONCLUSIONES

Mus m. domesticus $2n=32$ heterocigotos portadores de ocho cromosomas metacéntricos

Rbs, aunque fértiles, presentan menor número de células germinales, altura del epitelio seminífero y diámetro tubular que *Mus* $2n=40$ y $2n=24$.

Los ejemplares de *Mus* $2n=40$, $2n=24$ y $2n=32$ presentan la misma cantidad de espermatozoides en paquiteno por túbulo seminífero, lo que sugiere que la presencia de cromosomas metacéntricos Rbs no produce eliminación selectiva de espermatozoides en profase I de la meiosis.

El número de espermátidas tempranas en *Mus* $2n=32$ es significativamente menor que el número de éstas células encontradas en los *Mus* parentales $2n=40$ y $2n=24$.

La razón numérica de 1: de espermatozoides: espermátidas en los híbridos $2n=32$, en alternativa a la esperada de 1:4, se debería principalmente a una reducción del número de espermátidas tempranas por la pérdida selectiva de espermatozoides en metafase.

La muerte de células germinales en *Mus* $2n=32$ es estadio-específica, ya que la detección de células en apoptosis con caspasa 3 activa se concentra en el estadio XII del epitelio seminífero de éstos híbridos.

En los heterocigotos $2n=32$, los espermatozoides en apoptosis, principalmente se encontraban en metafase lo que sugiere que su eliminación fue en respuesta al "checkpoint" meiótico de esa etapa.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la enriquecedora e inestimable experiencia de haber trabajado y cultivado una prolongada amistad con nuestro querido colega y maestro Dr. Eduardo Bustos Obregón.

Agradecemos también a los Drs. Carlo Redi y Silvia Garagna de la Universidad de Pavía, Italia quienes, como parte de un proyecto colaborativo de Investigación, generosamente nos donaron ejemplares machos y hembras de poblaciones naturales de *Mus musculus domesticus*.

GONZÁLEZ, M.; FERNÁNDEZ-DONOSO, R. & BERRÍOS, S. Apoptosis in spermiogenesis of multiple Robertsonian heterozygotes of *Mus musculus domesticus*. *Int. J. Med. Surg. Sci.*, 2(4):589-601, 2015.

SUMMARY: *Mus musculus domesticus* is a species that is characterized by a diploid number of 40 chromosomes, all telocentrics (acrocentrics). In natural populations of *Mus* with high frequency Robertsonian chromosome translocations (RBs), a fusion at centromere-level between two autosomal telocentric, producing metacentric Rb chromosomes and a variety of natural subspecies with diploid chromosome numbers below 40. Rb chromosomes do not affect the viability of individuals but mainly fertility of Rb heterozygotes. In their meiosis the metacentric Rb and the homologous telocentrics form trivalents that have problems in synapsis and segregation. This paper presents a comparative analysis of spermatogenesis considering the stages of the epithelium and the number of germ cells loss by apoptosis comparing heterozygote males 2n=32, carriers 8 trivalents, and homozygotes 2n=40 and 2n=24. It was found that the number of spermatocytes in first prophase was similar in the different seminiferous epithelium stages in all the chromosome constitutions. In the 2n=32 heterozygotes a significant decreased number of spermatids was reflected in the proportion of spermatocytes and spermatids that was 1:1.7. In the homozygote males rare germ cell in apoptosis (positive for caspase 3) were observed, which were mainly concentrated in the XII stage of the seminiferous epithelium. In heterozygote spermatocytes apoptotic germ cell number was significantly higher than that registered in homozygote males, and generally correspond to spermatocytes in meiotic divisions. This selective removal of cells possibly carrying anomalies, either in chromosome alignment or segregation, is consistent with the smaller number of spermatids and the relative sub-fertility observed in 2n=32 Rb heterozygotes.

