

CAPÍTULO 3

ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS TRANSLOCACIONES ROBERTSONIANAS EN LA ESPERMATOGÉNESIS

3.1. INTRODUCCIÓN

En *M. domesticus* el proceso de la producción de gametos se inicia en la fase embrionaria alrededor de los 11 días y medio después de la fecundación, cuando las células germinales primordiales (PGC), localizadas en el saco vitelino adosado al alantoides, colonizan la cresta genital. Las PGC proliferan, algunas sufren apoptosis, y el resto llega a la fase de células germinales embrionarias (EG). Éstas se mantienen quiescentes como T-proespermatogonias hasta después del nacimiento, cuando son reactivadas e inician la espermatogénesis (McLaren & Southee, 1997). La primera ola de espermatogénesis empieza cuando las T-proespermatogonias se diferencian en espermatogonias A_{is} (*isolated*), entre el nacimiento y el día 3 en el ratón (Vergouwen *et al.*, 1993). En este período se desarrollan también las uniones estrechas entre células de Sertoli, que son la base de la barrera hematotesticular, que se establece en el día 16 después del nacimiento (Nagano & Suzuki, 1976). Las espermatogonias A_{is} se dividen por mitosis obteniéndose dos espermatogonias A_{pr} (*paired*), cuya proliferación da lugar a cadenas de espermatogonias A_{al} (*aligned*). Una pequeña parte de las espermatogonias A_{al} interviene, mediante divisiones mitóticas, en el mantenimiento de la población celular, produciendo nuevas espermatogonias A_{al} . El resto se diferencian en espermatogonias A_1 , las cuales sufren cinco divisiones mitóticas generando secuencialmente espermatogonias A_2 - A_4 , intermedias, y tipo B. Después de la última división de las espermatogonias de tipo B, empieza la meiosis dando lugar a los espermatocitos en preleptoteno (día 10), que se diferencian sucesivamente en espermatocitos en leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno, completándose así la profase. Las células en diploteno se dividen para formar los espermatocitos secundarios (primera división meiótica) que rápidamente dan lugar a las espermátidas de tipo I (segunda división meiótica). Éstas marcan el inicio de la espermiogénesis (figura 3.1). En *M. domesticus*, las primeras espermátidas haploides aparecen alrededor del día 20 y hacia el día 35 ya se pueden detectar los primeros espermatozoides en el lumen de los túbulos seminíferos (Vergouwen *et al.*, 1993). En función de la morfología de las espermátidas, la espermatogénesis se puede subdividir en diferentes asociaciones celulares denominadas estadios. En el ratón casero se han descrito 16 tipos de espermátidas y 12 estadios (véase apartado 3.2.2.2).

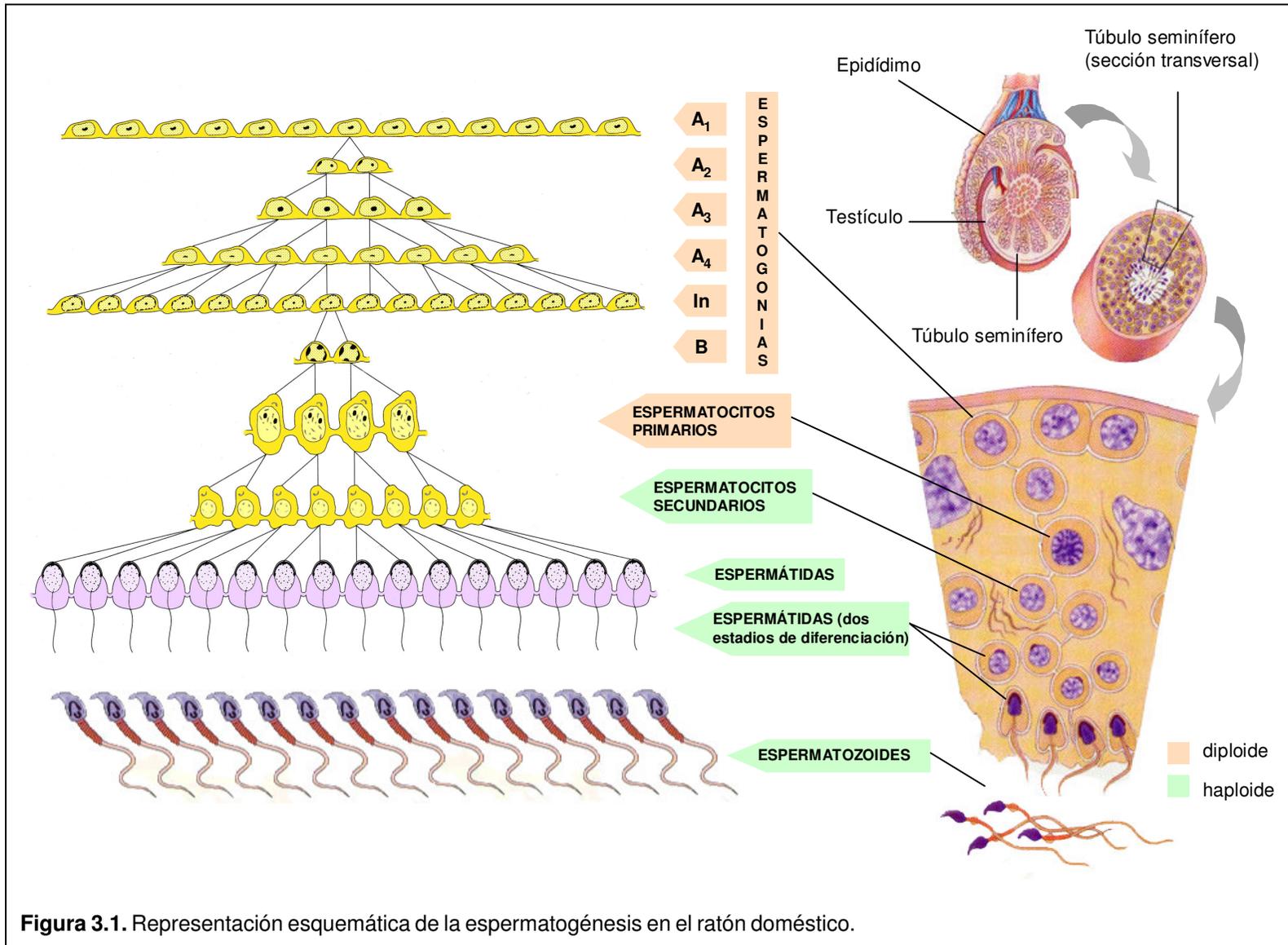


Figura 3.1. Representación esquemática de la espermatogénesis en el ratón doméstico.

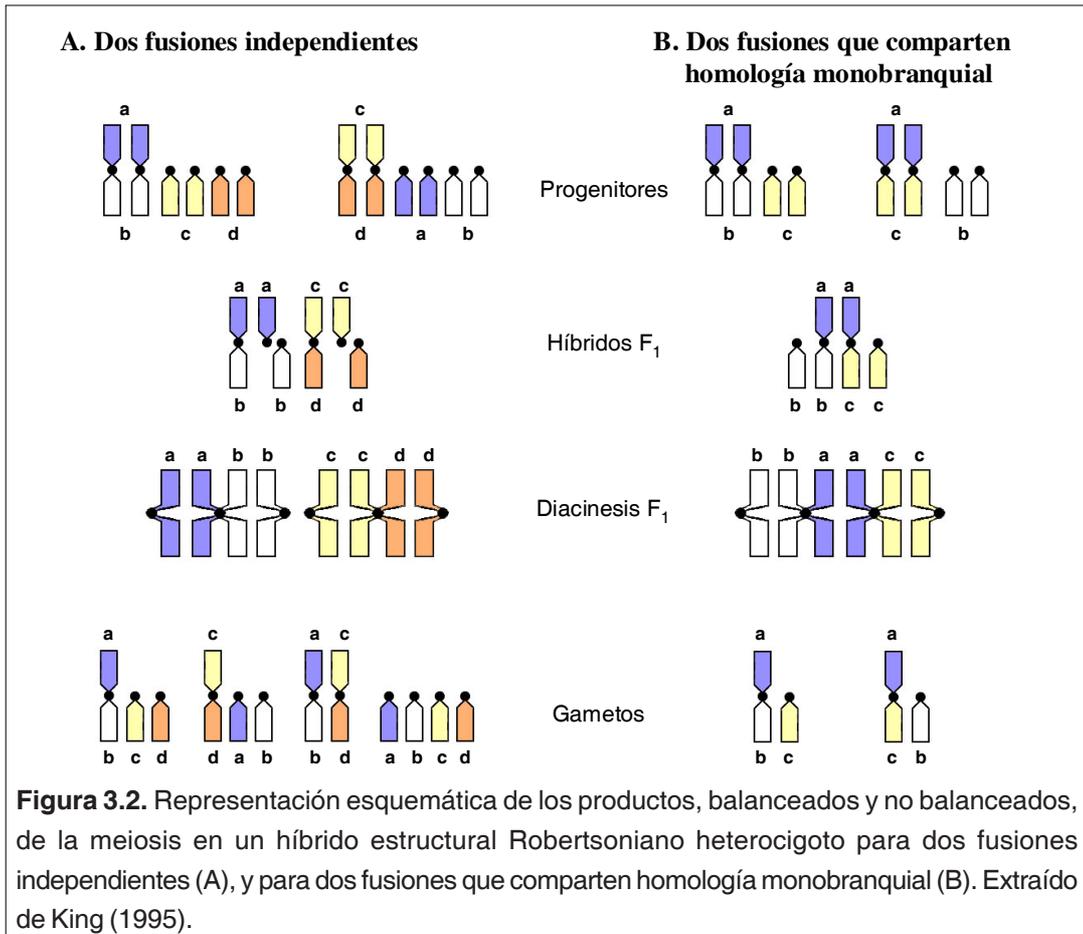
Durante la primera espermatogénesis de la vida de un mamífero se produce una elevada muerte celular (apoptosis), posiblemente debido a un ajuste del número de células germinales que pueden ser mantenidas por las células de Sertoli (Roosen-Runge, 1973). En los adultos, la espermatogénesis se caracteriza por una maduración continua de las células germinales hacia el centro de los túbulos seminíferos. La apoptosis también continúa en el estado adulto. Se estima que un 75% de los espermatozoides potenciales degeneran en los testículos de los mamíferos adultos (Huckins, 1978; citado en Print & Loveland, 2000). En los testículos de los roedores, la apoptosis se detecta ya en el decimocuarto día del embrión (Miething, 1992; Jeyaraj *et al.*, 2003). Los espermatoцитos que no completan la meiosis son eliminados selectivamente por apoptosis, como por ejemplo los espermatoцитos con segmentos de cromosomas, en los que no se ha producido correctamente la sinapsis. También son eliminadas las espermatogonias dañadas y las espermátidas haploides (Print & Loveland, 2000). El reconocimiento de las células no viables se produce gracias a unos mecanismos de control (*checkpoints*) que velan por la calidad cromosómica de los gametos que se forman (Eaker *et al.*, 2001). Las células germinales apoptóticas son transportadas al lumen del túbulo o bien fagocitadas por las células de Sertoli. Estas últimas juegan un papel importante tanto en el desarrollo del testículo como en su función, ya que secretan una serie de proteínas implicadas en la diferenciación, proliferación y metabolismo de las células germinales (Griswold, 1988; Skinner, 1991; Jégou, 1993), y les proporcionan un entorno adecuado para su diferenciación en gametos viables. Las células de Sertoli también determinan el tamaño del testículo y el número de espermatozoides producidos (Orth *et al.*, 1988; Russel *et al.*, 1990b). En el túbulo seminífero las células espermatogénicas están en continuo contacto con las células de Sertoli, que ejercen una variedad de funciones cruciales para la diferenciación de las células germinales (Jégou, 1993). Estudios recientes han demostrado que las células germinales pueden también modular el estado funcional de las células de Sertoli (Jégou, 1993; Syed & Hecht, 1997).

El estudio de la espermatogénesis en heterocigotos Robertsonianos ha demostrado que tanto los estadios premeióticos como los meióticos están alterados y que estas alteraciones son más importantes en los heterocigotos múltiples que en los simples. Tres fases principales parecen particularmente sensibles y pueden explicar: i) el deterioro de la espermatogénesis

en cualquier estadio del proceso y, ii) la aparición de estadios atípicos, es decir, con asociaciones celulares desordenadas a lo largo del ciclo del epitelio seminífero. Una primera fase es a nivel premeiótico, cuando el número de espermatogonias proliferativas (A_{pr} y A_{al}) se reduce (Redi *et al.*, 1985). Una segunda fase se produce a nivel meiótico, en la que la mayoría de espermatocitos en paquiteno son incapaces de seguir unos patrones de citodiferenciación normales (Redi *et al.*, 1985). Finalmente, una tercera fase de la alteración del proceso se da a nivel de la espermiogénesis, cuando las espermátidas experimentan cambios morfológicos y fisiológicos, pudiéndose producir una reducción drástica del número de espermátidas, relacionado con una alta proporción de espermátidas aneuploides que aparecen después de la segunda división meiótica (Redi & Capanna, 1988).

Se ha enfatizado especialmente la desventaja en la reproducción de los heterocigotos como una de las posibles fuerzas selectivas en las zonas híbridas Robertsonianas, debido a la aparición de aberraciones meióticas (Wallace *et al.*, 1991, 1992; Wallace & Searle, 1994; Hauffe & Searle, 1998). En particular, se han estudiado dos tipos de heterocigotos Robertsonianos: i) los “simples” caracterizados por uno o más metacéntricos, cada uno complementado por su pareja de homólogos acrocéntricos, y que forman trivalentes en la meiosis I, y ii) los “complejos” caracterizados por uno o más metacéntricos, algunos de los cuales presentan algún brazo cromosómico en común, y que forman anillos o cadenas de cuatro o más elementos en la meiosis I (figura 3.2). Se han postulado cuatro mecanismos como principales responsables del deterioro de la gametogénesis y de la reducción de la fertilidad en los portadores de fusiones Robertsonianas en heterocigosis:

- Procesos de no-disyunción meiótica, que conllevan a la producción de gametos no balanceados que darán lugar a su vez a cigotos aneuploides que serán eliminados (Gropp *et al.*, 1982a; 1982b).
- Un apareamiento defectivo de los cromosomas Robertsonianos en la sinapsis puede provocar una expresión génica inapropiada para este estadio de la meiosis y dar lugar a la muerte de células germinales (Miklos, 1974; Burgoyne & Baker, 1984).
- Un error del apareamiento entre los metacéntricos Robertsonianos y sus respectivos homólogos acrocéntricos puede conllevar a la asociación de segmentos autosómicos



no apareados con los cromosomas sexuales, que afecta el proceso de inactivación del cromosoma X con sus correspondientes efectos en la fertilidad (Lifschytz & Lindsley, 1972; Forejt, 1974; Cattanach, 1975).

- La incompatibilidad génica, es decir, interacciones desventajosas de diferentes genomas en los híbridos, puede causar también perturbaciones fisiológicas de las células germinales con un incremento de la probabilidad de muerte celular (Cattanach & Moseley, 1973; Gropp & Winking, 1981; Mahadevaiah *et al.*, 1990; Searle, 1993; Winking *et al.*, 2000).

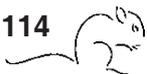
Los efectos de viabilidad y fertilidad de este tipo de reordenaciones han sido investigados extensamente utilizando tres aproximaciones:

- Cruzamientos en el laboratorio entre animales de diferente cariotipo capturados en el medio natural para estimar los efectos de la segregación meiótica y de la fertilidad en los híbridos F₁.

3.1. INTRODUCCIÓN

- Estudio de los efectos de viabilidad y fertilidad en cepas de ratones de laboratorio que han generado de manera espontánea fusiones cromosómicas, o en cepas de laboratorio en las que se han introducido determinadas fusiones Robertsonianas mediante cruzamiento con individuos procedentes de poblaciones naturales que presentaban dichas fusiones.
- Estudio de los efectos de fertilidad en poblaciones naturales de híbridos.

A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre las consecuencias de la presencia de las fusiones Robertsonianas en la meiosis en el ratón doméstico (White, 1978; Baker & Bickham, 1986; Everett *et al.*, 1996; Castiglia & Capanna, 2000), existen pocos estudios histológicos detallados de los efectos de estas mutaciones sobre la espermatogénesis en poblaciones naturales en esta especie (Wallace *et al.*, 1992; Hauffe & Searle, 1998; Wallace *et al.*, 2002). Muchos de los trabajos encontrados en la bibliografía corresponden a investigaciones realizadas en cepas de laboratorio en las que se han introducido, mediante retrocruzamientos, metacéntricos Robertsonianos procedentes de poblaciones naturales (Cattanach & Moseley, 1973; Capanna *et al.*, 1976; Mahadevaiah *et al.*, 1990; Garagna *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este tipo de análisis deben ser interpretados con precaución, puesto que pueden ser consecuencia de incompatibilidades entre contextos genéticos (*genetic background*) y no reflejar los procesos naturales (Britton-Davidian *et al.*, 1990). Los estudios en poblaciones naturales son de gran relevancia para entender el origen y el mantenimiento de la diversidad Robertsoniana en el medio. Los animales establecidos en zonas híbridas han estado expuestos a diversas generaciones de selección natural, por lo que es esperable que se minimicen las aberraciones meióticas en los heterocigotos Robertsonianos. En concreto, la estructura de las zonas híbridas y la extensión de éstas, las cuales forman una barrera en el flujo genético entre razas, están parcialmente determinadas por el grado de selección en contra de los heterocigotos. Se cree que la presencia de una a tres fusiones en heterocigosis no representa importantes alteraciones en la reproducción, lo que sugiere que, en condiciones naturales, estas reordenaciones no son muy efectivas como barrera reproductora (Searle, 1984, 1986; Winking *et al.*, 1988; Britton-Davidian *et al.*, 1990; Nachman, 1992; Wallace *et al.*, 1992). Sin embargo, poblaciones que han acumulado siete, ocho o incluso nueve fusiones presentan una gran reducción de



la fertilidad (Tettenborn & Gropp, 1970; Winking & Gropp, 1976; Winking, 1980; Hauffe & Searle, 1998). En este caso el grado de disminución de la eficacia biológica es importante puesto que podría contribuir a la interrupción del flujo genético entre poblaciones Robertsonianas y quizás dar lugar a la especiación, generando una presión selectiva en los cruzamientos al azar.

En el presente trabajo se realiza un análisis detallado de la gametogénesis en machos de *Mus domesticus* pertenecientes a la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona. El estudio se ha realizado en cuatro grupos de animales con translocaciones Robertsonianas y un grupo de ejemplares estándar. De los cuatro grupos Robertsonianos, uno está formado por individuos con homocigosidad estructural, y los otros tres por ejemplares con heterocigosidad independiente, en el que los animales presentan de una a tres fusiones en heterocigosis. Se pretende comparar la proporción de muerte de células germinales entre los diferentes grados de polimorfismo Robertsoniano. Los estudios de fertilidad realizados en heterocigotos simples son escasos, centrándose la mayoría de ellos en heterocigotos simples con una fusión o con un número de fusiones comprendido entre cuatro y nueve (Searle, 1993; Saïd *et al.*, 1993; Castiglia & Capanna, 2000; Wallace *et al.*, 2002). Es por ello que los resultados aquí obtenidos contribuirán a aportar más datos sobre las consecuencias de los metacéntricos Robertsonianos en la fertilidad, sobre todo cuando están presentes en heterocigosis en bajo número. El hecho de que este estudio se centre únicamente en los machos se debe a la dificultad en la detección de anormalidades en secciones histológicas de los ovarios de hembras adultas. La falta de mecanismos severos de control (*checkpoints*) permite la presencia de células defectivas en el ovario que no son eliminadas por apoptosis, por lo que resulta más complicada la cuantificación de la muerte celular en las hembras (Gropp *et al.*, 1982b; Eaker *et al.*, 2001).

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Muestra analizada

La eficacia reproductora se evaluó mediante el estudio de la espermatogénesis en animales procedentes de la zona estándar y de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona. Previamente a la elección de los ejemplares, se establecieron 5 categorías atendiendo al número cromosómico y al número de fusiones en heterocigosis. Para cada categoría se seleccionaron 5 animales, capturados entre abril y septiembre de 1998, de características reproductoras similares, estimadas según los siguientes criterios:

- Masa corporal: peso del individuo obtenido inmediatamente después de ser sacrificado.
- Longitud corporal: medida tomada desde el extremo del hocico hasta el origen de la cola.
- Estado de actividad sexual: determinado a partir de la extensión del contenido testicular y epidídimo derecho por el método descrito en Gosálbez *et al.* (1979).

Con el objetivo de determinar si la presencia de las fusiones Robertsonianas en heterocigosis tenían el mismo efecto que en homocigosis sobre la reproducción, o si el número de fusiones Robertsonianas incrementaba el deterioro sobre ésta, se establecieron las siguientes categorías (tabla 3.1):

- Estándar (40ST): animales con dotación cromosómica $2n=40$ procedentes de localidades formadas íntegramente por animales estándar (n^{os} 313, 316, 317, 318, 319).
- Homocigotos estructurales (HH): animales con todas las fusiones Robertsonianas en homocigosis y dotación cromosómica diploide comprendida entre 28 y 30 (n^{os} 194, 224, 250, 255, 288).
- Heterocigotos I-31 (HTI-31): ejemplares con una fusión Robertsoniana en heterocigosis y cuatro en homocigosis, y con un número cromosómico $2n=31$ (n^{os} 189, 195, 218, 241, 279).
- Heterocigotos I-39 (HTI-39): individuos con una fusión Robertsoniana en heterocigosis y $2n=39$ cromosomas (n^{os} 168, 335, 336, 349, 351).

