

Cromosomas en la espermatocitogénesis del toro (*Bos taurus*)

Prof. Dr. J. Postiglioni-Grimaldi y Bach. Joaquín Rossi

**LABORATORIO DE HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA, INSTITUTO
DE ANATOMIA NORMAL**

(Recibido para su publicación el 20 de setiembre de 1956)

INTRODUCCION

Desde la primera publicación, debida a von Bardeleben (1892), sobre espermatogénesis del toro, varios investigadores se han ocupado de estudiar los cromosomas durante ese proceso en dicha especie animal. Es así como en 1902, Schoenfeld le dedica un extenso estudio; luego le siguen L. Van Hoof (1), quien se refiere especialmente a los estados leptotenos y anfitenos, llegando a contar los cromosomas en placas espermatogoniales; en 1919, K. Masui (2), en sus trabajos sobre espermatogénesis de los mamíferos domésticos, le dedica bastante atención a *Bos taurus* y hace el conteo de sus cromosomas; en 1920, J. E. Wodsdalek (3), estudia las células del ganado doméstico con especial referencia a la espermatogénesis y efectúa el conteo de cromosomas en cientos de figuras espermatogoniales y metafases I. En los años 1927, 1928 y 1931, se publican los trabajos de H. F. Krallinger (4), (5) y (6), cuyos resultados fueron conceptuados como exactos hasta hace poco tiempo y, algunos de los cuales han venido siendo confirmados por los investigadores más recientes. Al respecto, expresa en 1949, R. Matthey (7): "Les observations de Krallinger (1927 - 1931) sur le Taureau nous autorisent a considerer comme non avenues les assertions de Masui (1919), Wodse-

dalek (1920), Bardeleben (1892), Schoenfeld (1902) y van Hoof (1913)".

En 1944, S. Makino (8) hace una revisión de la literatura sobre el tema y considera como exactos los resultados obtenidos en cuanto al número diploide y haploide (60 y 30 respectivamente), por Krallinger; pero, discrepa en lo que se refiere a los cromosomas sexuales. Se sabe que Krallinger describe en la metafase espermatogonial un cromosoma en forma de V y que considera como el cromosoma sexual X, no habiendo encontrado al Y.

Todos los investigadores mencionados utilizaron métodos clásicos de fijación, inclusión en parafina y tinción con anilinas en la preparación de sus materiales de *Bos taurus*. En 1952, Makino y Nishimura proponen se sustituyan aquellos métodos clásicos con el fin de simplificar y mejorar la técnica de estudio de cromosomas en animales y dan a conocer una técnica que dichos autores consideran sencilla, rápida y eficaz, la cual consiste en tratar con agua el material antes de ser fijado; luego fijación con ácido acético a diversas diluciones, tinción con fuchsina y aplastado. Abandona así Makino el método de Minouchi que había empleado en 1944, en sus estudios sobre los cromosomas del toro.

En 1953, Y. Melander y O. Knudsen (10), estudian los cromosomas y su comportamiento en la espermatogénesis del toro, utilizando por primera vez en ésta especie animal, la técnica de aplastados y tinción con la hematoxilina de Gomori que Y. Melander y K. G. Wingstrand habían propuesto para la tinción de cromosomas (11). En 1954, O. Knudsen (12), completa los estudios de Melander y Knudsen con la misma técnica y, haciendo además, inclusiones en parafina cuyas secciones tiñe con la hematoxilina de Gomori, seguida de coloración con fast green, según técnica de dicho autor, con el fin de obtener la coloración del huso. Los resultados obtenidos por Melander y Knudsen, y Knudsen son evidentemente superiores en muchos aspectos a los de los autores anteriores.

Uno de nosotros, sin conocer los trabajos de Melander y Knudsen y de Knudsen, logró una técnica para el estudio de los cromosomas del toro, en base al uso de soluciones hipotónicas, fijación en alcohol - acético y reacción nucleal de Feulgen - Rosenbeck (13), introduciéndose así, por vez primera, el método de pretratamiento con soluciones hipotónicas así como la reacción nucleal de referencia, en el estudio de los cromosomas de aquella especie animal.

En la presente publicación, los autores se proponen dar a conocer algunos de los resultados que han obtenido en el estudio

de los cromosomas del toro durante el proceso de la espermatocitogénesis, utilizando diversas técnicas y, en especial modo, la hematoxilina de Gomori, sola o seguida de fast green, de acuerdo con los autores anteriormente mencionados.