KEY WORDS: Spermiogenesis; Apoptosis; Rb heterozygotes; *Mus musculus domesticus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abercrombie, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, 94:239-47, 1946.
- Anahory, T.; Hamamah, S.; Andréo, B.; Hédon, B.; Claustres, M.; Sarda, P. & Pellestor, F. Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian translocation carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting. *Hum. Reprod.*, 20(7):1850-4, 2005.
- Anton, E.; Blanco, J.; Egozcue, J. & Vidal, F. Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10). *Hum. Reprod.*, 19(6):1345-51, 2004.
- Barchi, M.; Mahadevaiah, S.; Di Giacomo, M.; Baudat, F.; de Rooij, D. G.; Burgoyne, P. S.; Jasin, M. & Keeney, S. Surveillance of different recombination defects in mouse spermatocytes yields distinct responses despite elimination at an identical developmental stage. *Mol. Cell Biol.*, 25(16):7203-15, 2005.
- Berríos, S.; Manieu, C.; López-Fenner, J.; Ayarza, E.; Page, J.; González, M.; Manterola, M. & Fernández-Donoso, R. Robertsonian chromosomes and the nuclear architecture of mouse meiotic prophase spermatocytes. *Biol. Res.*, 47:16, 2014.
- Borg, C. L.; Wolski, K. M.; Gibbs, G. M. & O'Bryan, M. K. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'. *Hum. Reprod. Update*, 16(2):205-24, 2010.
- Burgoyne, P. S.; Mahadevaiah, S. K. & Turner, J. M. The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.*, 10(3):207-16, 2009.
- Castiglia, R. & Capanna, E. Contact zone between chromosomal races of *Mus musculus domesticus*. 2. Fertility and segregation in laboratory-reared and wild mice heterozygous for multiple robertsonian rearrangements. *Heredity (Edinb.)*, 85(Pt. 2):147-56, 2000.
- Cohen, P. E.; Pollack, S. E. & Pollard, J. W. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. *Endocr. Rev.*, 27(4):398-426, 2006.
- de Rooij, D. G. & de Boer, P. Specific arrests of spermatogenesis in genetically modified and mutant mice. *Cytogenet. Genome Res.*, 103(3-4):267-76, 2003.
- Eaker, S.; Pyle, A.; Cobb, J. & Handel, M. A. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J. Cell Sci.*, 114(Pt. 16):2953-65, 2001.
- Fernández-Donoso, R. La arquitectura del núcleo y los reordenamientos cromosómicos en los mamíferos. *Museo Nacional de Historia Natural, Publicación Occasional*, 38:165-95, 1982.
- Garagna, S.; Zuccotti, M.; Thornhill, A.; Fernandez-Donoso, R.; Berríos, S.; Capanna, E. & Redi, C. A. Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *J. Cell Sci.*, 114(Pt. 24):4429-34, 2001.
- Garagna, S.; Page, J.; Fernandez-Donoso, R.; Zuccotti, M. & Searle, J. B. The Robertsonian phenomenon in