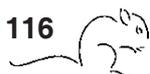


Tabla 3.1. Características biológicas y citogenéticas de los animales analizados

| Nº animal | Fecha de captura | Localidad | 2n | Peso Corporal (gr) | Longitud del cuerpo (mm) | Ø sagital del testículo (mm) | Ø transversal del testículo (mm) | Peso del testículo (mg) | Longitud de la vesícula seminal (mm) | Cromosomas metacéntricos | |
|---------------|------------------|------------------------|----|--------------------|--------------------------|------------------------------|----------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------|
| | | | | | | | | | | Homocigotos | Heterocigotos |
| <i>40ST</i> | | | | | | | | | | | |
| 313 | Septiembre | Fulleda | 40 | 18,00 | 88,00 | 8,15 | 4,60 | 86,54 | 9,31 | - | - |
| 316 | Septiembre | Fulleda | 40 | 18,00 | 88,00 | 7,82 | 4,40 | 76,74 | 9,74 | - | - |
| 317 | Septiembre | Fulleda | 40 | 19,50 | 87,00 | 7,76 | 5,35 | 109,63 | 9,05 | - | - |
| 318 | Septiembre | Fulleda | 40 | 19,00 | 93,00 | 7,63 | 4,29 | 71,64 | 9,62 | - | - |
| 319 | Septiembre | Fulleda | 40 | 20,00 | 88,00 | 7,60 | 4,96 | 93,29 | 11,05 | - | - |
| <i>HH</i> | | | | | | | | | | | |
| 194 | Mayo | Sant Pau d'Ordal | 28 | 22,50 | 90,00 | 7,70 | 4,50 | 78,85 | 9,36 | 3.8, 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 | - |
| 224 | Junio | Sant Pau d'Ordal | 30 | 18,50 | 87,00 | 6,99 | 4,70 | 78,14 | 8,22 | 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 | - |
| 250 | Junio | Sant Pau d'Ordal | 28 | 13,00 | 79,00 | 7,58 | 3,92 | 60,50 | 6,36 | 3.8, 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 | - |
| 255 | Junio | Garraf | 28 | 14,50 | 81,00 | 5,95 | 4,06 | 51,95 | 9,96 | 3.8, 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 | - |
| 288 | Agosto | Garraf | 28 | 21,00 | 94,00 | 8,48 | 4,94 | 102,58 | 11,27 | 3.8, 4.14, 5.15, 6.10, 9.11, 12.13 | - |
| <i>HTI-31</i> | | | | | | | | | | | |
| 189 | Mayo | Sant Pau d'Ordal | 31 | 24,00 | 94,00 | 7,00 | 4,00 | 58,42 | 9,50 | 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 | 3.8 |
| 195 | Mayo | Sant Pau d'Ordal | 31 | 21,50 | 94,00 | 7,50 | 3,80 | 56,70 | 9,50 | 4.14, 5.15, 6.10, 12.13 | 9.11 |
| 218 | Mayo | La Granada | 31 | 17,00 | 83,00 | 7,97 | 4,44 | 79,40 | 9,78 | 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 | 6.10 |
| 241 | Junio | Sant Pau d'Ordal | 31 | 20,00 | 90,00 | 6,26 | 3,44 | 40,79 | 11,08 | 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 | 3.8 |
| 279 | Julio | Vilanova i la Geltrú I | 31 | 16,25 | 83,00 | 7,43 | 4,39 | 72,93 | 10,68 | 4.14, 5.15, 9.11, 12.13 | 3.8 |
| <i>HTI-39</i> | | | | | | | | | | | |
| 168 | Abril | Les Pobles | 39 | 16,00 | 87,00 | 6,72 | 3,65 | 47,97 | 7,69 | - | 12.13 |
| 335 | Septiembre | Bellaterra (UAB) | 39 | 21,00 | 86,00 | 7,14 | 4,61 | 76,90 | 9,81 | - | 5.15 |
| 336 | Septiembre | Bellaterra (UAB) | 39 | 23,00 | 90,00 | 8,12 | 4,96 | 99,24 | 10,49 | - | 4.14 |
| 349 | Septiembre | Bellaterra (UAB) | 39 | 19,50 | 81,00 | 7,11 | 4,57 | 75,39 | 6,86 | - | 4.14 |
| 351 | Septiembre | Bellaterra (UAB) | 39 | 19,00 | 81,00 | 7,39 | 4,26 | 68,70 | 9,28 | - | 5.15 |
| <i>HTIII</i> | | | | | | | | | | | |
| 166 | Abril | Les Pobles | 37 | 18,00 | 93,00 | 6,60 | 4,47 | 67,66 | 9,23 | - | 4.14, 5.15, 12.13 |
| 191 | Mayo | Sant Pau d'Ordal | 31 | 20,00 | 86,00 | 6,50 | 4,00 | 54,70 | 9,60 | 4.14, 5.15, 12.13 | 3.8, 6.10, 9.11 |
| 204 | Mayo | Calafell | 35 | 15,00 | 83,00 | 6,66 | 4,10 | 58,40 | 8,08 | 12.13 | 4.14, 5.15, 9.11 |
| 221 | Mayo | Calafell | 35 | 19,00 | 84,00 | 7,16 | 4,00 | 59,61 | 8,20 | 12.13 | 4.14, 5.15, 9.11 |
| 284 | Agosto | Garraf | 29 | 15,00 | 75,00 | 7,30 | 4,70 | 81,33 | 9,40 | 3.8, 5.15, 9.11, 12.13 | 4.14, 6.10, 7.17 |

- Heterocigotos III (HTIII): animales con tres fusiones en heterocigosis y de una a cuatro en homocigosis. Número cromosómico comprendido entre 29 y 37 (n^{os} 166, 191, 204, 221, 284).

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Histología

El análisis histológico se realizó utilizando el testículo izquierdo, que fue fijado por inmersión en una solución acuosa de formol al 4%. Las muestras fueron incluidas en parafina siguiendo un protocolo estándar de histología (Durfort, 1977) y con posterior obtención de cortes transversales seriados de 5 μm de grosor mediante un micrótopo de rotación (MICROM HM 330). Las secciones fueron teñidas con la técnica del P. A. S (ácido periódico-Schiff) y contrastadas con hematoxilina (Leblond & Clermont, 1952).

3.2.2.2. Estrategia muestral y obtención de datos

Se diseñó una estrategia muestral con el objeto de estimar el número de espermátocitos primarios en paquitenos respecto a espermátidas redondas, el número de células de Sertoli, la proporción de epitelio respecto al área total del túbulo seminífero y el diámetro del túbulo.

La estimación de dichos parámetros se realizó a partir de los datos obtenidos mediante un muestreo jerarquizado de tipo multifásico. Éste presenta dos características fundamentales: 1) cada fase corresponde a un nivel de organización tisular, en el que el objeto de estudio representa el espacio de referencia para el espacio inferior, y 2) en cada estrato se amplía de manera creciente el tamaño muestral. Esta compartimentación muestral es muy adecuada para el presente estudio ya que los parámetros de interés alcanzan el nivel celular, lo que requiere una gran amplificación para ser estimados. Los estratos analizados fueron tres (figura 3.3): espacio Ω_0 (el testículo), espacio Ω_1 (la sección histológica observada a 40 aumentos) y espacio Ω_2 (túbulo seminífero observado a 400 aumentos).

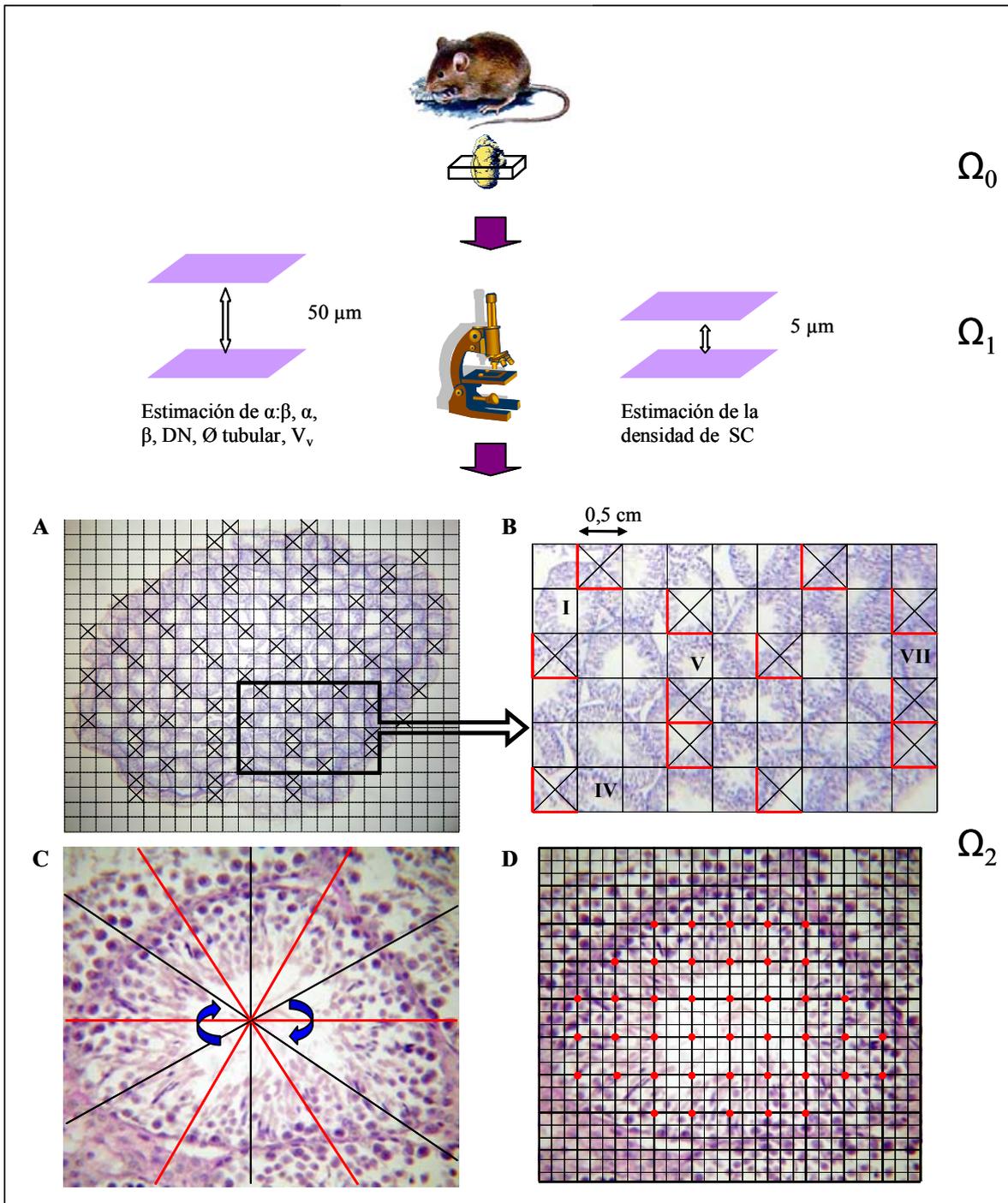


Figura 3.3. Muestreo jerarquizado de tipo multifásico. A: sección histológica observada a 40 aumentos proyectada sobre una cuadrícula con una unidad básica de 0,5 cm de lado. Las cruces corresponden a los cuadrados seleccionados (uno de cada cinco de la cuadrícula confinada en la sección histológica). B: sección histológica observada a 100 aumentos. Los números romanos indican los túbulos interceptados por los cuadrados seleccionados. Los límites de exclusión están marcados en rojo. C: sección transversal de un túbulo seminífero (400 aumentos) proyectado sobre un retículo de 12 sectores radiales. El primer sector se escogió al azar y a partir de éste se seleccionó, de izquierda a derecha, uno de cada dos. Las células que tocan la línea de exclusión (en rojo) no se consideran. D: Proyección de la imagen del túbulo seminífero sobre una red coherente de puntos equidistantes. En rojo se muestran los puntos que se contabilizan para la estimación de las áreas.

Espacio Ω_0

El espacio inicial del que partía el presente estudio era el nivel orgánico, el testículo. En este estrato se obtuvieron el peso y los diámetros sagital y transversal del testículo izquierdo de cada uno de los ejemplares, así como el tamaño de la vesícula seminal. Este último se determinó como la longitud desde el punto de unión de los dos lóbulos hasta el punto más extremo de su curvatura. Todas estas medidas fueron comparadas entre grupos. Puesto que en individuos de edad temprana los tamaños testicular y vesicular pueden estar relacionados con el peso del individuo, también se compararon entre grupos estos valores relativos a la masa corporal.

Espacio Ω_1

La cuantificación de los parámetros reproductivos obtenidos a partir de este nivel muestral requería secciones transversales de los túbulos seminíferos. Tomando como referencia de seccionamiento el diámetro sagital, se realizó un estudio previo de la homogeneidad de la organización histológica. Se comprobó que las zonas distales del testículo mostraban una elevada proporción de secciones longitudinales de túbulos, a causa del elevado número de circunvoluciones que se producían en esta área. Para evitar la obtención de este tipo de secciones, sólo se realizaron cortes histológicos seriados en el tercio central del testículo, despreciándose los dos tercios extremos. Para cada animal se examinaron tres secciones seleccionadas por muestreo sistemático aleatorio. Dentro de la serie las dos primeras secciones fueron consecutivas, separadas a 5 μm , mientras que la tercera se situó a 50 μm de distancia de la segunda (figura 3.3). La primera sección fue seleccionada al azar, dentro del tercio central del testículo respecto al diámetro sagital.

Los túbulos seminíferos estudiados en la segunda y tercera sección fueron seleccionados mediante un muestreo sistemático al azar. Los estudiados en la primera sección fueron los mismos que los escogidos al azar en la segunda. Cada corte histológico fue observado a 40 aumentos y se proyectó, con la ayuda de una cámara clara Olympus (Modelo BH2-DA), sobre una cuadrícula cuya unidad básica presentaba 0,5 cm de lado. En el área delimitada por la sección histológica se hizo un muestreo en una proporción 1:5, iniciándose en la parte

superior izquierda y siguiendo de manera sistemática las direcciones de izquierda a derecha y de arriba a abajo (figura 3.3 A). La posición del primer cuadrado se obtuvo al azar mediante la generación de números aleatorios en un intervalo comprendido entre 1 y 5. Los datos se obtuvieron de aquellos túbulos interceptados por los cuadrados seleccionados, considerando como límites de exclusión los lados inferiores y laterales izquierdos de dichos cuadrados (figura 3.3 B).

En este estrato se clasificaron los túbulos seminíferos en función del estadio de madurez del epitelio. En el ratón doméstico se han descrito 12 estadios o asociaciones celulares de maduración del epitelio seminífero (espermatogénesis), presentando cada estadio una composición celular constante (Oakberg, 1956a; Russell *et al.*, 1990a). Esta clasificación está basada principalmente en los cambios de morfología de las espermátidas durante los diferentes estadios de la espermiogénesis. La espermiogénesis se puede dividir mediante un criterio morfológico en varios pasos de desarrollo, basados en un inicio en la forma del acrosoma y más tarde en la forma de la cabeza de la espermátida y en el grado de condensación de la cromatina. Los estadios de la espermatogénesis se designan con números romanos y las fases de desarrollo de las espermátidas durante la espermiogénesis se designan con números arábigos (figura 3.4):

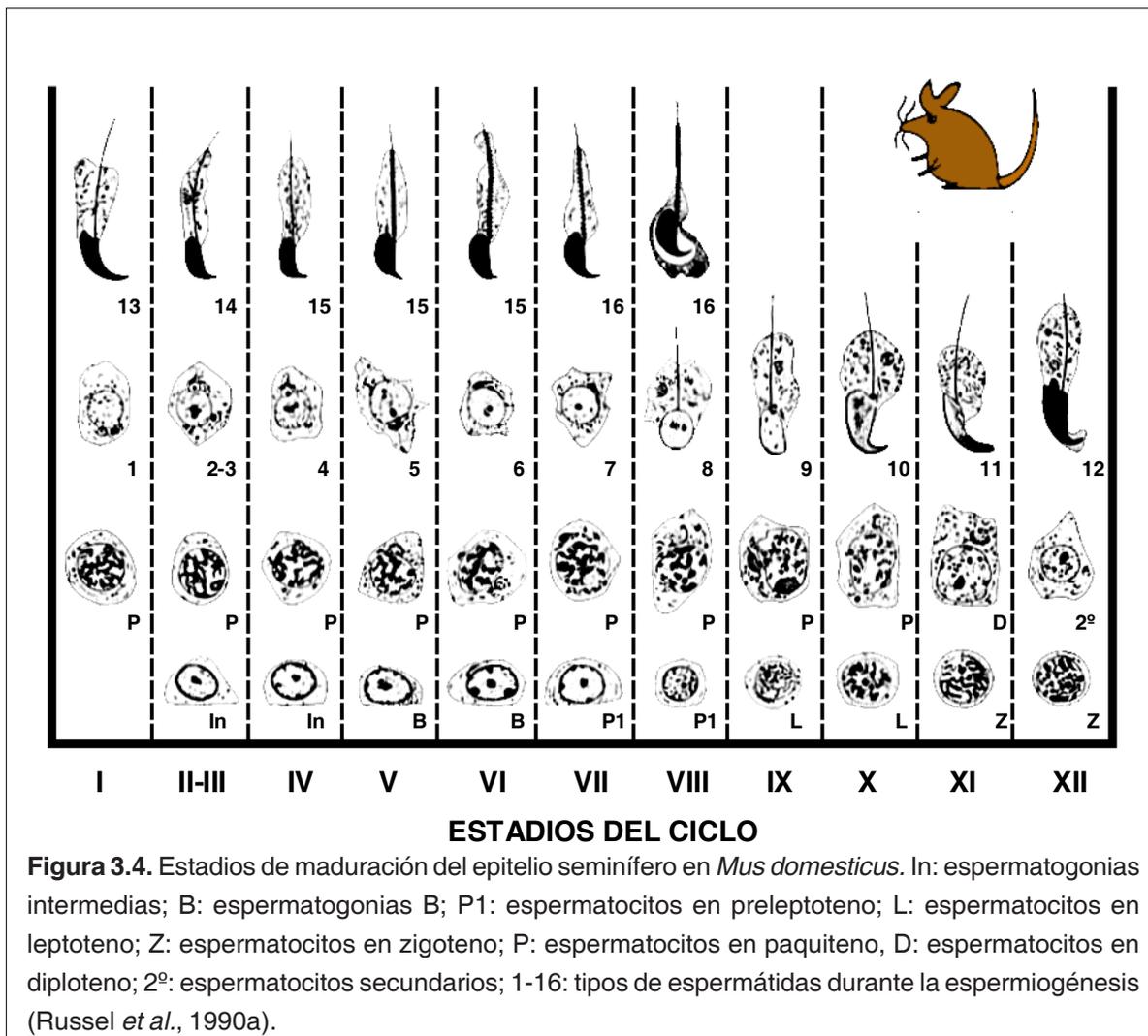
Estadio I: se caracteriza por la presencia de las espermátidas “tipo” 1 que son el resultado de la segunda división meiótica que ha tenido lugar durante el estadio XII. En éstas, al observarlas al microscopio óptico, no se puede distinguir el sistema acrosómico. También están presentes las espermátidas del “tipo” 13, con una cabeza de forma similar a la de un espermatozoide maduro que se ha acortado considerablemente (un 30%) respecto a las espermátidas del “tipo” 12 (presentes en el estadio XII). A parte de estos tipos celulares, durante este estadio también se encuentran espermátocitos en paquiteno.

Estadio II-III: las espermátidas de los “tipos” 2 y 3, que definen estos dos estadios, se encuentran a menudo entremezcladas en una sección transversal de un mismo túbulo, con lo que se hace difícil designar el estadio del túbulo como II o III. Es por ello que algunos autores combinan estos dos estadios (Russell *et al.*, 1990a). El estadio se inicia

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

con la formación de los gránulos acrosómicos (espermátidas de “tipo” 2) seguido de la fusión de estos gránulos en una vesícula proacrosómica, única y redonda, que entra en contacto con el núcleo (espermátidas de “tipo” 3). También se encuentran espermátidas de “tipo” 14, con la cabeza algo más corta que las del “tipo” 13 y más ancha. Los espermatoцитos en paquiteno progresivamente van aumentando en tamaño.

Estadio IV: la vesícula proacrosómica crece y se extiende sobre la superficie del núcleo (espermátidas “tipo” 4). Este estadio finaliza antes de que el ángulo subtendido por el acrosoma alcance los 40°. Las espermátidas de “tipo” 15 que se encuentran en este estadio presentan un estrechamiento del núcleo respecto a las del “tipo” 14. En la fase más tardía de este estadio las espermatogonias de tipo A se dividen por mitosis para dar lugar a espermatogonias de tipo B. Los espermatoцитos en paquiteno continúan aumentando de tamaño.



Estadio V: el ángulo formado por el acrosoma se extiende de 40° a un máximo de 95° (espermátidas de “tipo” 5). En las espermátidas de “tipo” 15 las mitocondrias se alinean a lo largo del flagelo. En algunos espermátocitos en paquiteno ya se puede apreciar la vesícula sexual que representa la cromatina sexual.

Estadio VI: el ángulo subtendido por el acrosoma está comprendido entre 95° y 120° (espermátidas “tipo” 6). Al final de este estadio las espermatogonias de tipo B se dividen por mitosis para dar lugar a espermátocitos en preleptoteno. Están presentes también espermátidas de “tipo” 15 y los espermátocitos en paquiteno.

Estadio VII: el ángulo del acrosoma es mayor de 120° (espermátidas “tipo” 7). Las espermátidas de “tipo” 16 forman en el ápice de la cabeza un gancho bien definido y se sitúan alrededor de la luz del túbulo seminífero. Durante este estadio ocurre un aumento considerable de tamaño de los espermátocitos en paquiteno. Al final de este estadio empieza la transición de espermátocitos en preleptoteno a espermátocitos en leptoteno. Estos espermátocitos empiezan a abandonar la lámina basal.

Estadio VIII: la región acrosómica del núcleo entra en contacto con la membrana celular (espermátidas “tipo” 8). Estas espermátidas se orientan con la región acrosómica dirigida hacia la membrana basal del túbulo y se produce una ligera elongación del núcleo. Las espermátidas de “tipo” 16 son liberadas en la luz del túbulo seminífero. Los espermátocitos en paquiteno aumentan de tamaño. Continúa la transición de espermátocitos en preleptoteno a espermátocitos en leptoteno.

Estadio IX: el núcleo de la espermátida pierde su forma redonda u ovoide, y se produce una elongación del eje apico-caudal y un ligero estrechamiento bilateral del núcleo (espermátidas “tipo” 9). Se puede distinguir una cara dorsal (curva) y una ventral (aplanada). Se forma una protuberancia en la cara ventral, que será el futuro ápice. El acrosoma cubre el 50% de la parte dorsal del núcleo y la protuberancia en la parte ventral. La parte caudal es aplanada. Encontramos espermátocitos en leptoteno y en paquiteno.

Estadio X: continúa la elongación y el estrechamiento del núcleo. El ápice de la cabeza es más prominente. Se forma un ángulo ventral (espermátidas “tipo” 11). El acrosoma cubre el ápice y toda la parte dorsal. Los espermátocitos en paquiteno continúan aumentando de tamaño. En este estadio se produce la transición de espermátocitos en leptoteno a espermátocitos en zigoteno.

Estadio XI: se forma un ángulo dorsal, situado entre la cara dorsal y el extremo caudal del núcleo (espermátidas “tipo” 12). Los espermátocitos que estaban en la fase de paquiteno han pasado a diploteno. Los espermátocitos que en el estadio anterior se encontraban en zigoteno continúan estando en esta fase.

Estadio XII: durante este estadio las espermátidas alcanzan su mayor longitud y se produce la condensación de la cromatina (espermátidas “tipo” 12). Las células en diploteno se dividen para formar los espermátocitos secundarios (meiosis I). Estos son de aspecto similar a las espermátidas del “tipo” 1, pero 1/3 más grandes en diámetro que éstas. Los espermátocitos secundarios se dividen para dar lugar a las espermátidas de “tipo” 1 (meiosis II). Los espermátocitos que estaban en zigoteno pasan a paquiteno.

Las espermátogonias de tipo A están presentes a lo largo de todo el ciclo del epitelio seminífero. Las espermátogonias de tipo B sólo están presentes en los estadios IV, V y VI.

La duración del ciclo del epitelio seminífero es de 8,63 días según Oakberg (1956b) y de 8,62 según (Clermont y Trott, 1969).

Las anomalías que suceden en la meiosis durante el apareamiento de los cromosomas homólogos y su alineamiento en el huso acromático en la metafase pueden causar pérdidas de células y/o un retraso en el curso normal de la espermatogénesis (Eaker *et al.*, 2001). En este espacio Ω_1 se estimó la duración relativa de cada uno de los estadios que consiste en determinar las frecuencias relativas (expresadas en porcentajes) con las que cada estadio aparece en las secciones estudiadas (Clermont & Trott, 1969). Para ello se calcularon,

sobre la segunda y tercera sección, las frecuencias relativas medias por grupo de heterocigosidad, obteniéndose en primer lugar las frecuencias de cada estadio por animal y a continuación promediando en cada grupo los valores obtenidos por individuo. Las frecuencias relativas de cada estadio fueron comparadas entre grupos de heterocigosidad estructural y se contrastaron con los valores obtenidos en cepas de laboratorio (Clermont & Trott, 1969).

Espacio Ω_2

En este nivel se realizaron estimaciones del número de espermatocitos en paquiteno, espermátidas redondas y de células de Sertoli, y se obtuvieron las áreas correspondientes a la luz y a la sección total del túbulo seminífero, así como el diámetro tubular. Para la estimación del número de espermatocitos y espermátidas, y para la obtención de las áreas y los diámetros tubulares, se utilizaron el segundo y el tercer corte. Para los parámetros relacionados con las células de Sertoli se utilizaron el primero y el segundo. En todos los casos se estudiaron los túbulos seleccionados en el espacio anterior.

Dada la distribución radial del tejido, las estimaciones del número de espermátidas (β), espermatocitos (α) y células de Sertoli (SC) se realizaron mediante un muestreo angular proyectando, con la ayuda de la cámara clara, la sección del túbulo seminífero en un retículo de sectores radiales que dividió el espacio de 360° en 12 porciones con un ángulo nominal de 30° (figura 3.3 C). Este tipo de muestreo es el más adecuado para estructuras de simetría radial y presenta, como característica principal, que las áreas en que se divide la sección son proporcionales a la longitud del radio del sector circular. Para la obtención de los datos referentes a α y β , se examinaron la segunda y la tercera sección (separadas a $50 \mu\text{m}$ de distancia), considerándose esta última réplica de la primera. Con esta distancia entre cortes se asegura que un mismo núcleo no esté presente en ambos cortes. De los doce sectores se seleccionaron seis. El primer sector se escogió de manera aleatoria y a partir de éste se seleccionó de forma sistemática uno de cada dos.

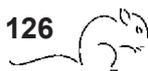
3.2.2.3. Estimación de parámetros relacionados con el número de espermatoцитos y espermátidas

Se calculó la proporción 'nº espermatoцитos primarios en paquiteno': 'nº espermátidas redondas' ($\alpha:\beta$). La proporción esperada para estos tipos celulares era de 1:4 si se producía un 0% de muerte celular, o de 1:0 si había un 100% de muerte celular. Otra expresión de este índice es el porcentaje de muerte celular (GCD) calculado como $100 \times [1 - \beta / (4\alpha)]$.

Se obtuvieron las densidades numéricas de espermatoцитos ($ND\alpha$) y espermátidas ($ND\beta$) mediante estereología, utilizando para ello la ecuación de Floderus, apropiada para núcleos esféricos (Floderus, 1944, citado en Russell *et al.*, 1990a; Zirkin & Ewing, 1987):

$$ND = NA / (D + T - 2h)$$

Donde ND es la densidad numérica, NA es el número de núcleos por unidad de área de sección, D el diámetro medio de los núcleos celulares, T el grosor de la sección y h la sección de núcleo reconocible más pequeña ($0, 1xD$; Mori & Christensen, 1980). Para estimar D , en cada animal se midió el núcleo de 10 células en cada uno de los ocho primeros estadios de maduración del epitelio seminífero y en cada una de las dos secciones histológicas estudiadas por animal. Se dibujó cuidadosamente el perfil de cada núcleo celular con la ayuda de la cámara clara. Los perfiles obtenidos se escanearon y se extrajo el perímetro de cada perfil mediante el programa SigmaScan (1987-1993). Para obtener el diámetro del núcleo se utilizó la fórmula del perímetro de la circunferencia (perímetro = $\pi \times$ diámetro). Para determinar qué valor de diámetro medio se debía utilizar en la estimación de la densidad se estudió la variabilidad de este parámetro entre estadios, cortes histológicos y animales en la muestra analizada. Para ello se realizó un ANOVA anidado mixto determinando como factor principal y fijo el animal, y como factores anidados y aleatorios la sección histológica (anidado en el factor animal) y el estadio (anidado en el factor sección). Si se obtuvieron diferencias entre estadios o individuos se aplicó a cada situación el valor medio correspondiente de diámetro para el cálculo de densidades numéricas. Es decir, si se obtuvieron diferencias entre animales y no entre estadios, se promediaron todos los valores por animal. Si se encontraron diferencias entre animales y estadios se calculó el valor medio



por estadio y por animal, etc. En caso de no encontrar diferencias se promediaron los valores de todas las células medidas y los valores obtenidos fueron los utilizados en el cálculo de densidades numéricas en todos los individuos estudiados. A partir de las densidades numéricas se realizó una aproximación para obtener el número de células totales en el testículo ($NT\alpha$ y $NT\beta$), multiplicando el volumen de éste por las densidades celulares obtenidas (Zirkin & Ewing, 1987). El volumen del testículo fue estimado a partir de su masa, utilizando como peso específico 1,04 (Russell *et al.*, 1990a). Se analizaron las diferencias significativas de $\alpha:\beta$ así como de $ND\alpha$, $ND\beta$, $NT\alpha$ y $NT\beta$ entre animales y entre los diferentes grupos cromosómicos.

Como medida de distribución de la muerte celular entre los túbulos se calculó el porcentaje de túbulos defectivos por animal. Se definió como túbulo defectivo aquél cuyo índice $\alpha:\beta$ es menor de 1:3, es decir, en los que hay menos de 3 espermatidas por espermatocito (Garagna *et al.*, 1989). Adicionalmente se calculó la proporción de túbulos en los que $\alpha:\beta$ fue menor de 1:2 y de 1:1. Se analizaron las diferencias entre grupos cromosómicos y animales para este parámetro.

3.2.2.4. Estimación de las densidades de células de Sertoli

Como indicador de la cantidad de espermatozoides producidos se obtuvo el número de células de Sertoli relativo tanto al volumen total de la sección del túbulo seminífero como al volumen de la sección ocupado por células (Russell *et al.*, 1990a; 1990b). Este parámetro se estimó mediante el método del disector, apropiado para contar células cuyos núcleos no son ni esféricos ni mononucleados (Sterio, 1984; Cruz-Orive & Hunziker, 1987). Para ello se utilizaron los dos primeros cortes histológicos (separados a 5 μm de distancia). Se contó el número de perfiles nucleares pertenecientes a las células de Sertoli que estaban presentes en la primera sección histológica (sección de referencia "reference section") y ausentes en la segunda (sección de conteo "look-up"). El número de células de Sertoli relativo al volumen se obtuvo según:

$$N/V = (\Sigma Q^- / P^-) \times p / (h \times s)$$

Donde N/V es el número de células de Sertoli obtenidas por unidad de volumen, Q el número de perfiles nucleares presentes tan sólo en la sección de referencia y no en la de búsqueda, P el número de puntos de las redes coherentes contabilizados en la sección de referencia (sección tubular completa o sección del túbulo ocupada por el epitelio), s el área correspondiente a un punto p de redes coherentes y h la distancia que separa las dos secciones (para más detalles sobre las redes coherentes véase siguiente apartado; figura 3.3 D). Se estudiaron las diferencias significativas entre los diferentes grupos y animales para esta variable.

3.2.2.5. Medidas relacionadas con la sección de los túbulos seminíferos

Puesto que existe una correlación positiva entre el diámetro tubular y la actividad espermatogénica del testículo (Sinha Hikim *et al.*, 1989), se estudió la existencia de diferencias significativas de los diámetros tubulares entre los diferentes grupos cromosómicos. La medición de los diámetros se realizó con un ocular micrométrico. Tan sólo se midieron los ejes menores del perfil tubular ya que es el eje que no varía en caso que se haya seccionado el túbulo oblicuamente.

La fracción del túbulo seminífero ocupada por el epitelio puede proporcionar información adicional sobre el estado espermatogénico de los túbulos (Russell *et al.*, 1990a). Un epitelio menor de lo habitual se puede deber a la degeneración de células durante el proceso de la espermatogénesis. Se estimó la densidad de volumen para el epitelio según Cruz-Orive (1987):

$$V_v = S_{ep}/S_{total}$$

Donde S_{ep} corresponde al área de la sección del túbulo ocupada por el epitelio y S_{total} es el área total de la sección tubular. La estimación de las áreas se realizó mediante redes coherentes formadas por puntos equidistantes. Éstas se colocaron sobre las proyecciones de las secciones de los túbulos seminíferos, contándose el número de puntos capturados por la luz y por el epitelio del túbulo seminífero (figura 3.3 D). Se analizó la existencia de diferencias significativas entre los grupos cromosómicos para la proporción de superficie ocupada por el epitelio respecto al área total de la sección tubular.

Todos estos parámetros se estimaron en los túbulos seminíferos que estaban en un estadio de desarrollo del epitelio comprendido entre el I y el VIII (ambos inclusive), puesto que es en éstos donde se encuentran las espermátidas redondas. El hecho de analizarlos todos implicaba estimar las densidades celulares y parámetros derivados a partir de células con núcleo esférico en unos casos, y alargado en otros, pudiéndose producir importantes sesgos. Sólo se estudiaron aquellos túbulos con sección transversal de aspecto circular.

3.2.2.6. Análisis estadísticos

Se estudió la normalidad de los datos mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Los valores extremos, definidos como aquéllos superiores a tres veces la amplitud intercuartil, fueron eliminados de los análisis estadísticos.

- Espacio Ω_0

Se estudiaron las diferencias para el peso y los diámetros sagital y transversal de los testículos, así como para el tamaño de la vesícula seminal, mediante ANOVAs de un factor con cinco niveles, donde cada nivel representaba el grupo cromosómico al que pertenecía cada animal.

- Espacio Ω_1

Para estudiar si existían diferencias en las frecuencias de cada uno de los estadios de maduración del epitelio seminífero entre los grupos cromosómicos, se realizaron comparaciones dos a dos entre estos grupos mediante pruebas χ^2 .

- Espacio Ω_2

Las diferencias significativas entre grupos de todos los parámetros obtenidos en este nivel, excepto para el análisis de túbulos defectivos, se testaron mediante un análisis de la varianza

3.3. RESULTADOS

anidado no balanceado de tres factores (grupo cromosómico, animal, sección histológica). Se definieron como factores fijos el grupo cromosómico y el animal, y como aleatorios el corte histológico. El grupo cromosómico fue el efecto principal, el animal estuvo anidado en el grupo cromosómico y el corte histológico anidado en el animal y grupo cromosómico. El estudio de las diferencias entre grupos se realizó mediante el ajuste de Tukey para comparaciones múltiples. En las comparaciones entre individuos, se realizaron pruebas t-Student entre los animales en cuyos grupos se encontraron diferencias y se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni a los niveles de significación obtenidos (Rice, 1989).

El análisis de las diferencias entre grupos para el porcentaje de túbulos defectivos se llevó a cabo mediante una ANOVA de un factor (grupo de heterocigosidad) y las pruebas de comparaciones múltiples se llevaron a cabo mediante el ajuste de Tukey. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (1999-2001 SAS Institute Inc.).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Espacio Ω_0

La masa testicular, los diámetros sagital y transversal, y el tamaño de la vesícula seminal no presentaron diferencias entre los grupos de heterocigosidad estructural (tabla 3.2). Tampoco se obtuvieron diferencias entre grupos para estos valores de los tamaños testicular y vesicular relativos a la masa corporal.

Tabla 3.2. Medidas relacionadas con el tamaño del testículo y la vesícula seminal por grupo cromosómico. Se muestra la media y el error típico.

| Grupo cromosómico | Ø sagital medio del testículo (mm) | Ø transversal medio del testículo (mm) | Peso medio del testículo (mg) | Longitud media de la vesícula seminal (mm) |
|-------------------|------------------------------------|--|-------------------------------|--|
| 40ST | 7,79 ± 0,10 | 4,72 ± 0,19 | 87,57 ± 6,68 | 9,75 ± 0,35 |
| HH | 7,34 ± 0,42 | 4,42 ± 0,19 | 74,40 ± 8,73 | 9,03 ± 0,83 |
| HTI-31 | 7,23 ± 0,29 | 4,01 ± 0,19 | 61,65 ± 6,75 | 10,11 ± 0,32 |
| HTI-39 | 7,30 ± 0,23 | 4,41 ± 0,22 | 73,64 ± 8,22 | 8,83 ± 0,67 |
| HTIII | 6,84 ± 0,16 | 4,25 ± 0,14 | 64,34 ± 4,74 | 8,90 ± 0,32 |



3.3.2. Espacio Ω_1

Las frecuencias relativas con las que aparece cada estadio de maduración del epitelio seminífero, expresadas en porcentajes y obtenidas para cada grupo de heterocigosidad estructural, se muestran en la tabla 3.3 y en la figura 3.5. Los resultados obtenidos en cuanto a la duración relativa de cada uno de los diferentes estadios no difirieron significativamente de los encontrados por otros autores en cepas de laboratorio (tabla 3.3; Clermont & Trott, 1969). Cuando se compararon las distribuciones de frecuencias de los estadios de la espermatogénesis entre los diferentes grupos cromosómicos tampoco se encontraron diferencias significativas (tabla 3.3). Esto sugiere que la sucesión en tiempo de los diferentes estadios de la espermatogénesis procede según el patrón general de sucesión de estadios en todos los animales analizados .

3.3.3. Espacio Ω_2

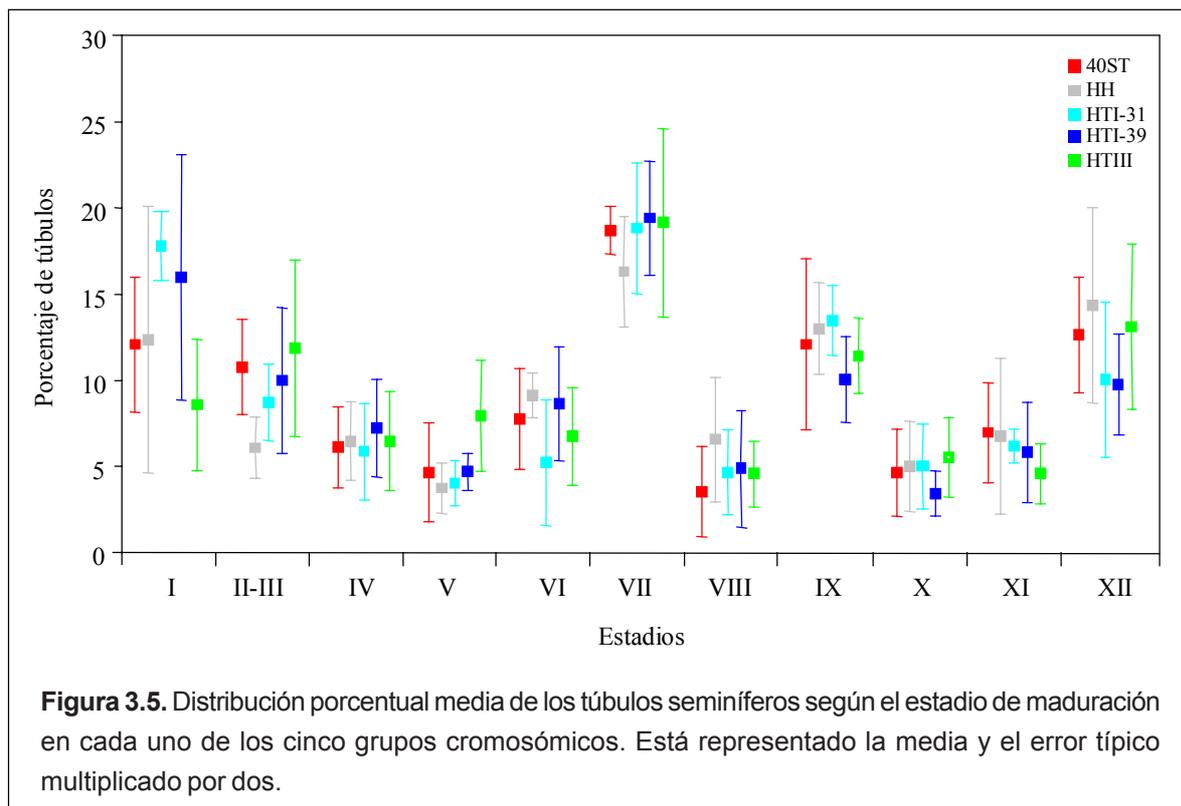
3.3.3.1. Estimación de parámetros relacionados con el número de espermátocitos y espermátidas

En la tabla 3.4 se muestran los valores para la relación 'espermátocito:espermátida' obtenidos para cada uno de los individuos. En la figura 3.6 (A y B) está representado el número medio

Tabla 3.3. Duración media relativa de los estadios del ciclo de maduración del epitelio seminífero en cada uno de los grupos cromosómicos establecidos para el ratón doméstico. Está representada la media y el error típico. Se muestran los valores que obtuvieron Clermont y Trott (1969) en ratones albinos y C_3H .

| Estadio | Duración media relativa (%) | | | | | | Ratones albinos |
|---------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------|-----------------|
| | 40ST | HH | HTI-31 | HTI-39 | HTIII | C_3H | |
| I | 12,08 ± 3,93 | 12,36 ± 7,72 | 17,80 ± 1,99 | 15,98 ± 7,12 | 8,58 ± 3,80 | 11,12 | 11,73 |
| II-III | 10,78 ± 2,74 | 6,12 ± 1,78 | 8,72 ± 2,21 | 10,00 ± 4,19 | 11,88 ± 5,13 | 8,85 | 7,91 |
| IV | 6,14 ± 2,33 | 6,48 ± 2,30 | 5,90 ± 2,79 | 7,24 ± 2,83 | 6,50 ± 2,87 | 9,11 | 10,26 |
| V | 4,68 ± 2,89 | 3,76 ± 1,45 | 4,06 ± 1,32 | 4,70 ± 1,08 | 7,94 ± 3,24 | 8,77 | 8,58 |
| VI | 7,78 ± 2,93 | 9,12 ± 1,29 | 5,26 ± 3,62 | 8,64 ± 3,31 | 6,76 ± 2,86 | 8,85 | 6,98 |
| VII | 18,70 ± 1,39 | 16,32 ± 3,20 | 18,82 ± 3,80 | 19,42 ± 3,28 | 19,14 ± 5,45 | 14,38 | 15,16 |
| VIII | 3,56 ± 2,63 | 6,58 ± 3,62 | 4,66 ± 2,48 | 4,90 ± 3,33 | 4,58 ± 1,90 | 6,85 | 8,39 |
| IX | 12,10 ± 4,96 | 13,00 ± 2,66 | 13,48 ± 2,03 | 10,06 ± 2,47 | 11,44 ± 2,19 | 8,26 | 9,59 |
| X | 4,66 ± 2,53 | 5,02 ± 2,61 | 5,04 ± 2,46 | 3,46 ± 1,31 | 5,52 ± 2,30 | 3,66 | 4,16 |
| XI | 6,98 ± 2,90 | 6,78 ± 4,52 | 6,20 ± 0,97 | 5,82 ± 2,91 | 4,60 ± 1,73 | 9,87 | 8,45 |
| XII | 12,66 ± 3,36 | 14,36 ± 5,66 | 10,06 ± 4,48 | 9,76 ± 2,94 | 13,12 ± 4,82 | 10,51 | 8,86 |