- the house mouse: mutation, meiosis and speciation. *Chromosoma*, 123(6):529-44, 2014.
- Hauffe, H. C. & Searle, J. B. Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from Northern Italy. *Genetics*, 150(3):1143-54, 1998.
- Hamer, G.; Novak, I.; Kouznetsova, A. & Höög, C. Disruption of pairing and synapsis of chromosomes causes stage-specific apoptosis of male meiotic cells. *Theriogenology*, 69(3):333-9, 2008.
- King, M. *Species Evolution: The Role of Chromosome Change*. New York, Cambridge University Press, 1993.
- Lee, N. P.; Leung, K. W.; Wo, J. Y.; Tam, P. C.; Yeung, W. S. & Luk, J. M. Blockage of testicular connexins induced apoptosis in rat seminiferous epithelium. *Apoptosis*, 11(7):1215-29, 2006.
- McManus, J. F. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158:202, 1946.
- Manieu, C.; González, M.; López-Fenner, J.; Page, J.; Ayarza, E.; Fernández-Donoso, R. & Berríos, S. Aneuploidy in spermatids of Robertsonian (Rb) chromosome heterozygous mice. *Chromosome Res.*, 22(4):545-57, 2014.
- Manterola, M.; Page, J.; Vasco, C.; Berríos, S.; Parra, M. T.; Viera, A.; Rufas, J. S.; Zuccotti, M.; Garagna, S. & Fernández-Donoso, R. A high incidence of meiotic silencing of unsynapsed chromatin is not associated with substantial pachytene loss in heterozygous male mice carrying multiple simple robertsonian translocations. *PLoS Genet.*, 5(8):e1000625, 2009.
- Medarde, N.; Merico, V.; López-Fuster, M. J.; Zuccotti, M.; Garagna, S. & Ventura, J. Impact of the number of Robertsonian chromosomes on germ cell death in wild male house mice. *Chromosome Res.*, 23(2):159-69, 2015.
- Merico, V.; Pigozzi, M. I.; Esposito, A.; Merani, M. S. & Garagna, S. Meiotic recombination and spermatogenic impairment in *Mus musculus domesticus* carrying multiple simple Robertsonian translocations. *Cytogenet. Genome Res.*, 103(3-4):321-9, 2003.
- Merico, V.; de Barboza, G. D.; Vasco, C.; Ponce, R.; Rodríguez, V.; Garagna, S. & Tolosa de Talamoni, N. A mitochondrial mechanism is involved in apoptosis of Robertsonian mouse male germ cells. *Reproduction*, 135(6):797-804, 2008.
- Moradkhani, K.; Puechberty, J.; Bhatt, S.; Lespinasse, J.; Vago, P.; Lefort, G.; Sarda, P.; Hamamah, S. & Pellestor, F. Rare Robertsonian translocations and meiotic behaviour: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocations: a case report. *Human Reprod.*, 21(12):3193-8, 2006.
- Odorisio, T.; Rodríguez, T. A.; Evans, E. P.; Clarke, A. R. & Burgoyne, P. S. The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nat. Genet.*, 18(3):257-61, 1998.
- Piálek, J.; Hauffe, H. C. & Searle, J. B. Chromosomal variation in the house mouse. *Biol. J. Linn. Soc.*, 84(3):535-63, 2005.
- Rieseberg, L. H. Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends Ecol. Evol.*, 16(7):351-8, 2001.
- Russell, L. D.; Sinha Hikim, A. P. & Ettlín, R. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. St. Louis, Cache River Press, 1990.
- Sans-Fuentes, M. A.; García-Valero, J.; Ventura, J. & López-Fuster, M. J. Spermatogenesis in house mouse in a Robertsonian polymorphism zone. *Reproduction*, 140(4):569-81, 2010.
- Shaha, C.; Tripathi, R. & Mishra, D. P. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 365(1546):1501-15, 2010.
- Sinha Hikim, A. P. & Swerdloff, R. S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev. Reprod.*, 4(1):38-47, 1999.
- Turner, J. M.; Mahadevaiah, S. K.; Fernández-Capetillo, O.; Nussenzweig, A.; Xu, X.; Deng, C. X. & Burgoyne, P. S. Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nat. Genet.*, 37(1):41-7, 2005.
- Turner, L. M.; Schwahn, D. J. & Harr, B. Reduced male fertility is common but highly variable in form and severity in a natural house mouse hybrid zone. *Evolution*, 66(2):443-58, 2012.
- Wallace, B. M.; Searle, J. B. & Everett, C. A. The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytogenet. Genome Res.*, 96(1-4):276-86, 2002.
- Zhuang, X.; Huang, J.; Jin, X.; Yu, Y.; Li, J.; Qiao, J. & Liu, P. Chromosome aberrations and spermatogenic disorders in mice with Robertsonian translocation (11; 13). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 7(11):7735-43, 2014.

Dirección para Correspondencia:

Soledad Berríos
Universidad de Chile
Independencia 1027
Santiago
CHILE

Recibido : 28-09-2015
Aceptado: 22-11-2015

Email: sberrios@med.uchile.cl