3.3. RESULTADOS



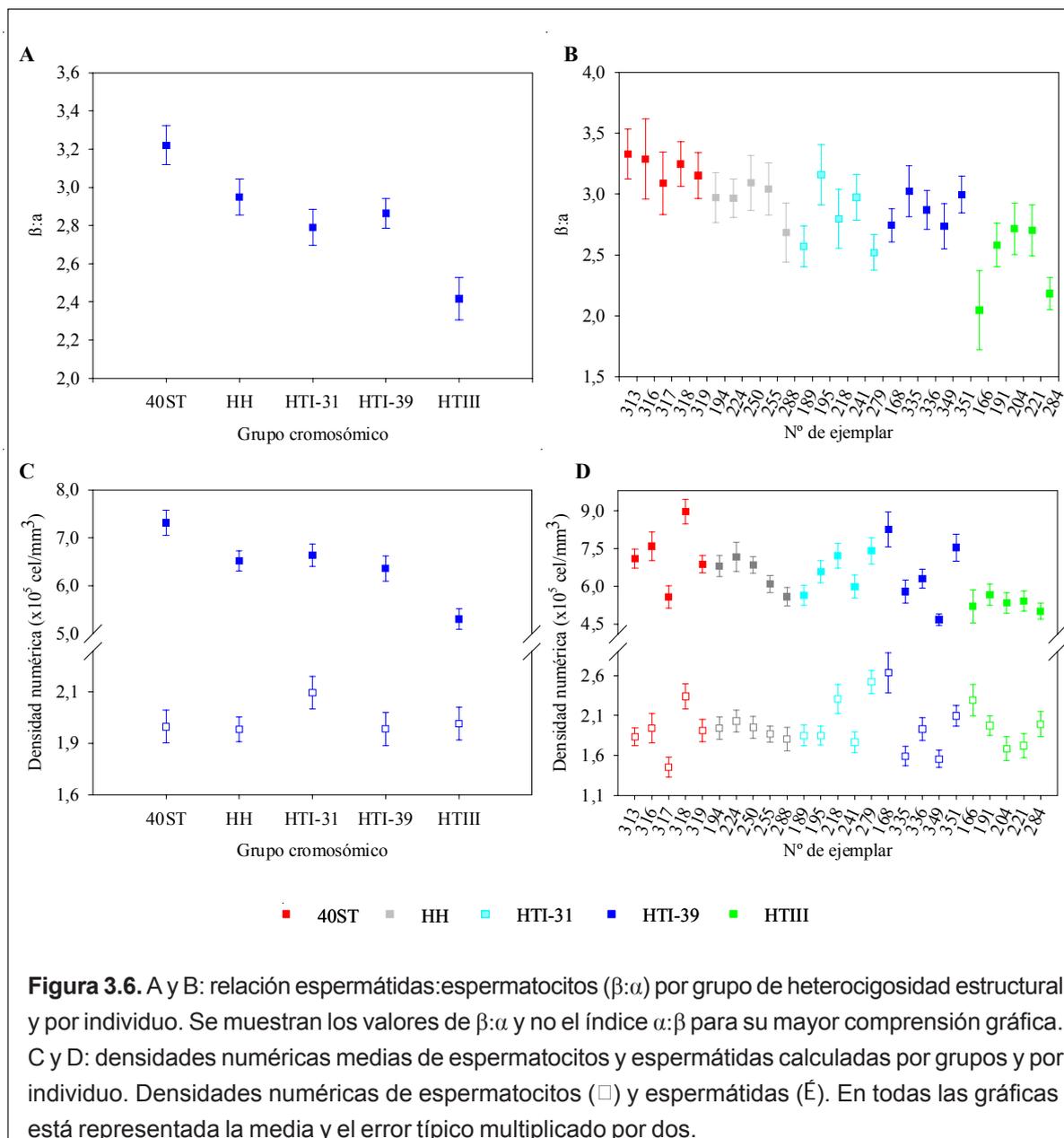
de espermatidas producidas por espermatocito ($\beta:\alpha$) y las densidades numéricas de ambos tipos celulares para cada grupo y para cada uno de los ejemplares estudiados, respectivamente. Aunque en la tabla de parámetros estimados (tabla 3.4) está representado el índice $\alpha:\beta$, en los análisis estadísticos y en las gráficas se ha utilizado la proporción $\beta:\alpha$ para una mejor comprensión de los resultados obtenidos.

Los valores $\beta:\alpha$ difirieron significativamente entre grupos cromosómicos ($F=41,28$; $p<0,001$) y entre animales ($F=4,74$; $p<0,001$). Los resultados de las comparaciones múltiples obtenidos por el método de Tukey mostraron diferencias significativas del grupo 40ST respecto HH, HTI-31, HTI-39 y HTIII ($p<0,001$), y de HTIII respecto 40ST, HH, HTI-31 y HTI-39 ($p<0,001$). Los grupos HH, HTI-31 y HTI-39 no mostraron valores de $\beta:\alpha$ significativamente diferentes entre ellos. El grupo 40ST presentó los valores de $\beta:\alpha$ más elevados, mientras que el HTIII los más bajos. El resto de grupos mostraron valores intermedios de este índice (tabla 3.4; figura 3.6 A). El valor significativo en el modelo anidado de la ANOVA correspondiente a los animales se debió a diferencias entre individuos en los grupos HTI-31 ($F=6,63$; $p<0,001$) y HTIII ($F=9,24$; $p<0,001$). Un estudio más detallado de las diferencias encontradas mediante

Tabla 3.4. Parámetros estimados relacionados con los conteos de espermatoцитos y espermátidas en los túbulos seminíferos. En cursiva se muestran los valores obtenidos por grupo cromosómico. GCD: porcentaje de muerte celular; α : n° de espermatoцитos; β : n° de espermátidas; ND α y NT α : densidad numérica y número total de espermatoцитos, respectivamente; ND β y NT β : densidad numérica y número total de espermátidas, respectivamente. %TD: porcentaje de túbulos defectivos

| Grupo cromosómico | N° animal | 2n | N° túbulos analizados | Media GCD (%) \pm ET | Media α : β \pm ET | Media ND α (10^5 cél./mm ³) \pm ET | Media ND β (10^5 cél./mm ³) \pm ET | Media NT α (10^6 cél./test.) \pm ET | Media NT β (10^6 cél./test.) \pm ET | %TD<1 | %TD<2 | %TD<3 |
|-------------------|--------------------|----|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|---|---|--|-------------|--------------|--------------|
| 40ST | 313 | 40 | 29 | 16,77 \pm 2,87 | 1:3,33 \pm 0,10 | 1,83 \pm 0,55 | 7,10 \pm 0,19 | 15,26 \pm 0,46 | 59,11 \pm 1,55 | 0,00 | 0,00 | 20,70 |
| | 316 | 40 | 27 | 17,83 \pm 4,11 | 1:3,29 \pm 0,16 | 1,94 \pm 0,91 | 7,59 \pm 0,28 | 14,33 \pm 0,67 | 56,01 \pm 2,10 | 0,00 | 3,70 | 37,00 |
| | 317 | 40 | 24 | 22,79 \pm 3,20 | 1:3,09 \pm 0,13 | 1,45 \pm 0,63 | 5,57 \pm 0,22 | 15,30 \pm 0,67 | 58,73 \pm 2,32 | 0,00 | 4,20 | 41,70 |
| | 318 | 40 | 33 | 18,84 \pm 2,27 | 1:3,25 \pm 0,09 | 2,34 \pm 0,80 | 8,97 \pm 0,25 | 16,12 \pm 0,55 | 61,76 \pm 1,70 | 0,00 | 0,00 | 24,20 |
| | 319 | 40 | 40 | 21,20 \pm 2,37 | 1:3,15 \pm 0,09 | 1,91 \pm 0,69 | 6,88 \pm 0,17 | 17,15 \pm 0,62 | 61,71 \pm 1,50 | 0,00 | 0,00 | 37,50 |
| | <i>Valor grupo</i> | | <i>153</i> | <i>19,51 \pm 1,27</i> | <i>1:3,22 \pm 0,05</i> | <i>1,93 \pm 0,40</i> | <i>7,31 \pm 0,13</i> | <i>15,81 \pm 0,28</i> | <i>59,83 \pm 0,81</i> | <i>0,00</i> | <i>1,30</i> | <i>32,00</i> |
| HH | 194 | 28 | 38 | 25,73 \pm 2,56 | 1:2,97 \pm 0,10 | 1,94 \pm 0,69 | 6,80 \pm 0,21 | 14,72 \pm 0,52 | 51,54 \pm 1,59 | 0,00 | 5,30 | 47,40 |
| | 224 | 30 | 35 | 25,86 \pm 1,99 | 1:2,96 \pm 0,08 | 2,03 \pm 0,70 | 7,17 \pm 0,29 | 15,26 \pm 0,52 | 53,85 \pm 2,20 | 0,00 | 0,00 | 54,30 |
| | 250 | 28 | 30 | 22,68 \pm 2,82 | 1:3,09 \pm 0,11 | 1,95 \pm 0,68 | 6,84 \pm 0,17 | 11,35 \pm 0,39 | 39,82 \pm 0,97 | 0,00 | 0,00 | 56,70 |
| | 255 | 28 | 37 | 24,00 \pm 2,67 | 1:3,04 \pm 0,11 | 1,87 \pm 0,50 | 6,09 \pm 0,17 | 9,33 \pm 0,25 | 30,43 \pm 0,85 | 0,00 | 2,70 | 48,60 |
| | 288 | 28 | 34 | 32,88 \pm 3,02 | 1:2,68 \pm 0,12 | 1,80 \pm 0,74 | 5,59 \pm 0,18 | 17,78 \pm 0,73 | 55,13 \pm 1,81 | 0,00 | 14,70 | 73,50 |
| | <i>Valor grupo</i> | | <i>174</i> | <i>26,26 \pm 1,20</i> | <i>1:2,95 \pm 0,05</i> | <i>1,92 \pm 0,30</i> | <i>6,52 \pm 0,10</i> | <i>13,74 \pm 0,32</i> | <i>46,35 \pm 1,02</i> | <i>0,00</i> | <i>4,60</i> | <i>55,70</i> |
| HTI-31 | 189 | 31 | 33 | 35,73 \pm 2,08 | 1:2,57 \pm 0,08 | 1,85 \pm 0,65 | 5,65 \pm 0,20 | 10,39 \pm 0,37 | 31,72 \pm 1,11 | 0,00 | 12,10 | 81,80 |
| | 195 | 31 | 36 | 21,04 \pm 3,10 | 1:3,16 \pm 0,12 | 1,85 \pm 0,58 | 6,58 \pm 0,23 | 10,07 \pm 0,32 | 35,85 \pm 1,24 | 0,00 | 5,60 | 38,90 |
| | 218 | 31 | 40 | 30,09 \pm 3,01 | 1:2,80 \pm 0,12 | 2,31 \pm 0,92 | 7,22 \pm 0,24 | 17,62 \pm 0,70 | 55,12 \pm 1,85 | 0,00 | 10,00 | 62,50 |
| | 241 | 31 | 32 | 25,68 \pm 2,32 | 1:2,98 \pm 0,09 | 1,77 \pm 0,65 | 5,99 \pm 0,23 | 6,93 \pm 0,25 | 23,50 \pm 0,90 | 0,00 | 0,00 | 50,00 |
| | 279 | 31 | 45 | 36,97 \pm 1,81 | 1:2,52 \pm 0,07 | 2,52 \pm 0,72 | 7,42 \pm 0,26 | 17,67 \pm 0,50 | 52,00 \pm 1,83 | 0,00 | 6,70 | 80,00 |
| | <i>Valor grupo</i> | | <i>186</i> | <i>30,25 \pm 1,20</i> | <i>1:2,79 \pm 0,05</i> | <i>2,09 \pm 0,40</i> | <i>6,63 \pm 0,12</i> | <i>13,03 \pm 0,39</i> | <i>40,78 \pm 1,11</i> | <i>0,00</i> | <i>7,00</i> | <i>63,44</i> |
| HTI-39 | 168 | 39 | 32 | 31,38 \pm 1,70 | 1:2,75 \pm 0,07 | 2,63 \pm 0,13 | 8,26 \pm 0,34 | 12,16 \pm 0,58 | 38,11 \pm 1,59 | 0,00 | 0,00 | 75,00 |
| | 335 | 39 | 30 | 24,45 \pm 2,61 | 1:3,02 \pm 0,10 | 1,59 \pm 0,61 | 5,79 \pm 0,23 | 11,77 \pm 0,45 | 42,84 \pm 1,72 | 0,00 | 3,30 | 56,70 |
| | 336 | 39 | 52 | 28,26 \pm 1,97 | 1:2,87 \pm 0,08 | 1,93 \pm 7,14 | 6,30 \pm 0,18 | 18,41 \pm 0,68 | 60,09 \pm 1,77 | 0,00 | 7,70 | 59,60 |
| | 349 | 39 | 60 | 31,58 \pm 2,32 | 1:2,74 \pm 0,09 | 1,56 \pm 0,55 | 4,68 \pm 0,11 | 11,28 \pm 0,40 | 33,94 \pm 0,80 | 0,00 | 18,30 | 65,00 |
| | 351 | 39 | 48 | 25,12 \pm 1,90 | 1:2,99 \pm 0,08 | 2,09 \pm 0,63 | 7,54 \pm 0,27 | 13,84 \pm 0,42 | 49,82 \pm 1,76 | 0,00 | 2,10 | 47,90 |
| | <i>Valor grupo</i> | | <i>222</i> | <i>28,41 \pm 0,99</i> | <i>1:2,75 \pm 0,07</i> | <i>1,92 \pm 0,40</i> | <i>6,36 \pm 0,13</i> | <i>13,65 \pm 0,29</i> | <i>45,29 \pm 0,95</i> | <i>0,00</i> | <i>7,70</i> | <i>60,40</i> |
| HTIII | 166 | 37 | 42 | 48,82 \pm 4,06 | 1:2,05 \pm 0,16 | 2,29 \pm 0,99 | 5,21 \pm 0,33 | 14,91 \pm 0,64 | 33,90 \pm 2,14 | 7,10 | 54,80 | 76,20 |
| | 191 | 31 | 29 | 35,45 \pm 2,24 | 1:2,58 \pm 0,09 | 1,97 \pm 0,60 | 5,67 \pm 0,21 | 10,38 \pm 0,32 | 29,82 \pm 1,13 | 0,00 | 10,30 | 75,90 |
| | 204 | 35 | 39 | 32,11 \pm 2,64 | 1:2,72 \pm 0,11 | 1,69 \pm 0,74 | 5,34 \pm 0,20 | 9,47 \pm 0,42 | 30,00 \pm 1,15 | 2,60 | 12,80 | 64,10 |
| | 221 | 35 | 28 | 32,43 \pm 2,60 | 1:2,70 \pm 0,10 | 1,72 \pm 0,75 | 5,42 \pm 0,20 | 9,87 \pm 0,43 | 31,06 \pm 1,17 | 0,00 | 7,10 | 75,00 |
| | 284 | 29 | 39 | 45,43 \pm 1,67 | 1:2,18 \pm 0,07 | 1,99 \pm 0,79 | 5,02 \pm 0,15 | 15,58 \pm 0,62 | 39,23 \pm 1,21 | 0,00 | 30,80 | 94,90 |
| | <i>Valor grupo</i> | | <i>177</i> | <i>39,61 \pm 1,40</i> | <i>1:2,42 \pm 0,06</i> | <i>2,29 \pm 0,99</i> | <i>5,30 \pm 0,11</i> | <i>12,35 \pm 0,32</i> | <i>33,13 \pm 0,72</i> | <i>1,30</i> | <i>25,40</i> | <i>77,40</i> |

3.3. RESULTADOS



pruebas t-Student mostró que, en el grupo HTI-31, el individuo 195 presentó valores $\beta:\alpha$ significativamente mayores que los animales 189 ($p < 0,01$) y 279 ($p < 0,001$). Asimismo, el ejemplar 241 mostró valores de $\beta:\alpha$ significativamente superiores que el 279 ($p < 0,01$). En el grupo HTIII los animales 166 y 284 mostraron valores significativamente menores respecto a los individuos 204 y 221 (en ambos, $p < 0,01$). El espécimen 166 también presentó valores significativamente menores respecto al 191 ($p < 0,05$; tabla 3.4; figura 3.6 B).

Los promedios de diámetros nucleares de los espermatozoides y espermátidas obtenidos por animal y por estadio, así como los correspondientes errores típicos se indican en las

Tabla 3.5. Media y error típico de los diámetros nucleares de los espermatocitos por animal y estadio de maduración del epitelio seminífero.

| Grupo cromosómico | Nº animal | Estadios de maduración del epitelio seminífero | | | | | | |
|-------------------|-----------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | I | II-III | IV | V | VI | VII | VIII |
| 40ST | 313 | 4,65 ± 0,08 | 4,98 ± 0,10 | 5,21 ± 0,07 | 5,70 ± 0,10 | 5,56 ± 0,11 | 5,62 ± 0,07 | 5,88 ± 0,10 |
| | 316 | 4,81 ± 0,07 | 5,17 ± 0,08 | 5,19 ± 0,07 | 5,14 ± 0,06 | 5,25 ± 0,10 | 5,70 ± 0,08 | 5,99 ± 0,11 |
| | 317 | 4,88 ± 0,07 | 5,12 ± 0,09 | 5,71 ± 0,09 | 5,48 ± 0,10 | 5,59 ± 0,09 | 5,79 ± 0,12 | 5,97 ± 0,16 |
| | 318 | 4,28 ± 0,08 | 4,80 ± 0,07 | 5,36 ± 0,10 | 5,42 ± 0,07 | 5,45 ± 0,06 | 5,53 ± 0,10 | 6,11 ± 0,09 |
| | 319 | 4,56 ± 0,08 | 4,60 ± 0,07 | 5,22 ± 0,10 | 5,28 ± 0,08 | 5,30 ± 0,14 | 5,57 ± 0,07 | 6,12 ± 0,09 |
| HH | 194 | 4,53 ± 0,10 | 4,74 ± 0,07 | 4,86 ± 0,13 | 5,39 ± 0,08 | 5,27 ± 0,10 | 5,63 ± 0,09 | 5,92 ± 0,10 |
| | 224 | 4,22 ± 0,08 | 4,94 ± 0,08 | 4,82 ± 0,07 | 5,08 ± 0,09 | 5,07 ± 0,10 | 5,26 ± 0,07 | 5,62 ± 0,10 |
| | 250 | 4,29 ± 0,08 | 4,52 ± 0,07 | 5,09 ± 0,07 | 5,23 ± 0,09 | 5,32 ± 0,06 | 5,58 ± 0,10 | 5,78 ± 0,09 |
| | 255 | 4,08 ± 0,06 | 4,80 ± 0,07 | 4,84 ± 0,08 | 5,10 ± 0,06 | 5,13 ± 0,10 | 5,27 ± 0,09 | 5,79 ± 0,08 |
| | 288 | 4,91 ± 0,12 | 4,91 ± 0,07 | 5,29 ± 0,09 | 5,66 ± 0,11 | 5,31 ± 0,03 | 5,54 ± 0,06 | 6,14 ± 0,08 |
| HTI-31 | 189 | 4,69 ± 0,07 | 4,67 ± 0,07 | 4,84 ± 0,10 | 5,23 ± 0,10 | 5,13 ± 0,10 | 5,51 ± 0,10 | 5,88 ± 0,09 |
| | 195 | 4,77 ± 0,09 | 4,86 ± 0,08 | 4,98 ± 0,08 | 5,10 ± 0,08 | 5,43 ± 0,14 | 5,24 ± 0,09 | 6,09 ± 0,15 |
| | 218 | 4,96 ± 0,17 | 5,00 ± 0,08 | 5,08 ± 0,07 | 5,63 ± 0,10 | 5,28 ± 0,07 | 5,82 ± 0,07 | 5,81 ± 0,09 |
| | 241 | 4,63 ± 0,09 | 4,95 ± 0,10 | 4,95 ± 0,08 | 5,08 ± 0,06 | 5,36 ± 0,06 | 5,70 ± 0,08 | 5,56 ± 0,04 |
| | 279 | 4,36 ± 0,05 | 5,09 ± 0,09 | 4,96 ± 0,10 | 5,34 ± 0,07 | 5,26 ± 0,07 | 5,73 ± 0,06 | 5,97 ± 0,10 |
| HTI-39 | 168 | 4,41 ± 0,07 | 4,90 ± 0,07 | 5,04 ± 0,06 | 5,45 ± 0,08 | 5,20 ± 0,08 | 5,85 ± 0,09 | 5,75 ± 0,08 |
| | 335 | 4,98 ± 0,06 | 5,12 ± 0,13 | 5,54 ± 0,09 | 5,73 ± 0,12 | 5,53 ± 0,13 | 5,88 ± 0,09 | 6,21 ± 0,10 |
| | 336 | 4,73 ± 0,11 | 4,90 ± 0,07 | 5,16 ± 0,09 | 5,50 ± 0,07 | 5,60 ± 0,08 | 5,40 ± 0,09 | 6,07 ± 0,10 |
| | 349 | 4,76 ± 0,06 | 4,67 ± 0,09 | 5,26 ± 0,07 | 5,06 ± 0,07 | 5,46 ± 0,08 | 5,52 ± 0,05 | 5,68 ± 0,10 |
| | 351 | 4,78 ± 0,09 | 4,91 ± 0,09 | 5,34 ± 0,07 | 5,56 ± 0,09 | 5,70 ± 0,09 | 5,51 ± 0,08 | 5,92 ± 0,09 |
| HTIII | 166 | 4,63 ± 0,10 | 4,96 ± 0,09 | 5,05 ± 0,10 | 5,45 ± 0,09 | 5,42 ± 0,08 | 5,66 ± 0,11 | 5,99 ± 0,09 |
| | 191 | 4,60 ± 0,10 | 4,77 ± 0,09 | 5,46 ± 0,06 | 4,86 ± 0,08 | 5,69 ± 0,13 | 5,94 ± 0,12 | 6,09 ± 0,07 |
| | 204 | 4,27 ± 0,06 | 4,68 ± 0,12 | 5,11 ± 0,08 | 5,12 ± 0,10 | 5,50 ± 0,10 | 5,93 ± 0,11 | 5,80 ± 0,08 |
| | 221 | 4,56 ± 0,07 | 4,60 ± 0,09 | 4,97 ± 0,10 | 5,31 ± 0,08 | 5,43 ± 0,08 | 5,69 ± 0,07 | 6,19 ± 0,07 |
| | 284 | 4,46 ± 0,08 | 5,12 ± 0,10 | 5,03 ± 0,11 | 5,42 ± 0,09 | 5,70 ± 0,08 | 5,40 ± 0,09 | 5,74 ± 0,11 |

tablas 3.5 y 3.6, respectivamente. Los diámetros celulares mostraron diferencias entre estadios (espermatozoides: $F=18,46$, $p<0,001$; espermátidas: $F=4,25$, $p<0,001$). En vista de los resultados se utilizó la media de tamaño nuclear por estadio y por animal para calcular las densidades numéricas. La densidad numérica de espermatozoides (ND_{α}) mostró diferencias significativas entre grupos cromosómicos y animales (grupos cromosómicos: $F=4,54$, $p<0,01$; animales: $F=15,30$, $p<0,001$; figuras 3.6 C y D, tabla 3.4). La significación encontrada entre grupos se debió a los valores significativamente mayores del HTI-31 respecto al grupo 40ST ($p<0,05$). Se encontraron diferencias significativas entre animales en todos los grupos excepto en el grupo HH (40ST: $F=14,64$, $p<0,001$; HTI-31: $F=21,80$, $p<0,001$; HTI-39: $F=36,25$, $p<0,001$; HTIII: $F=10,54$, $p<0,001$). En el grupo 40ST el individuo 318 presentó valores significativamente mayores que los individuos 313 ($p<0,01$), 317 ($p<0,01$) y 319 ($p<0,05$). En el grupo HTI-31 los animales 218 y 279 mostraron ND_{α} mayores que los 189, 195 y 241 (en todos $p<0,01$). En el grupo HTI-39 el animal 168 mostró los valores de

3.3. RESULTADOS

Tabla 3.6. Media y error típico de los diámetros nucleares de las espermátidas por animal y estadio de maduración del epitelio seminífero.

| Grupo cromosómico | Nº animal | Estadios de maduración del epitelio seminífero | | | | | | |
|-------------------|-----------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | I | II-III | IV | V | VI | VII | VIII |
| 40ST | 313 | 3,58 ± 0,05 | 3,38 ± 0,07 | 3,61 ± 0,09 | 3,63 ± 0,07 | 3,41 ± 0,07 | 3,54 ± 0,06 | 3,39 ± 0,06 |
| | 316 | 3,37 ± 0,05 | 3,47 ± 0,07 | 3,60 ± 0,07 | 3,35 ± 0,06 | 3,42 ± 0,08 | 3,54 ± 0,06 | 3,51 ± 0,07 |
| | 317 | 3,57 ± 0,06 | 4,02 ± 0,07 | 3,58 ± 0,06 | 3,59 ± 0,08 | 3,29 ± 0,06 | 3,79 ± 0,07 | 3,90 ± 0,06 |
| | 318 | 3,63 ± 0,07 | 3,80 ± 0,08 | 3,72 ± 0,06 | 3,65 ± 0,08 | 3,60 ± 0,06 | 3,65 ± 0,07 | 3,69 ± 0,06 |
| | 319 | 3,28 ± 0,05 | 3,47 ± 0,07 | 3,26 ± 0,09 | 3,63 ± 0,08 | 3,36 ± 0,06 | 3,41 ± 0,08 | 3,68 ± 0,08 |
| HH | 194 | 3,30 ± 0,05 | 3,57 ± 0,08 | 3,37 ± 0,05 | 3,64 ± 0,05 | 3,51 ± 0,06 | 3,60 ± 0,09 | 3,64 ± 0,07 |
| | 224 | 3,20 ± 0,05 | 3,50 ± 0,09 | 3,52 ± 0,07 | 3,56 ± 0,06 | 3,52 ± 0,05 | 3,69 ± 0,08 | 3,43 ± 0,07 |
| | 250 | 3,34 ± 0,06 | 3,41 ± 0,05 | 3,41 ± 0,08 | 3,24 ± 0,05 | 3,76 ± 0,05 | 3,66 ± 0,08 | 3,37 ± 0,04 |
| | 255 | 3,21 ± 0,07 | 3,49 ± 0,07 | 3,37 ± 0,06 | 3,35 ± 0,07 | 3,49 ± 0,11 | 3,44 ± 0,08 | 3,54 ± 0,07 |
| | 288 | 3,61 ± 0,06 | 3,56 ± 0,12 | 3,52 ± 0,09 | 3,58 ± 0,07 | 3,52 ± 0,05 | 3,48 ± 0,06 | 3,68 ± 0,07 |
| HTI-31 | 189 | 3,41 ± 0,05 | 3,36 ± 0,06 | 3,49 ± 0,06 | 3,51 ± 0,05 | 3,29 ± 0,06 | 3,44 ± 0,05 | 3,39 ± 0,04 |
| | 195 | 3,72 ± 0,05 | 3,70 ± 0,08 | 3,62 ± 0,07 | 3,60 ± 0,07 | 3,51 ± 0,06 | 3,43 ± 0,07 | 3,47 ± 0,08 |
| | 218 | 3,31 ± 0,08 | 3,69 ± 0,06 | 3,46 ± 0,07 | 3,71 ± 0,08 | 3,61 ± 0,07 | 3,50 ± 0,05 | 3,56 ± 0,06 |
| | 241 | 3,45 ± 0,06 | 3,35 ± 0,07 | 3,53 ± 0,06 | 3,38 ± 0,06 | 3,25 ± 0,06 | 3,45 ± 0,06 | 3,30 ± 0,06 |
| | 279 | 3,42 ± 0,07 | 3,33 ± 0,06 | 3,65 ± 0,05 | 3,34 ± 0,06 | 3,66 ± 0,07 | 3,56 ± 0,06 | 3,34 ± 0,07 |
| HTI-39 | 168 | 3,31 ± 0,06 | 3,66 ± 0,06 | 3,60 ± 0,05 | 3,61 ± 0,06 | 3,36 ± 0,05 | 3,41 ± 0,03 | 3,49 ± 0,09 |
| | 335 | 3,83 ± 0,05 | 3,60 ± 0,06 | 3,78 ± 0,06 | 3,91 ± 0,08 | 3,49 ± 0,05 | 3,91 ± 0,08 | 3,58 ± 0,05 |
| | 336 | 3,70 ± 0,06 | 3,59 ± 0,06 | 3,74 ± 0,07 | 3,66 ± 0,09 | 3,82 ± 0,06 | 3,64 ± 0,08 | 3,75 ± 0,08 |
| | 349 | 3,98 ± 0,09 | 3,84 ± 0,07 | 3,80 ± 0,07 | 3,81 ± 0,06 | 3,69 ± 0,06 | 3,66 ± 0,08 | 3,74 ± 0,08 |
| | 351 | 3,64 ± 0,06 | 3,32 ± 0,06 | 3,62 ± 0,04 | 3,62 ± 0,06 | 3,44 ± 0,06 | 3,63 ± 0,05 | 3,71 ± 0,07 |
| HTIII | 166 | 3,44 ± 0,07 | 3,30 ± 0,08 | 3,50 ± 0,06 | 3,45 ± 0,09 | 3,61 ± 0,03 | 3,52 ± 0,06 | 3,53 ± 0,06 |
| | 191 | 3,63 ± 0,05 | 3,76 ± 0,07 | 3,80 ± 0,06 | 3,57 ± 0,05 | 3,74 ± 0,07 | 3,94 ± 0,09 | 3,52 ± 0,06 |
| | 204 | 3,65 ± 0,06 | 3,67 ± 0,06 | 3,56 ± 0,05 | 3,64 ± 0,10 | 3,40 ± 0,06 | 3,61 ± 0,07 | 3,55 ± 0,08 |
| | 221 | 3,65 ± 0,05 | 3,66 ± 0,08 | 3,54 ± 0,05 | 3,85 ± 0,06 | 3,78 ± 0,06 | 3,71 ± 0,07 | 3,75 ± 0,06 |
| | 284 | 3,90 ± 0,08 | 3,69 ± 0,07 | 3,72 ± 0,07 | 3,68 ± 0,06 | 3,57 ± 0,05 | 3,62 ± 0,05 | 3,69 ± 0,06 |

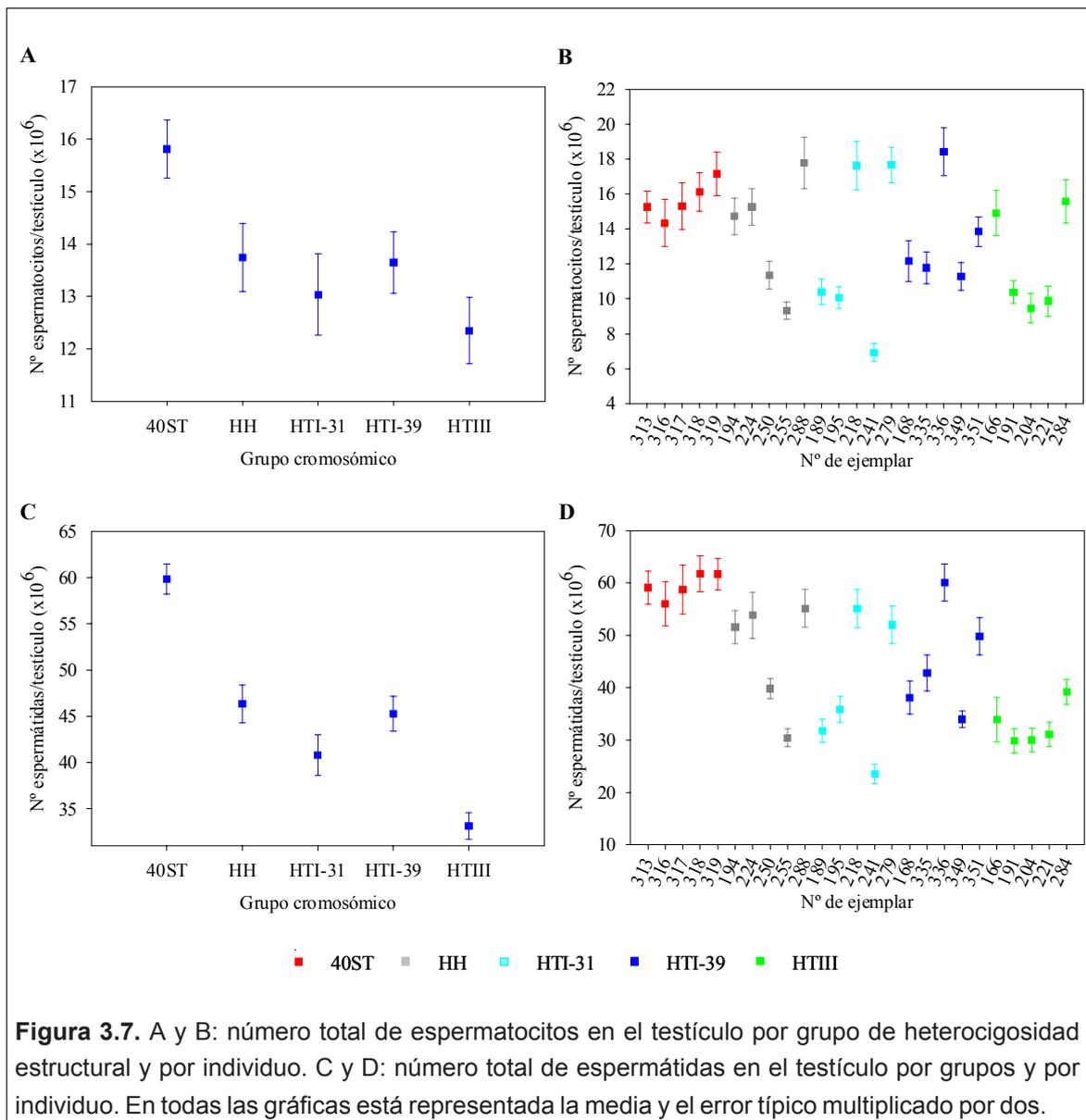
densidades más elevados del grupo ($p < 0,01$). También se encontraron valores significativamente mayores en los individuos 336 y 351 respecto al 349 ($p < 0,01$) y en el 351 respecto al 335 ($p < 0,01$). En el grupo HTIII sólo se encontraron valores significativamente mayores en el ejemplar 166 respecto 204 y 221 (en ambos, $p < 0,01$).

En el estudio de la densidad numérica de las espermátidas se encontraron diferencias significativas entre grupos y animales (grupos cromosómicos: $F=40,45$, $p < 0,001$, animales: $F=16,93$; $p < 0,001$; figuras 3.6 C y D, tabla 3.4). El análisis de comparaciones múltiples de Tukey entre grupos mostró diferencias significativas entre el grupo 40ST y el resto ($p < 0,01$: respecto HH, HTI-31 y HTI-39; $p < 0,001$: respecto HTIII) y entre el grupo HTIII y el resto ($p < 0,001$). Los animales 40ST mostraron las densidades de espermátidas más elevadas, mientras que los individuos HTIII presentaron las más bajas. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos HH, HTI-31 y HTI-39 (figura 3.6 C). El p-valor significativo

obtenido entre animales fue debido a diferencias encontradas entre éstos, en todos los grupos excepto en el HTIII (40ST: $F=22,13$, $p<0,001$; HH: $F=6,53$, $p<0,01$; HTI-31: $F=10,67$, $p<0,001$; HTI-39: $F=44,87$, $p<0,001$). En el grupo 40ST el individuo 318 presentó las mayores densidades numéricas ($p<0,001$ respecto a 313, 317 y 319; $p<0,05$ respecto al 316) y el 317 las menores ($p<0,05$ respecto al 313 y 319; $p<0,01$ respecto al 316). En el grupo HH el individuo 288 presentó valores menores respecto a los ejemplares 194 y 250 ($p<0,05$) y respecto al 224 ($p<0,01$). En el grupo HTI-31 los individuos 189 y 241 mostraron valores de densidades numéricas menores respecto al 218 ($p<0,01$ y $p<0,05$, respectivamente) y al 279 ($p<0,01$). Finalmente entre los especímenes HTI-39, el individuo 349 presentó los menores valores del grupo ($p<0,001$ respecto a 168, 336 y 349; $p<0,05$ respecto a 335). Los individuos 168 y 351 mostraron valores más elevados que los ejemplares 335 (en ambos, $p<0,001$) y 336 ($p<0,001$ y $p<0,01$, respectivamente).

En el análisis del número total de espermatoцитos ($NT\alpha$) se obtuvieron diferencias significativas entre grupos cromosómicos y animales (grupos cromosómicos: $F=26,85$, $p<0,001$; animales: $F=40,90$, $p<0,001$; figuras 3.7 A y B; tabla 3.4). Las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey mostraron que el mayor $NT\alpha$ lo presentó el grupo 40ST ($p<0,001$). Los individuos HTI-31 y HTIII mostraron valores significativamente menores respecto a los grupos 40ST (en ambos, $p<0,001$), HH ($p<0,05$; $p<0,001$) y HTI-39 ($p<0,05$, $p<0,01$). HTI-31 y HTIII no fueron significativamente diferentes. A nivel individual se encontraron diferencias en todos los grupos excepto en el 40ST (HH: $F=37,81$, $p<0,001$; HTI-31: $F=89,69$, $p<0,001$; HTI-39: $F=41,51$, $p<0,001$; HTIII: $F=30,79$, $p<0,001$; figura 3.7 B). En el grupo HH, los ejemplares 194, 224 y 288 presentaron valores significativamente mayores respecto a los individuos 250 y 255. Todas estas diferencias fueron significativas a un nivel de $p<0,001$, excepto las existentes entre los animales 194 y 250 que lo fueron a un $p<0,01$. El ejemplar 194 también presentó mayor número de espermatoцитos que el 288 ($p<0,05$). En el grupo HTI-31 el animal 241 presentó el menor número de espermatoцитos ($p<0,001$ en todas las comparaciones excepto en relación al ejemplar 189, que mostró un $p<0,01$). Los ejemplares 218 y 279 presentaron mayor $NT\alpha$ que los individuos 189, 195 y 241 (todas las comparaciones significativas a un nivel de $p<0,001$). Entre los ejemplares HTI-39, el 336 fue el que presentó los valores más elevados del grupo ($p<0,001$). Finalmente, en el grupo HTIII, los individuos 166 y 284 tuvieron

3.3. RESULTADOS

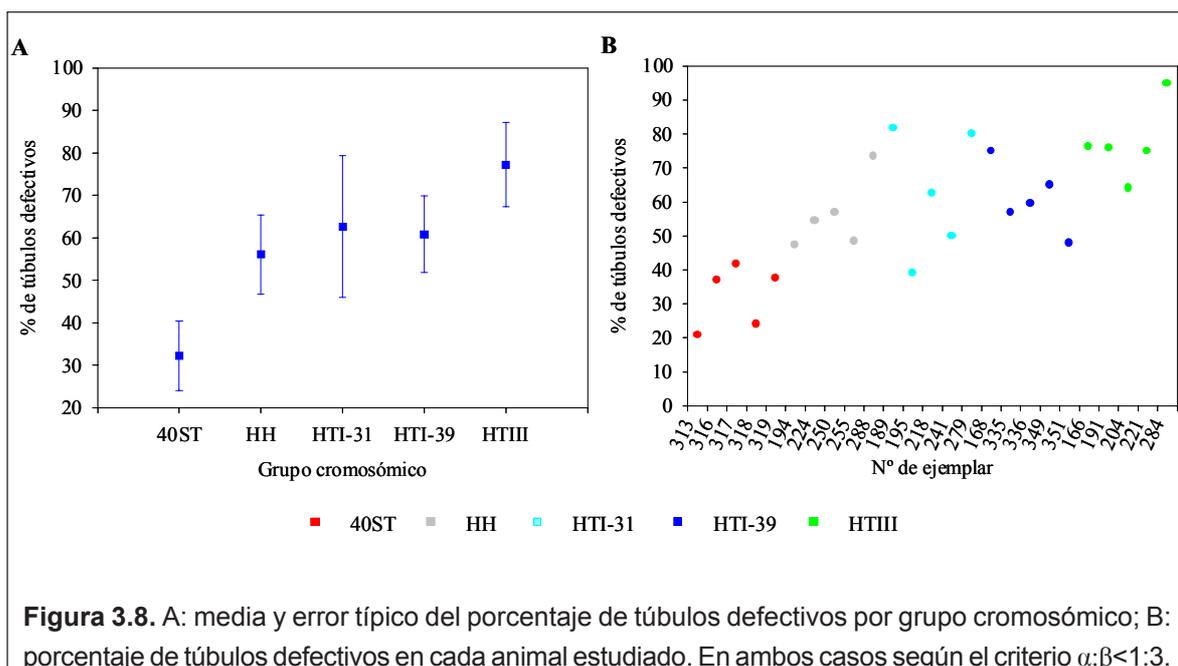


mayor número de espermatozoides totales respecto a los animales 191, 204 y 221 (en todos los casos $p < 0,001$).

El número total de espermátidas ($NT\beta$) mostró un patrón similar al de los espermatozoides. Se encontraron diferencias entre grupos y entre animales (grupo cromosómico: $F=186,51$, $p < 0,001$; animales: $F=34,57$, $p < 0,001$; figuras 3.7 C y D; tabla 3.4). Las diferencias encontradas a nivel de grupo se debieron a que los ejemplares 40ST presentaron el mayor número de espermátidas por testículo y los HTIII el menor. Entre los grupos con un $NT\beta$ intermedio (HH, HTI-31 y HTI-39), los ejemplares HTI-31 mostraron menor número de espermátidas que los de HH y HTI-39. Todas estas diferencias fueron significativas a nivel

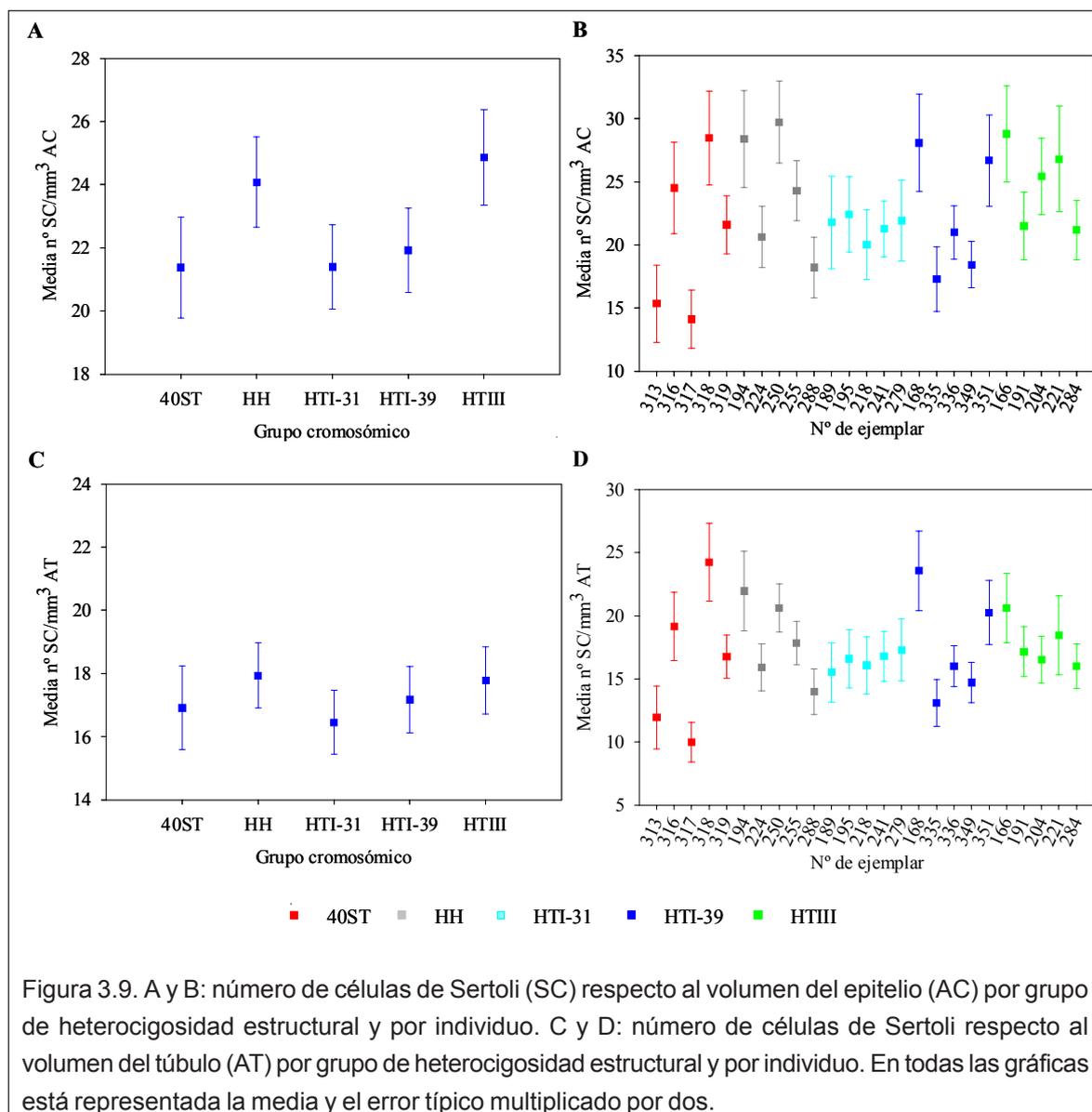
$p < 0,001$. A nivel individual se encontraron diferencias en todos los grupos excepto en 40ST (HH: $F = 39,52$, $p < 0,001$; HT-31: $F = 69,52$, $p < 0,001$; HTI-39: $F = 56,30$, $p < 0,001$; HTIII: $F = 5,78$, $p < 0,01$; figura 3.7 D). En el grupo HH los individuos 194, 224 y 288 presentaron mayor NT β que los ejemplares 250 y 255 (todas las diferencias significativas a $p < 0,001$). También se obtuvieron diferencias significativas entre los especímenes 250 y 255, mostrando este último valores menores ($p < 0,05$). En el grupo HTI-31, los animales 218 y 279 tuvieron mayor número de espermátidas que los ejemplares 189, 195 y 241. El animal 241 presentó menor NT β respecto al 195. Todas estas diferencias fueron significativas a nivel de $p < 0,001$. Entre los ejemplares del grupo HTI-39, el espécimen 336 presentó los mayores valores de NT β ($p < 0,001$). Además se obtuvieron diferencias significativas a nivel $p < 0,001$ entre el animal 351 (con NT β mayor) y los ejemplares 168 y 349, y entre los individuos 335 y 349 ($p < 0,001$), este último con menor NT β . En el grupo HTIII sólo se obtuvieron diferencias significativas entre el animal 284, que presentó mayor número de espermátidas, y los individuos 191 y 204. Estas diferencias fueron significativas a un nivel de $p < 0,05$.

La figura 3.8 muestra los porcentajes de túbulos defectivos obtenidos por grupo cromosómico y por animal para el criterio de $\alpha:\beta < 1:3$. En la tabla 3.4 se muestran los porcentajes de túbulos por animal y por grupo de $\alpha:\beta < 1:3$ (%TD<3), $\alpha:\beta < 1:2$ (%TD<2) y $\alpha:\beta < 1:1$ (%TD<1). Se encontraron diferencias entre grupos cromosómicos para %TD<3 ($F = 8,71$; $p < 0,001$).



3.3. RESULTADOS

Los valores más bajos pertenecieron a los animales estándar ($p < 0,05$ respecto a HH y HTI-39; $p < 0,01$ respecto a HTI-31; $p < 0,001$ respecto a HTIII). Entre el resto de grupos no se encontraron diferencias (tabla 3.4; figura 3.8 A). Respecto a $\%TD < 2$ y $\%TD < 1$ se observó que los animales estándar (40ST) y homocigotos para todas las fusiones (HH) presentaron un bajo porcentaje de túbulos con $\alpha:\beta < 1:2$, mientras que en los animales heterocigotos, especialmente los del grupo HTIII, estos porcentajes fueron más elevados. Tan sólo se encontraron dos animales, ambos pertenecientes al grupo HTIII, con túbulos que presentaron un índice $\alpha:\beta < 1:1$ (tabla 3.4).



3.3.3.2. Estimación de las densidades de células de Sertoli

En la figura 3.9 están representados los valores medios del número de células de Sertoli relativo al volumen del epitelio y al volumen del túbulo. En el primer caso se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos y entre animales (grupos cromosómicos: $F=3,82$, $p<0,01$, animales: $F=5,53$, $p<0,001$; figuras 3.9 A y B, tabla 3.7). Las diferencias entre grupos cromosómicos se debieron a los valores medios significativamente mayores del grupo HTIII respecto al 40ST ($p<0,05$). El p-valor significativo obtenido para el factor animal fue debido a las diferencias encontradas entre animales en los grupos 40ST ($F=9,09$; $p<0,001$), HH

Tabla 3.7. Número de células de Sertoli (SC) respecto al volumen del epitelio (AC) y respecto al volumen del túbulo (AT). En cursiva se indican los valores obtenidos por grupo. Se muestra la media y el error típico.

| Grupo cromosómico | Nº animal | nº CS/mm ³ AC | nº CS/mm ³ AT |
|-------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| 40ST | 313 | 15,37 ± 1,53 | 11,96 ± 1,25 |
| | 316 | 24,51 ± 1,81 | 19,15 ± 1,35 |
| | 317 | 14,13 ± 1,15 | 9,98 ± 0,79 |
| | 318 | 28,47 ± 1,85 | 24,23 ± 1,55 |
| | 319 | 21,59 ± 1,16 | 16,77 ± 0,86 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>21,38 ± 0,80</i> | <i>16,91 ± 0,66</i> |
| HH | 194 | 28,39 ± 1,92 | 21,96 ± 1,58 |
| | 224 | 20,64 ± 1,20 | 15,91 ± 0,93 |
| | 250 | 29,71 ± 1,62 | 20,60 ± 0,95 |
| | 255 | 24,29 ± 1,18 | 17,84 ± 0,87 |
| | 288 | 18,22 ± 1,21 | 13,97 ± 0,90 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>24,08 ± 0,72</i> | <i>17,94 ± 0,52</i> |
| HTI-31 | 189 | 21,80 ± 1,84 | 15,52 ± 1,17 |
| | 195 | 22,42 ± 1,49 | 16,60 ± 1,15 |
| | 218 | 20,01 ± 1,38 | 16,08 ± 1,13 |
| | 241 | 21,27 ± 1,10 | 16,79 ± 0,99 |
| | 279 | 21,93 ± 1,59 | 17,28 ± 1,22 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>21,39 ± 0,66</i> | <i>16,45 ± 0,51</i> |
| HTI-39 | 168 | 28,08 ± 1,93 | 23,56 ± 1,58 |
| | 335 | 17,30 ± 1,27 | 13,08 ± 0,92 |
| | 336 | 21,00 ± 1,06 | 16,00 ± 0,80 |
| | 349 | 18,44 ± 0,92 | 14,72 ± 0,79 |
| | 351 | 26,69 ± 1,81 | 20,24 ± 1,27 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>21,92 ± 0,67</i> | <i>17,17 ± 0,52</i> |
| HTIII | 166 | 28,78 ± 1,90 | 20,63 ± 1,38 |
| | 191 | 21,51 ± 1,35 | 17,14 ± 0,98 |
| | 204 | 25,43 ± 1,52 | 16,51 ± 0,93 |
| | 221 | 26,79 ± 2,09 | 18,44 ± 1,57 |
| | 284 | 21,18 ± 1,17 | 16,00 ± 0,88 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>24,86 ± 0,76</i> | <i>17,79 ± 0,53</i> |

3.3. RESULTADOS

($F=6,80$; $p<0,001$) y HTI-39 ($F=7,67$; $p<0,001$). En el grupo 40ST, el animal 318 mostró valores significativamente mayores que el 313 y el 317 ($p<0,01$); en el grupo HH el animal 288 mostró valores significativamente menores que el 194 ($p<0,05$) y 250 ($p<0,01$); en el grupo HTI-39, los animales 168 y 351 mostraron valores significativamente mayores que 335 y 349 ($p<0,05$). El número de células de Sertoli relativo al volumen del túbulo no mostró diferencias significativas entre grupos cromosómicos pero sí entre los animales ($F=6,25$; $p<0,001$; figuras 3.9 C y D; tabla 3.7). Estas diferencias entre individuos se encontraron en los grupos 40ST ($F=13,91$; $p<0,001$), HH ($F=5,08$; $p<0,01$) y HTI-39 ($F=9,62$; $p<0,001$). En el grupo 40ST el individuo 318 mostró valores más elevados que el 313, 317 (en ambos, $p<0,001$) y 319 ($P<0,05$). El animal 316 también mostró valores significativamente mayores que el 317 ($p<0,05$). En el grupo HH el espécimen 288 presentó valores inferiores al 194 ($p<0,05$). En el grupo HTI-39 el individuo 168 mostró valores más elevados que los ejemplares 335 ($p<0,01$), 336 ($p<0,05$) y 349 ($p<0,01$) y el animal 351 mayores respecto al 335 ($p<0,05$).

3.3.3.3. Medidas relacionadas con la sección de los túbulos seminíferos

El análisis de la densidad de volumen para el epitelio mostró diferencias significativas entre grupos y animales (grupos cromosómicos: $F=20,12$, $p<0,001$; animales: $F=7,55$; $p<0,001$; figura 3.10, tabla 3.8). Los grupos HH y HTIII presentaron una proporción de epitelio menor respecto a los grupos 40ST ($p<0,05$; $p<0,001$), HTI-31 ($p<0,01$; $p<0,001$) y HTI-39 ($p<0,001$).

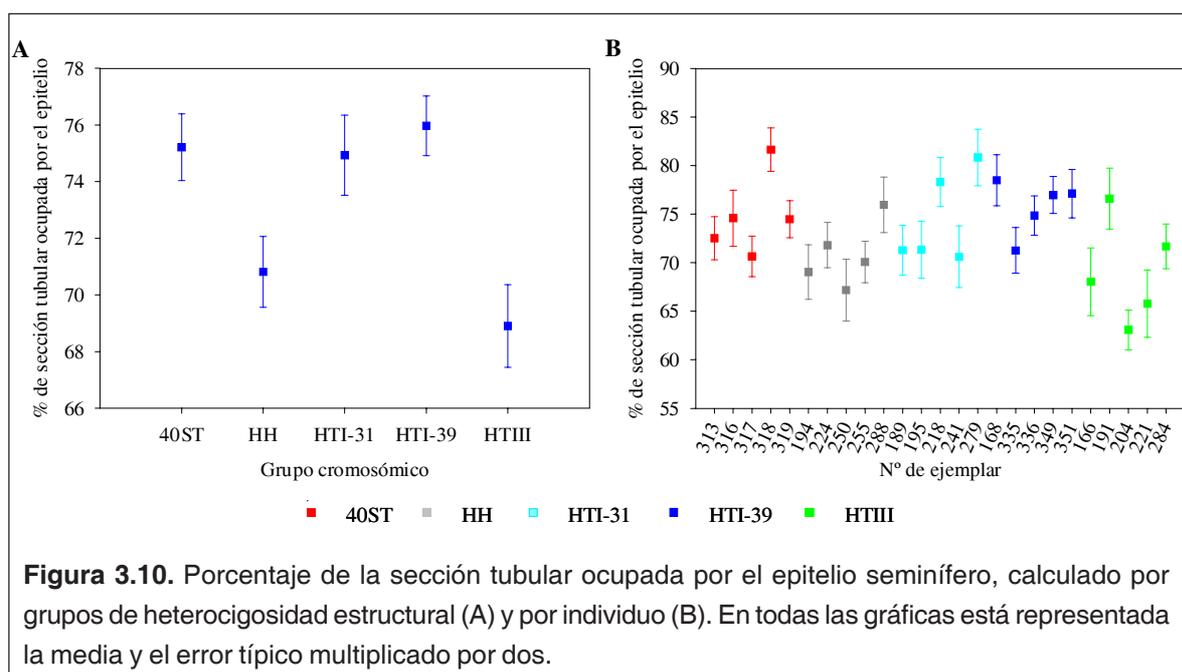


Tabla 3.8. Proporción de la sección del túbulo ocupado por la luz y diámetros tubulares. En cursiva se indican los valores obtenidos por grupo. Se muestra la media y el error típico.

| Grupo cromosómico | Nº animal | % de sección tubular ocupada por el epitelio | diámetro tubular (µm) |
|-------------------|--------------------|--|-----------------------|
| 40ST | 313 | 72,52 ± 1,11 | 159,02 ± 4,47 |
| | 316 | 74,60 ± 1,45 | 132,76 ± 2,44 |
| | 317 | 70,66 ± 1,05 | 170,19 ± 4,38 |
| | 318 | 81,66 ± 1,12 | 146,26 ± 3,31 |
| | 319 | 74,49 ± 0,95 | 155,38 ± 4,44 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>75,22 ± 0,59</i> | <i>152,67 ± 2,01</i> |
| HH | 194 | 69,05 ± 1,41 | 141,07 ± 4,43 |
| | 224 | 71,82 ± 1,17 | 156,82 ± 4,81 |
| | 250 | 67,18 ± 1,59 | 143,73 ± 2,76 |
| | 255 | 70,07 ± 1,06 | 145,50 ± 3,84 |
| | 288 | 75,96 ± 1,43 | 145,17 ± 5,31 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>70,81 ± 0,63</i> | <i>146,62 ± 1,99</i> |
| HTI-31 | 189 | 71,30 ± 1,28 | 156,45 ± 4,06 |
| | 195 | 71,35 ± 1,47 | 149,41 ± 4,21 |
| | 218 | 78,31 ± 1,25 | 139,35 ± 3,25 |
| | 241 | 70,61 ± 1,58 | 162,92 ± 4,70 |
| | 279 | 80,85 ± 1,45 | 125,42 ± 2,56 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>74,94 ± 0,71</i> | <i>145,45 ± 1,92</i> |
| HTI-39 | 168 | 78,51 ± 1,32 | 129,91 ± 3,96 |
| | 335 | 71,27 ± 1,18 | 165,36 ± 4,11 |
| | 336 | 74,87 ± 1,02 | 150,67 ± 2,68 |
| | 349 | 76,97 ± 0,96 | 143,24 ± 2,46 |
| | 351 | 77,13 ± 1,25 | 136,74 ± 2,62 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>75,97 ± 0,53</i> | <i>144,57 ± 1,50</i> |
| HTIII | 166 | 68,04 ± 1,74 | 127,90 ± 4,50 |
| | 191 | 76,60 ± 1,58 | 142,86 ± 5,13 |
| | 204 | 63,08 ± 1,02 | 149,82 ± 3,89 |
| | 221 | 65,79 ± 1,74 | 156,53 ± 5,69 |
| | 284 | 71,69 ± 1,16 | 142,23 ± 3,32 |
| | <i>Valor grupo</i> | <i>68,91 ± 0,73</i> | <i>143,01 ± 2,09</i> |

En la figura 3.10 A están representadas las medias de la proporción de la superficie tubular ocupada por el epitelio, para cada uno de los grupos cromosómicos. Se encontraron diferencias entre animales en todos los grupos (40ST: $F=6,88$, $p<0,001$; HH: $F=4,76$, $p<0,01$; HTI-31: $F=12,2$, $p<0,001$; HTI-39: $F=3,74$; $p<0,05$; HTIII: $F=9,96$, $p<0,001$; figura 3.10 B). En el grupo 40ST, el animal 318 mostró valores mayores que los individuos 313 ($p<0,05$) y 317 ($p<0,001$). En el grupo HH el animal 288 mostró valores más altos que el individuo 250 ($p<0,05$). En el grupo HTI-31 los animales 218 y 279 mostraron valores mayores que los animales 189 ($p<0,05$; $p<0,001$), 195 ($p<0,05$; $p<0,01$) y 241 ($p<0,05$; $p<0,001$). En la figura 3.11 (A y B) se puede apreciar la proporción de superficie del túbulo ocupada por el epitelio en un animal perteneciente al grupo 40ST y en otro correspondiente al grupo HTIII.

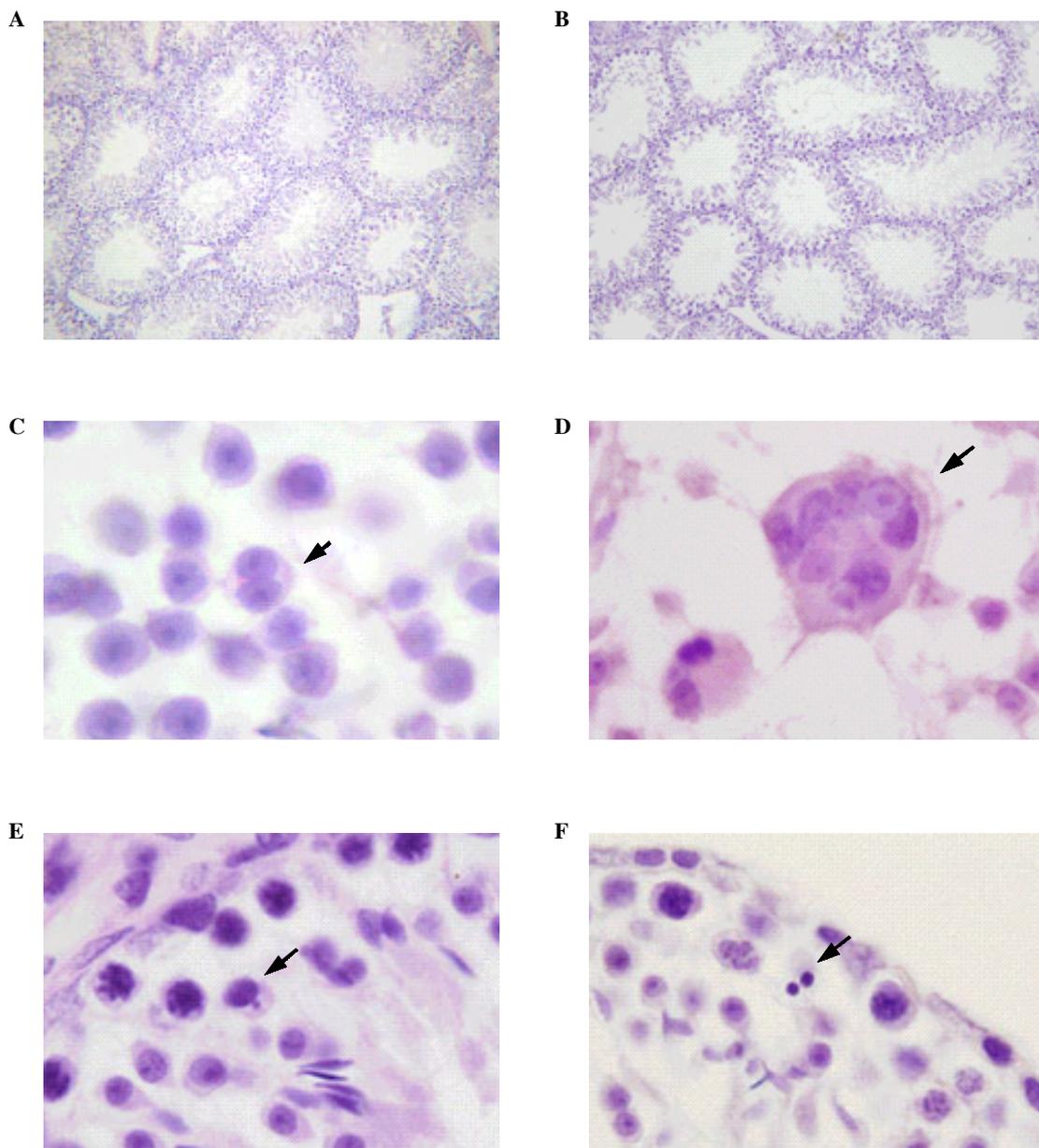
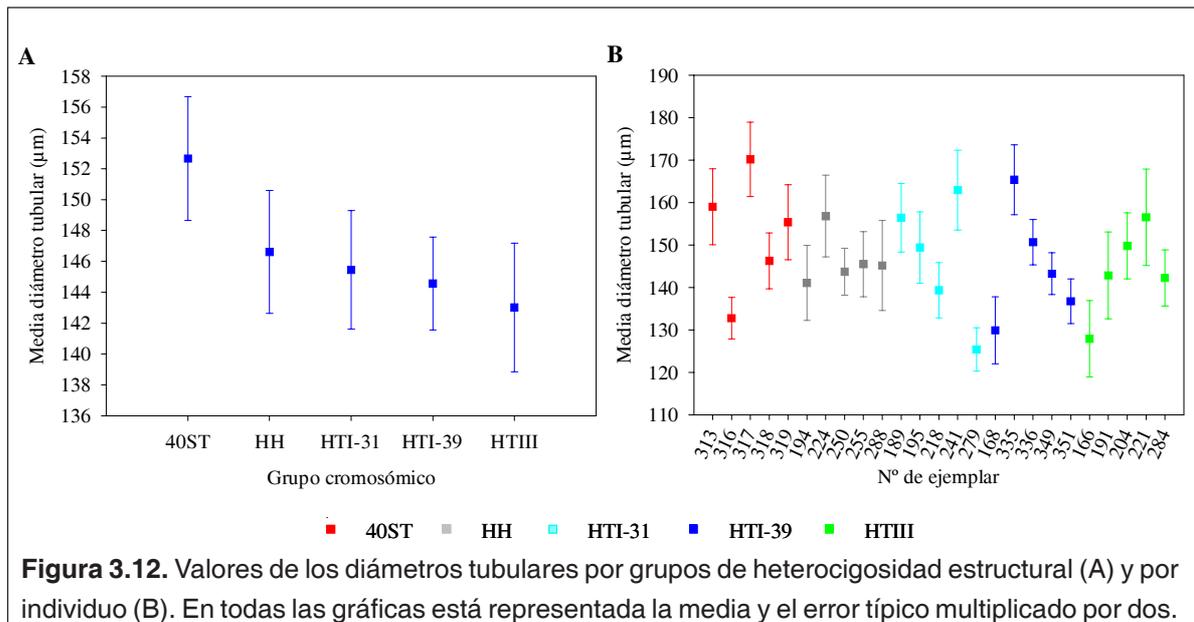


Figura 3.11. A y B: secciones histológicas de los túbulos seminíferos (100x) correspondiente a los individuos 313 (40ST) y 166 (HTIII), respectivamente. C: espermátida binucleada (1000x) observada en la sección de un túbulo seminífero en estadio VI, perteneciente al animal 224 (HH). D: simplasto (1000x) observado en la sección de un túbulo seminífero en estadio V, correspondiente al animal 284 (HTIII). E: célula apoptótica (400x) encontrada en un túbulo seminífero en estadio II-III del individuo 218 (HTI-31). F: célula apoptótica (400x) encontrada en un túbulo seminífero en estadio VI del individuo 166 (HTIII). Las secciones han sido teñidas con la técnica del P.A.S. y contrastadas con hematoxilina.



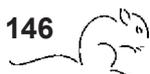
Los valores medios del diámetro menor de la sección tubular fueron significativamente diferentes entre los grupos y entre animales (grupos cromosómicos: $F=4,54$, $p<0,01$; animales: $F=10,28$, $p<0,001$; figura 3.12, tabla 3.8). El grupo 40ST mostró valores significativamente mayores respecto al HTI-39 y HTIII ($p<0,05$). Todos los grupos, excepto el HH, presentaron diferencias entre animales (40ST: $F=10,39$, $p<0,001$; HTI-31: $F=16,84$, $p<0,001$; HTI-39: $F=12,93$, $p<0,001$; HTIII: $F=7,76$, $p<0,001$; figura 3.12 B). En el grupo 40ST el individuo 316 mostró valores significativamente menores que los animales 313 ($p<0,01$), 317 ($p<0,001$) y 319 ($p<0,05$). El animal 317 presentó valores mayores respecto al 318 ($p<0,05$). En el grupo HTI-31, el animal 279 mostró valores menores respecto a los especímenes 189 ($p<0,001$), 195 ($p<0,01$) y 241 ($p<0,001$), y el animal 218 presentó valores mayores que el 241 ($p<0,01$). En el grupo HTI-39 el animal 335 presentó valores mayores respecto a 168 ($p<0,001$), 359 ($p<0,01$) y 351 ($p<0,01$). El animal 336 también mostró valores mayores que el 168 ($p<0,01$). En el grupo HTIII el animal 166 tuvo valores significativamente menores respecto a 204 ($p<0,01$) y 221 ($p<0,001$).

3.4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sobre muerte de células germinales y de parámetros relacionados con la actividad espermática, como tamaño de túbulos seminíferos y número de células de Sertoli, contribuyen a incrementar la información de la que se dispone sobre los efectos de

las translocaciones Robertsonianas en la fertilidad de los machos de *M. domesticus* en poblaciones naturales. Puesto que el estudio de proporciones celulares es una forma efectiva de cuantificar la muerte celular (Russell & Clermont, 1977; Russell *et al.*, 1987), las principales conclusiones aquí obtenidas se han basado en el número de espermátidas producidas por espermatocono. Estos resultados, junto con los datos relacionados con la actividad espermática, apuntan hacia una reducción en la producción de espermatozoides en los animales con fusiones Robertsonianas, principalmente en aquellos con tres fusiones independientes en heterocigosis. Sin embargo, los efectos sobre la fertilidad de las translocaciones aquí analizadas no fueron tan drásticos como los obtenidos por otros autores en estudios en los que los animales examinados tenían mayor número de fusiones en heterocigosis o éstas presentaban homología monobranquial (Redi *et al.*, 1985; Hauffe & Searle, 1998; Eaker *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2002). No es esperable que las diferencias encontradas entre grupos se deban a la estacionalidad, puesto que la especie estudiada es comensal y presenta actividad reproductora durante todo el año (López-Fuster, 1978).

En primer lugar cabe esperar que no exista un paro o un retraso en el proceso espermatogénico, debido a la presencia de fusiones Robertsonianas, en los ejemplares del presente estudio, puesto que no se encontraron diferencias en las frecuencias de los estadios de la espermatogénesis entre los grupos de heterocigosis estructural, ni entre éstos y las cepas de ratones de laboratorio analizadas por otros autores (Clermont & Trott, 1969). Estos resultados difieren de los encontrados por Redi *et al.* (1985) o por Eaker *et al.* (2001). En ambos estudios se detectó un retraso en el proceso de la espermatogénesis a nivel del estadio XII, acompañado de aumento de células apoptóticas en dicho estadio, lo que sugirió la pérdida de espermatoconos durante la meiosis I. La diferencia entre los resultados aquí obtenidos y los correspondientes a dichos estudios es muy probable que se deban al tipo y al número de fusiones que presentaron los animales. Mientras que en nuestro estudio se analizó la espermatogénesis en individuos con un máximo de tres fusiones Robertsonianas, en el realizado por Eaker *et al.* (2001) los ejemplares eran heterocigotos estructurales para cuatro translocaciones. Por otra parte, Redi *et al.* (1985) centraron sus investigaciones en la reproducción de individuos con dos o más fusiones con homología monobranquial. Un incremento en el número de fusiones en heterocigosis independientes y, sobre todo, la



presencia de fusiones con homología monobranquial pueden tener efectos drásticos en el transcurso de la espermatogénesis (Hauffe & Searle, 1998). También se debe tener presente que el ciclo de maduración del epitelio seminífero es un proceso continuo y sus estadios son porciones de dicho continuo cuya identificación puede variar de un investigador a otro. La duración relativa de los estadios del ciclo también puede variar de una cepa a otra. En el presente estudio la duración relativa de cada estadio correspondió al promedio entre los animales de cada grupo (n=5) y se observó que las desviaciones estándar obtenidas fueron altas (tabla 3.3). Así, en caso de existir diferencias sólo se podrían haber identificado si éstas fueran muy importantes. Otro factor a tener en cuenta es que los animales aquí utilizados provienen del medio natural, a diferencia de los analizados por Eaker *et al.* (2001) y Redi *et al.* (1985). Cabe esperar que la varianza dentro de grupo sea mayor en animales procedentes de poblaciones naturales que en animales de laboratorio, puesto que en estos últimos las condiciones de desarrollo se realizan bajo temperatura y humedad ambiental controladas, y no están sometidos a factores externos fluctuantes como sucede en condiciones naturales.

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diversos grupos de heterocigosidad para las variables relacionadas con el tamaño testicular, pero se observó una tendencia de éstas a presentar valores mayores en los ejemplares estándar. Se apreció una amplia variabilidad dentro de los grupos, mostrando los individuos estándar los valores más homogéneos. Esta variabilidad no pareció relacionarse con el tamaño e, indirectamente, con la edad del individuo, puesto que animales de similar talla presentaron pesos testiculares diversos. Cabe destacar los pesos testiculares y tamaños corporales pequeños de los ejemplares 250 y 255. Esto podría hacer pensar que se trate de animales juveniles en los que el testículo no ha alcanzado su estado adulto. Sin embargo, otros ejemplares analizados con medidas corporales similares (284 del grupo HTIII y 279 del grupo HTI-31) mostraron pesos testiculares bastante superiores. Además la longitud de la vesícula seminal de todos los animales estudiados fue mayor de 4,5 mm, valor a partir del cual *M. domesticus* se pueden considerar adulto (López-Fuster, 1978). Estos datos en su conjunto sugieren que todos los animales seleccionados para el estudio eran adultos y perfectamente comparables entre sí. Otros autores sí encontraron diferencias, en las masas testiculares, entre animales

estándar y ejemplares con fusiones Robertsoninas. Así, los datos presentados por Wallace *et al.* (1992) muestran pesos testiculares mayores en animales con $2n=40$ cromosomas que en homocigotos Robertsonianos procedentes de poblaciones naturales. Nada comentan estos autores acerca de las diferencias entre los animales estándar y los heterocigotos estructurales respecto a esta variable (Wallace *et al.*, 1992). También Hauffe & Searle (1998) hallan masas testiculares y vesiculares más elevadas en los animales estándar que en el resto de grupos Robertsonianos. Cabe destacar que estos animales con reducción cromosómica corresponden a dos razas Robertsonianas de $2n=24$ y $2n=26$, y a híbridos de estas razas, o entre éstas y la estándar. Estos híbridos corresponden a ejemplares heterocigotos múltiples independientes para 7 y 8 fusiones y heterocigotos múltiples dependientes para tres fusiones con lo que es de esperar que el tamaño gonadal y la reducción en fertilidad encontrada por estos autores fuese más acusada.

En el presente estudio, a pesar de que los pesos testiculares no variaron substancialmente entre grupos, ni tampoco el tamaño de las vesículas seminales, sí que se detectaron diferencias a nivel de los diámetros de las secciones tubulares. Existe una relación positiva entre el diámetro tubular y la actividad espermatogénica de los testículos (Sinha Hikim *et al.*, 1989). La medida del diámetro tubular se considera algo más indicativa que la masa testicular para discriminar entre diferentes niveles de alteraciones espermatogénicas (Russel *et al.*, 1990a). Para esta variable los valores más elevados correspondieron al grupo 40ST, aunque las diferencias encontradas fueron significativas sólo entre este grupo y los ejemplares HTI-39 y HTIII. Se obtuvo también una gran variabilidad individual. Si bien en algunos grupos aparecieron animales con valores elevados similares a los encontrados en el grupo 40ST (ejemplares 241 del grupo HTI-31 y 336 del grupo HTI-39), en éste predominaron los túbulos con un diámetro superior a $150\ \mu\text{m}$, mientras que en el resto de grupos los túbulos más frecuentes fueron de tamaño inferior. Así, cabe esperar una mayor actividad espermatogénica en los animales estándar.

Normalmente existe una correlación entre el peso de los testículos y el número de células germinales (Searle & Beechey, 1974; Meistrich, 1982; Sinha Hikim *et al.*, 1989). Aunque las diferencias entre los tamaños testiculares de los diversos grupos no fueron evidentes, se

obtuvieron diferencias en la población celular de los túbulos seminíferos a dos niveles, entre grupos de heterocigosidad estructural y entre individuos. Se observó que los animales con translocaciones Robertsonianas presentaron mayor desviación del índice $\alpha:\beta$ respecto a la proporción esperada 1:4, en especial aquellos ejemplares con fusiones múltiples en heterocigosis (HTIII). La reducción del índice $\alpha:\beta$ en los grupos HH, HTI-31, HTI-39 y especialmente en HTIII indicó una disminución en número de la población de espermátidas. El descenso de la proporción de espermátidas respecto a espermatoцитos no fue homogéneo en todos los túbulos, tal y como se pudo comprobar al estudiar el porcentaje de túbulos defectivos. Mientras que entre los animales del grupo estándar el porcentaje de túbulos defectivos con $\alpha:\beta < 1:3$ apenas superaba el 40%, en el resto de grupos este porcentaje varió entre el 39% y el 95%. El mayor porcentaje de túbulos defectivos con $\alpha:\beta < 1:2$ lo presentaron los individuos HTIII, y sólo en este grupo se encontraron animales con un índice $\alpha:\beta < 1:1$. Tampoco existió homogeneidad entre los valores obtenidos para los animales de un mismo grupo (véase más abajo). En la figura 3.11 (C-F) se pueden observar evidencias de esta degeneración celular.

Los valores de muerte celular encontrados en la presente investigación difieren ligeramente de los obtenidos por otros autores en poblaciones salvajes. Respecto a los resultados obtenidos en este estudio, Wallace *et al.* (1992) encontraron valores menores de muerte celular (GCD) tanto en los animales estándar (7%-17,5%, media=11,5 \pm 2,04, n=3) como en los homocigotos estructurales (13,75%-30,5%, media=21,32 \pm 2,65, n=7), y similares en los heterocigotos estructurales simples y múltiples con dos fusiones independientes en heterocigosis (15%-57%, media=33,33 \pm 5,63, n=6); no obstante, sólo detectaron diferencias significativas entre los animales homocigotos, en los que incluyen los animales estándar, y los heterocigotos. Los resultados presentados por Hauffe & Searle (1998) mostraron un valor medio de GCD para heterocigotos simples procedentes de una zona híbrida natural menor que el obtenido en el presente estudio (15,5%-39%, media=25,51 \pm 3,38, n=6). Los valores que obtuvieron de GCD para los animales estándar fue similar al encontrado para los heterocigotos simples (25,8 \pm 2,5, n=4). Everett & Searle (1990) encontraron mayor GCD, comprendida entre 45,2 y 36,4 %, en heterocigotos u homocigotos para una fusión. Pero estos animales procedían de la introducción de las translocaciones en una cepa de laboratorio,

3.4. DISCUSIÓN

con lo que estos elevados valores de GCD podrían ser el resultado de incompatibilidad entre contextos genéticos. Los valores obtenidos aquí para HTIII son ligeramente más elevados que los encontrados para individuos con cuatro fusiones en heterocigosis simple descendientes de cruces en cautividad entre animales procedentes de Migiono (Italia) y Ribigill (Escocia; 37,91%-33,31%, media=35,61±2,3, n=2; Wallace *et al.*, 2002), aunque cabría esperar que, en estos últimos individuos, los valores de GCD fueran más elevados debido al mayor número de fusiones en heterocigosis y a la existencia de incompatibilidad entre contextos genéticos dada la distancia geográfica. Estas discrepancias entre los resultados de GCD obtenidos por diversos autores pueden reflejar que no sólo el número de fusiones en heterocigosis está influenciando la reducción de la fertilidad, sino también el tipo de fusión implicada y el contexto genético. Aún así, tanto los resultados expuestos en el presente capítulo, como los publicados por otros autores, abogan por una reducción en la producción de espermátidas cuando aumenta el número de fusiones en heterocigosis.

No sólo se vio afectada la producción de espermátidas en animales que presentaban translocaciones Robertsonianas. Si bien las densidades numéricas de espermatoцитos no mostraron grandes diferencias entre grupos, el número de espermatoцитos totales en el testículo pareció reducirse en los ejemplares con translocaciones Robertsonianas debido a que, en general, estos animales presentaban volúmenes de testículo menores. Estos valores siguieron el mismo patrón que el del $\beta:\alpha$, presentado los valores más elevados el grupo 40ST, los más bajos el grupo HTIII y valores intermedios los grupos HH, HTI-31 y HTI-39. Esto sugiere que en los grupos con polimorfismo Robertsoniano se está produciendo pérdida celular en una fase anterior a la primera división meiótica, ya sea a nivel de los espermatoцитos primarios o en estadios anteriores a la formación de éstos, como por ejemplo en las divisiones mitóticas que mantienen la población de espermatogonias o en aquellas que dan lugar a la formación de los espermatoцитos. Los espermatoцитos primarios de los heterocigotos estructurales presentan alteraciones en la regulación de las actividades enzimáticas (Hotta & Chandley, 1982), diferencias cualitativas en los patrones proteicos (Forejt, 1982) y mayor duración de la profase I (Redi *et al.*, 1985). Muy probablemente estén implicados *checkpoints* para controlar, por una parte, la compleja maquinaria bioquímica y génica que actúa durante la profase I y, por otra, el correcto apareamiento de los cromosomas homólogos, siendo

estos *checkpoints* capaces de eliminar por apoptosis aquellas células que presenten errores durante esta fase meiótica (Odorisio *et al.*, 1998; Handel *et al.*, 1999; Garagna *et al.*, 2001). Por otro lado, resultados obtenidos por Redi *et al.* (1985) muestran que se produce una disminución de la población de espermatogonias proliferativas en animales con dos cromosomas Robertsonianos que presentan homología de uno de los brazos, aunque este decremento queda amortiguado por un aumento del número de espermatogonias proliferativas que entran en la fase de diferenciación (Redi *et al.*, 1983). Los resultados obtenidos en la presente investigación sugieren que el aumento en el número de espermatogonias que entran en la fase de diferenciación no es suficiente para alcanzar una población de espermátocitos de densidad similar a la que presentan los individuos “normales”, considerando como tales los ejemplares de cariotipo estándar. Aunque el número de células espermatogénicas es mayor en los animales 40ST debido a su mayor masa testicular, esto no quedó reflejado cuando se compararon los pesos testiculares. Observando los resultados por individuo relativos al número total de espermátidas y espermátocitos, se pudo apreciar que algunos ejemplares con mayor muerte de espermátidas que los estándar presentaban números elevados de espermátocitos, que en ocasiones superaban al obtenido en los animales pertenecientes al grupo 40ST. Cabe destacar los ejemplares con menor índice $\beta:\alpha$ (166 y 284) que presentaron los mayores números de espermátocitos de su grupo (HTIII). Quizás en estos individuos entran un mayor número de espermatogonias proliferativas en estado diferenciación con la finalidad de amortiguar la muerte celular que se produce durante la meiosis.

El número de células de Sertoli determina el tamaño testicular y la capacidad para producir espermatozoides, así como el control de la entrada en la meiosis (Orth *et al.*, 1988; Russel *et al.*, 1990b; Mackay, 2000). En el presente estudio, las densidades de estas células no parecieron verse modificadas entre grupos. Aunque sí se obtuvieron valores mayores en los grupos HTIII y HH del número de células de Sertoli en función del volumen celular, estas diferencias desaparecieron cuando esta densidad se calculó relativa al volumen total de la sección tubular. Seguramente estas diferencias fueron consecuencia, en parte, de la disminución de la población de espermátidas y espermátocitos. Además se debe tener en cuenta la amplia variabilidad individual obtenida en el número de células de Sertoli relativo al

3.4. DISCUSIÓN

volumen del epitelio, la cual puede estar jugando un papel importante en las diferencias y similitudes obtenidas entre grupos, pudiendo ser en algún caso resultado del azar. Así cabe suponer que el número de células de Sertoli no se ve afectado por la presencia de fusiones. Estos resultados, junto con los obtenidos por Redi *et al.* (1985), sobre el número de células de Sertoli en animales con fusiones Robertsonianas con homología monobranquial, o los mostrados por este mismo autor sobre el compartimento extratubular en estos animales (Redi *et al.*, 1983), parecen indicar una substancial viabilidad de las células somáticas de los individuos portadores de estas translocaciones.

El conjunto de los resultados muestra en general una mayor muerte celular, en la línea de células germinales, en los ejemplares con fusiones Robertsonianas, especialmente cuando más de una translocación está presente en heterocigosis estructural. No obstante parece que no sólo la heterocigosis estructural juega un papel importante en la reducción de células germinales. Animales homocigotos para todas las fusiones (HH) presentan valores más altos de GCD que los 40ST. Se ha de tener en cuenta que aún siendo homocigotos, estos animales no pertenecen a ninguna raza cromosómica sino que descienden de cruces entre animales con fusiones Robertsonianas. Esta fertilidad diferencial tanto entre animales estándar y homocigotos estructurales, como entre heterocigotos simples y múltiples, junto con la gran variabilidad individual hallada, sugiere que la disminución de células germinales se debe a un efecto combinado de varios factores: número de fusiones en heterocigosis, tipo de cromosomas implicados en la fusión y heterocigosis génica. De entre estos factores, históricamente se ha dado más importancia al número de fusiones debido a su efecto sobre los procesos de no disyunción meiótica y apareamiento defectivo de los cromosomas en la sinapsis (Gropp *et al.*, 1982b; Miklos, 1974; Wallace *et al.*, 1992), pero no se deben ignorar el resto, cuya importancia no es despreciable. A nivel individual, los indicios más claros de esto los encontramos en los grupos 40ST, HTI-31 o los HTIII. En principio cabe esperar que los ejemplares que componen el grupo estándar sean muy próximos genéticamente, debido a que todos ellos proceden de una misma población. Es en este grupo donde se encontraron valores más homogéneos entre individuos respecto al número de células germinales totales y en el índice de muerte celular. Sin embargo, en los grupos HTI-31 y HTIII, donde existe mayor heterogeneidad tanto en la procedencia de los individuos como en la composición

cromosómica, se encuentran diferencias a nivel individual. En el grupo HTIII se hallaron los valores del índice $\beta:\alpha$ más bajos del total de la muestra analizada, que correspondieron a los individuos 166 y 284. Cabe destacar el elevado porcentaje de túbulos defectivos de ambos ejemplares, sobre todo para los criterios de $\alpha:\beta < 1:3$ y $\alpha:\beta < 1:2$. El individuo 166 presentaba un cariotipo de $2n=37$ con tres fusiones en heterocigosis, siendo muy probable que procediese de retrocruzamientos repetidos entre animales estándar y especímenes con alguna de estas fusiones, en homocigosis o heterocigosis, introduciendo de esta forma fusiones Robertsonianas en el contexto genético de las poblaciones estándar. Esta hibridación a nivel genético es la explicación que Everett *et al.*, (1996) dan a los altos valores de no disyunción meiótica encontrados en heterocigotos simples. Evidencias de esto también se encuentran en estudios que muestran que cepas de laboratorio con cromosomas Robertsonianos, introducidos mediante cruzamientos con animales procedentes de poblaciones naturales, presentan frecuencias de mala segregación más elevadas que cepas de laboratorio en las que los cromosomas Robertsonianos han aparecido espontáneamente, lo que sugiere que el contexto genético es una variable a tener en cuenta en análisis de fertilidad en poblaciones Robertsonianas (Winking, 1980; Gropp & Winking, 1981; Winking *et al.*, 2000). Sin embargo, los ejemplares aquí estudiados con una fusión en heterocigosis presentaban menor muerte celular que los HTIII, con lo que cabe pensar que además de la hibridación génica, el número de fusiones en heterocigosis sea un factor adicional. El 284 fue el ejemplar con el número cromosómico más bajo de todos los analizados y presentó la fusión Rb(7.17) en heterocigosis. Esta mutación, como ya se comentó en el capítulo 2, es la que tiene una extensión geográfica más limitada y tan sólo ha sido encontrada en una ocasión en estado homocigoto (nº302, La Granada). Es posible que la presencia de esta translocación tenga efectos deletéreos sobre la fertilidad, pero son necesarios más estudios para poder afirmar esta hipótesis. Por otra parte, el individuo 195 del grupo HTI-31 mostró un valor $\beta:\alpha$ elevado, similar a los presentados por los animales estándar. Este animal presenta la fusión Rb(9.11) en heterocigosis, mientras que el resto de componentes del grupo presentan las fusiones Rb(3.8) o Rb(6.10), de distribución más restringida dentro de la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona. Diversos estudios sugieren que diferente composición de cromosomas metacéntricos pueden dar lugar a diferentes frecuencias de no disyunción meiótica (Cattanach & Moseley, 1973; Cattanach, 1978; Rizzoni & Spirito, 1998). Se ha de

3.4. DISCUSIÓN

tener en cuenta que existen una serie de genes implicados en la espermatogénesis que se encuentran ubicados en algunos de los cromosomas que forman las translocaciones Robertsonianas identificadas en la zona de polimorfismo Robertsoniano de Barcelona: *Dazl* en el cromosoma 17, *HR6B* en el cromosoma 11, *Bmp8b* en el cromosoma 4, *Dhh* en el cromosoma 15, *Hsp70-2* en el cromosoma 12, *Pms2* en el cromosoma 5, y *Mlh1*, *ATM* y *ATR* en el cromosoma 9 (Baker *et al.*, 1995; Baker *et al.*, 1996; Bitgood *et al.*, 1996; Dix *et al.*, 1996; Keegan *et al.*, 1996; Roest *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Zao *et al.*, 1996; Ruggiu, *et al.*, 1997; Cooke *et al.*, 1998). Mutaciones espontáneas de estos genes se pueden acumular en los cromosomas Robertsonianos y no dispersarse en la población debido a la supresión de la recombinación en las zonas implicadas en la fusión de los cromosomas (Davisson & Akeson, 1993; Dumas & Britton-Davidian, 2002). Así, también se debe tener presente que las translocaciones Robertsonianas podrían favorecer la acumulación de mutaciones deletéreas en estos genes, afectando la fertilidad de los individuos. Por otra parte, estudios de la sinapsis en heterocigotos simples muestran que al menos en una cuarta parte de los espermatocitos se da una asociación entre la configuración trivalente de la translocación y el bivalente XY (Mahadevaiah *et al.*, 1990), afectando negativamente en la supervivencia del espermatocito (Forejt, 1974, 1979; Forejt & Gregorová, 1977). Cabe esperar que a mayor número de configuraciones trivalentes en el espermatocito haya mayor probabilidad de una asociación con el bivalente XY, pudiendo ser ésta otra de las causas de la reducción de fertilidad encontrada en los HTIII. De todas formas se necesitan estudios exhaustivos de la meiosis en los heterocigotos múltiples de la zona de polimorfismo Robertsoniano Barcelona para poder confirmar esta hipótesis.

El conjunto de los resultados aquí expuestos sugiere que la presencia de fusiones Robertsonianas en heterocigosis en la zona polimórfica Barcelona tiene efectos sobre la fertilidad aumentando la GCD, aunque no se han encontrado animales estériles. Aún así, no se ha realizado ningún estudio, en los animales de esta zona, del porcentaje de espermatozoides aptos para la fecundación, ni de las posibles pérdidas de embriones en los apareamientos de animales con fusiones. Algunas investigaciones muestran que no hay evidencia alguna de selección en contra de los espermatozoides aneuploides durante la

espermiogénesis y la fecundación (Cattanach & Moseley, 1973; Epstein *et al.*, 1979; Marchetti *et al.*, 1999), produciéndose pérdidas de embriones. Si esto sucediera en los animales con cromosomas Robertsonianos de la zona de polimorfismo de Barcelona, los efectos de estas mutaciones sobre la fertilidad se verían incrementados. Aún así la desventaja en la fertilidad de los heterocigotos por sí sola no es suficiente para eliminar estas mutaciones de las poblaciones, lo que permite su acumulación y su expansión, dando lugar a una gran superficie geográfica ocupada por poblaciones Robertsonianas polimórficas.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Baker, R. J. & W. Bickham (1986). Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 83: 8245-8248.

Baker, S. M., Bronner, C. E., Zhang, L., Plug, A. W., Robatzek, M., Warren, G., Elliot, E. A., Yu, J., Ashley, T., Arnherm, N., Flavell, R. A. & R. M. Liskay (1995). Male-mice defective in the DNA mismatch repair gene *pms2* exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. *Cell*, 82: 309-319.

Baker, S. M., Plug, A. W., Prolla, T. A., Bronner, C. E., Harris, A. C., Yao, X., Christie, D.M., Monell, C., Arnheim, N., Bradley, A., Ashley, T. & R. M. Liskay (1996). Involvement of mouse *mlh1* in DNA mismatch repair and meiotic crossing-over. *Nature Genetics*, 13: 336-342.

Bitgood, M. J., Shen, L. Y. & A. P. McMahon (1996). Sertoli-cell signalling by desert hedgehog regulates the male germline. *Current Biology*, 6: 298-304.

Britton-Davidian, J., Sonjaya, H., Catalan, J. & G. Cattaneo-Berrebi (1990). Robertsonian heterozygosity in wild mice: fertility and transmission rates in Rb(16.17) translocation heterozygotes. *Genetica*, 80: 171-174.

Burgoyne, P. S. & T. G. Baker (1984). Meiotic pairing and gametogenetic failure. *Symposia of the Society of Experimental Biology*, 38: 349-362.

Capanna, E., Gropp, A., Winking, H., Noack, G. & M.-V. Civitelli (1976). Robertsonian metacentrics in the mouse. *Chromosoma (Berl.)*, 58: 341-353.

Castiglia, R. & E. Capanna (2000). 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*, 85: 147-156.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Cattanach, B. (1975). Control of chromosome inactivation. *Annual Review of Genetics*, 9: 1-18.

Cattanach, B. M. (1978). Crossover suppression in mice heterozygous for tobacco mouse metacentrics. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 20: 264-281

Cattanach, B. M. & H. Moseley (1973). Nondisjunction and reduced fertility caused by the tobacco mouse metacentric chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 12: 264-287.

Clermont, Y. & M. Trott (1969). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-Thymidine and radioautography. *Fertility and Sterility*, 20: 805-817.

Cooke, H. J., Hargreave, T. & D. J. Elliott (1998). Understanding the genes involved in spermatogenesis: a progress report. *Fertility and Sterility*, 69: 989-995.

Cruz-Orive, L.-M. (1987). Stereology: historical notes and recent evolution. *Acta Stereologica*, 6 (Sup. II): 43-56.

Cruz-Orive, L.-M. & E. B. Hunziker (1986). Stereology for anisotropic cells: application to growth cartilage. *Journal of Microscopy*, 143: 47-80.

Davisson, M. T. & E. C. Akesson (1993). Recombination suppression by heterozygous Robertsonian chromosomes in the mouse. *Genetics*, 133: 649-667.

Dix, D. J., Allen, J. W., Collins, B. W., Mori, C., Nakamura, N., PoormanAllen, P., Goulding, E. H. & E. M. Eddy (1996). Targeted gene disruption of HSP70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 93: 3264-3268.

Dumas, D. & J. Britton-Davidian (2002). Chromosomal rearrangements and evolution of recombination: comparison of chiasma distribution patterns in standard and Robertsonian populations of the house mouse. *Genetics*, 162: 1355-1366.

Durfort, M. (1977). Algunes tècniques d'obtenció de preparacions d'estructures i de teixits animals 4. Seminaris d'Estudis Universitaris. Barcelona.

Eaker, S., Pyle, A., Cobb, J. & M. A. Handel (2001). Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *Journal of Cell Science*, 114: 2953-2965.

Epstein, C. H. & B. Travis (1979). Preimplantation lethality of monosomy for the mouse chromosome 19. *Nature*, 280: 144-145.

Everett, C. A., & J. B. Searle (1990). Infertility in male house mice heterozygous and homozygous for Robertsonian translocations. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series*, 6: 27.

Everett, C. A., Searle, J. B. & M. N. Wallace (1996). A study of meiotic pairing, nondisjunction and germ cell death in laboratory mice carrying Robertsonian translocations. *Genetical Research, Cambridge*, 67: 239-247.

Floderus, S. (1944). Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. (Suppl.), 53: 1-276.

Forejt, J. (1974). Nonrandom association between a specific autosome and the X chromosome in meiosis of the male mouse: possible consequence of the homologous centromeres separation. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 13: 369-383.

Forejt, J. (1979). Meiotic studies of translocations causing male sterility in the mouse. II. Double heterozygotes for Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 23: 163-170.

Forejt, J. (1982). X-Y involvement in male sterility caused by autosome translocations- A hypothesis. *En Crosignani, P. G. & B. L. Rubin (eds.): Genetic control of gamete production and function*. Pp. 135-151. Academic Press, New York.

Forejt, J. & S. Gregorová (1977). Meiotic studies of translocations causing male sterility in the mouse. I. Autosomal reciprocal translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 19: 159-179.

Garagna, S., Zuccotti, M., Searle, J. B., Redi, C. A. & P. J. Wilkinson (1989). Spermatogenesis in heterozygotes for Robertsonian chromosomal rearrangements from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87: 431-438.

Garagna, S., Zuccotti, M., Thornhill, A., Fernandez-Donoso, R., Berrios, S., Capanna, E. & C. A. Redi (2001). Alteration of nuclear architecture in male germ cells of chromosomally derived subfertile mice. *Journal of Cell Science*, 114: 4429-4434.

Gosálbez, J., López-Fuster, M. J. & M. Durfort (1979). Ein neues Färbungsverfahren für Hodenzellen von Kleinsäugetieren. *Säugetierkundliche Mitteilungen*, 40: 303-305.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Griswold, M. D. (1988). Protein secretion of Sertoli cells. *International Review of Cytology*, 110: 133-156.

Gropp, A. & H. Winking (1981). Robertsonian translocations: cytology, meiosis, segregation pattern and biological consequences of heterozygosity. *En Berry, R. J. (ed.): Biology of the House Mouse*. Pp. 141-181. Academic Press, London.

Gropp, A., Winking, H. & C. A. Redi (1982a). Consequences of Robertsonian heterozygosity: segregational impairment of fertility versus male-limited sterility. *En Crosignani, P. G., Rubin, B. L., & M. Fraccaro (eds.): Genetic control of gamete production and function, Serono clinical colloquia on reproduction, Vol. 3*. Pp 115-134. Academic Press/grune and Stratton, London.

Gropp, A., Winking, H., Redi, C., Capanna, E., Britton-Davidian, J. & G. Noack (1982b). Robertsonian karyotype variation in wild house mice from Rhaeto-Lombardia. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 34: 67-77.

Handel, M. A., Cobb, J. & S. Eaker (1999). What are the spermatocyte's requirements for successful meiotic division? *Journal of Experimental Zoology*, 285: 243-250

Hauffe, H. C. & J. B. Searle (1998). Chromosomal heterozygosity and fertility in house mice (*Mus musculus domesticus*) from northern Italy. *Genetics*, 150: 1143-1154.

Hotta, Y. & A. C. Chandley (1982). Activities of X-linked enzymes in spermatocytes of mice rendered sterile by chromosomal alterations. *Gamete Research*, 6: 65-72.

Huckins, C. (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anatomical Records*, 190: 905-926.

Jégou, B. (1993). Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International Review of Cytology*, 147: 25-96.

Jeyaraj, D. A., Grossman, G. & P. Petrusz (2003). Dynamics of testicular germ cell apoptosis in normal mice and transgenic mice overexpressing rat androgen-binding protein. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1: 48-61.

Keegan, K. S., Holtzman, D. A., Plug, A. W., Christenson, E. R., Brainerd, E. E., Flaggs, G., Bentley, N.J., Taylor, E.M., Meyn, M.S., Moss, S.B., Carr, A.M., Ashley, T. & M. F. Hoekstra (1996). The ATR and ATM protein-kinases associate with different sites along meiotically pairing chromosomes. *Genes and Development*, 10: 2423-2437.

Leblond, C. P. & Y. Clermont (1952). Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfuric acid" technique. *The American Journal of Anatomy*, 90.2: 167-215.

Lifschytz, E. & D. L. Lindsley (1972). The role of X-chromosome inactivation in spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 69: 182-186.

López-Fuster, M. J. (1978) Sobre *Mus musculus*, L., 1758, en el Nordeste Ibérico. Tesina de Licenciatura. Universidad de Barcelona.

Mackay, S. (2000). Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *International Review of Cytology*, 200: 47-99.

Mahadevaiah, S. K., Setterfield, L. A. & U. Mittwoch (1990). Pachytene pairing and sperm counts in mice with single Robertsonian translocations and monobrachial compounds. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 53: 26-31.

Marchetti, F, Lowe, X., Bishop, J. & A. J. Wyrobek (1999). Absence of selection against aneuploid mouse sperm at fertilization. *Biology of reproduction*, 61: 948-954.

McLaren, A. & D. Southee (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology*, 187: 107-113.

Meistrich, M. L. (1982). Quantitative correlation between testicular cell survival, sperm production, and fertility in the mouse after treatment with different cytotoxic agents. *Journal of Andrology*, 3: 58-68.

Miething, A (1992). Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of golden hamster. *Cell Tissue Research*, 267: 583-590.

Miklos, G. L. C. (1974). Sex chromosome pairing and male sterility. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 13: 558-577.

Mori, H, & A. K. Christensen (1980). Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *Journal of Cell Biology*, 84: 340-354.

Nachman, M. W. (1992). Meiotic studies of Robertsonian polymorphisms in the South American marsh rat *Holochilus brasiliensis*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 61: 17-24.

Nagano, T. & F. Suzuki (1976). The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. *Anatomical Records*, 185: 403-418.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

Oakberg, E. F. (1956a). A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *The American Journal of Anatomy*, 99: 391-414.

Oakberg, E. F. (1956b). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*, 99: 507

Odorisio, T., Rodríguez, T. A., Evans, E. P., Clarke, A. R. & P. S. Burgoyne (1998). The meiotic checkpoint monitoring synapsis eliminates spermatocytes via p53-independent apoptosis. *Nature Genetics*, 18: 257-261.

Orth, J., Gunsalus, G. L. & A. A. Lamperti (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122: 787-794.

Print, C. G. & K. L. Loveland (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays*, 22: 423-430.

Redi, C. A. & Capanna, E. (1988). Robertsonian heterozygotes in the house mouse and the fate of their germ cells. *En Daniel, A. (ed.): The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements*. Pp. 315-359. Alan R. Liss, New York.

Redi, C. A., Garagna, S., Hilscher, B. & H. Winking (1985). The effects of some Robertsonian chromosome combinations on the seminiferous epithelium of the mouse. *The Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 85: 1-19.

Redi, C. A., Hilscher, B. & H. Winking (1983). Stage-dependent enzymatic activities in spermatogenesis of mice with the standard karyotype and of chromosomal variants with impaired fertility. *Andrologia* 15: 322.

Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.

Rizzoni, M. & Spirito, F. (1998). Aneuploidy in metaphases II of spermatocytes of wild house mice from a hybrid zone between a Robertsonian population (CD: $2n=22$) and a population with the standard karyotype ($2n=40$). *Genetica*, 101: 225-228.

Roest, H. P., Vanklaveren, J., Dewit, J., Vangurp, C. G., Kolen, M. H. M, Vermey, M., van Roijen, J.H., Hoogerbrugge, J.W., Vreeburg, J.T., Baarends, W.M., Bootsma, D., Grootegoed, J.A. & J. H. Hoeijmakers (1996). Inactivation of the HR6B ubiquitin-conjugating DNA-repair enzyme in mice causes male-sterility associated with chromatin modification. *Cell*, 86: 799-810.

Roosen-Runge, E. C. (1973). Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35: 339-348.

Ruggiu, R., Speed, R., Taggart, M., MacKay, S. J., Kilanowski, F., Saunders, P.T.K., Dorin, J. & H. J. Cooke (1997). The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmatic protein essential for gametogenesis. *Nature*, 389: 73-75

Russell, L. D., Alger, L.E. & L. G. Nequin (1987). Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*, 120: 1615-1632.

Russell, L. D. & Y. Clermont (1977). Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone-treated hypophysectomized rats. *Anatomical Records*, 187: 347-366.

Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha Hikim, A. P. & E. D. Clegg (1990a). *Histological and Histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, USA.

Russell, L. D., Ren, H. P., Sinha Hikim, I., Schultze, W. & A. P. Sinha Hikim (1990b). A comparative study in twelve mammalian species of volume density, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to Sertoli cell. *The American Journal of Anatomy*, 188: 21-30.

Saïd, K., Saad, A., Auffray, J.-C. & J. Britton-Davidian (1993). Fertility estimates in the Tunisian all-acrocentric and Robertsonian populations of the house mouse and their chromosomal hybrids. *Heredity*, 71: 532-538.

Searle, J. B. (1984). Nondisjunction frequencies in Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus* L. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 38: 265-271.

Searle, J. B. (1986). Meiotic studies of Robertsonian heterozygotes from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus* L. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 41: 154-162.

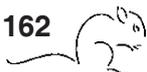
Searle, J. B. (1993). Chromosomal hybrid zones in eutherian mammals. *En Harrison, R. G. (ed.): Hybrid zones and the evolutionary process*. Pp. 305-353. Oxford University Press, Oxford.

Searle, A. G. & C. V. Beechey (1974). Sperm count, egg-fertilization and dominant lethality after X-irradiation of mice. *Mutation Research*, 22:63-72.

Sinha Hikim, A. P., Amador, A. G., Klemcke, H. G., Bertke, A. & L. D. Russell (1989). Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology*, 125: 1829-1843.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Skinner, M. K. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Reviews*, 12: 45-77.
- Sterio, D. C. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *Journal of Microscopy*, 134: 127-136.
- Syed, V. & N. B. Hecht (1997). Up-regulation and down-regulation of genes expressed in cocultures of rat Sertoli cells and germ cells. *Molecular Reproduction and Development*, 47: 380-389.
- Tettenborn, U. & A. Gropp (1970). Meiotic nondisjunction in mice and mouse hybrids. *Cytogenetics*, 9: 272-283.
- Vergouwen, R. P. F. A., Huiskamp, R., Bas, R. J., Roepers-Gajadien, H. L., Davids, J. A. G. & D. G. de Rooij (1993). Postnatal development of testicular cell populations in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 479-485.
- Wallace, B. M. N. & J. B. Searle (1994). Oogenesis in homozygotes and heterozygotes for Robertsonian chromosomal rearrangements from natural populations of the common shrew, *Sorex araneus*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100: 231-237.
- Wallace, B. M. N., Searle, J. B. & C. A. Everett (1992). Male meiosis and gametogenesis in wild house mice (*Mus musculus domesticus*) from a chromosomal hybrid zone: a comparison between "simple" Robertsonian heterozygotes and homozygotes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 61: 211-220.
- Wallace, B. M. N., Searle, J. B. & C. A. Everett (2002). The effect of multiple simple Robertsonian heterozygosity on chromosome pairing and fertility of wild-stock house mice (*Mus musculus domesticus*). *Cytogenetics and Genome Research*, 96: 276-286.
- Wallace, B. M. N., Searle, J. B. & S. Garagna (1991). Oogenesis in common shrews homozygous and heterozygous for Robertsonian rearrangements. *Mémoires Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, 19.1: 23-31.
- White, M. J. D. (1978). *Models of Speciation*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- Winking, H. (1980). Cytogenetic and histological observations in sterile males with Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 27, 213.
- Winking, H., Dulic', B. & G. Bulfield (1988). Robertsonian karyotype variation in the Europe house mouse *Mus musculus*. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 53: 148-161.



Winking, H. & A. Gropp (1976). Meiotic non-disjunction of metacentric heterozygotes in oocytes versus spermatocytes. *En: Crosignani, P. G. & D. R. Mishell (eds.): Ovulation in the Human, Proceedings of the Serono Symposium*, vol. 8. Pp. 47-56. Academic Press, London.

Winking, H., Reuter, C. & Bostelmann (2000). Unequal nondisjunction frequencies of trivalent chromosomes in male mice heterozygous for two Robertsonian translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 91: 303-306.

Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E. E., Bronson, R. T., Meyn, M. S. & D. Baltimore (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth-retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes and Development*, 10: 2411-2422.

Zao, G. Q., deng, K., Labosky, P. A., Liaw, L. & B.L.M. Hogan (1996). The gene encoding bone morphogenetic protein 8b is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes and Development*, 10: 1657-1669.

Zirkin, B. R. & L. L. Ewing (1987). Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *The Anatomical Record*, 219: 157-163.