MATERIAL Y METODOS

Gran parte del material utilizado en este trabajo, fué recogido, fijado e incluido en parafina por uno de nosotros (J.P.G.) durante un largo período, aunque con varias interrupciones obligadas; ellos proceden de la playa de faenas del Frigorífico Nacional. Otra parte del material utilizado, pertenece a bovinos del Laboratorio de Biología Animal "Dr. Miguel C. Rubino", material que el mismo autor trató inmediatamente de la castración. Durante este año, los autores han obtenido otro material procedente de la castración de un ternero del Instituto de Anatomía Normal. Para abreviar detalles y ser menos pesado al lector, ofrecemos el siguiente cuadro donde se resume el material empleado y la forma en que fueron tratados:

N.º Material	Fijación con o sin pretatamiento	Inclusión (P) o Aplastado (A)	Coloración
1 (P. M.)	B.	P.	H. E.
	B.	P.	H. F. H.
	B.	P.	H. F. H. - Fast. G.
	B.	P.	H. G. - F. G.
2 (A. M.)	B.	P.	H. E.
	B.	P.	H. F. H.
13 (P. M.)	B.	P.	H. F. H.
14 (P. M.)	3/1	P.	H. E.
	3/1	P.	H. F. H.
15 (P. M.)	B.	P.	H. E.
	B.	P.	H. F. H.
22 (P. M.)	Z. F.	P.	H. F. H.
	La C.	P.	H. E.
	La C.	P.	H. F. H.
	B. A.	P.	H. F. H.
	B. A.	P.	Feulgen-Rossenbeck
	La C.	P.	Feulgen-Rossenbeck
26 (A. M.)	J. P. G.	P.	H. F. H.
	(H. T. 20% 3/1	P.	H. F. H. Orange G.
	Pret. (H. T. 10% 3/1	A.	Feulgen-R.
	(N. T. 3/1	A.	Feulgen-R.
		A.	Feulgen-R.
27 (P. M.)	3/1	A.	Feulgen-R.
	Pret. H. T. 20% Ch.	P.	H. f. H.
	Ch.	P.	Feulgen-R.
29 (P. M.)	3/1	P.	H. f. H.
		P.	H. f. H. - E.

N.º Material	Fijación con o sin pretatamiento	inclusión (P) o Aplastado (A)	Coloración	
30 (A. M.)	Pret. H. T. 20% 3/1	A.	Feulgen-R.	
		A.	H. ac. f.	
		3/1	A.	H. G.
		3/1	P.	H. G.
		3/1	P.	H. G. - F. g.
		3/1	A.	Feulgen-R.
		3/1 prop.	A.	H. G.
		3/1	A.	Feulgen-R.
		Sol. fis. 50% 3/1	A.	H. G.
		Sol. fis. 50% 3/1	A.	Feulgen-R.
35 (A. M.)	Pret. } H. T. 20% 3/1 H. T. 20% 3/1 H. T. 20% 3/1 H. T. 20% 3/1 N. T. 3/1	P.	H. f. H.	
		A.	H. G.	
		P.	H. f. H.	
		A.	Feulgen-R.	
		P.	H. G. - F. g.	
		A.	Feulgen-R.	

ABREVIATURAS: (P. M.) material recogido entre 30 y 45 minutos después del sacrificio del animal. (A. M.) Material de castración. Fijación: B. (Bouin); 3/1 (Alcohol-acético 3/1); 3/1 prop. (Alcohol-ácido propiónico 3/1); Z. F. (Zenker-formol); La C. (La Cour); Ch. (Champy); B. A. (Bouin-Allen); J. P. G. (fijador ensayado por uno de los A. A. compuesto por alcohol absoluto: 30; ácido pícrico a saturación y, en el momento de usarlo, se agregó 10 cc. de ácido acético glacial); Pret. (Pretratamiento); H. T. (solución Tyrode hipotónica); N. T. (solución Tyrode normal); Sol. fis. (solución fisiológica de NaCl; COLORACION: H. E. (Hematoxilina-eosina); H. F. H. (Hematoxilina férrica de Heidenhain); H. G. (Hematoxilina de Gomori) F. g. (Fast-green); H. acet. f. (Hematoxilina aceto-férrica según Sáez).

Los materiales "post mortem" fueron recogidos entre 30 y 45 minutos después del sacrificio del animal; los "ante mortem" se recogieron sea inmediatamente después del atontamiento del animal con el golpe de marrón (como se acostumbra en los Frigoríficos), sea inmediatamente después de castración del animal.

Las preparaciones con hematoxilina de Gomori y la mayor parte de las teñidas con dicha hematoxilina seguida de fast green, fueron realizadas por uno de nosotros (J.R.); la casi totalidad de las restantes fueron efectuadas por el otro autor.

Estando muy poco divulgadas, —por su reciente aparición—, las técnicas de hematoxilina de Gomori para cromosomas, así como la técnica que usa ésta hematoxilina seguida de la coloración con fast green, resumimos a continuación el proceder de O. Knudsen:

Xilol	2 baños	5 m. c u.
Alcohol absoluto	2 "	5 m. c p.
Alcohol a 96 %	2 "	5 m. c u.
Alcohol a 70 %	1 "	5 m.
Agua destilada	1 "	5 m.
Acido clorhídrico N ^o 1 a 60 grados C.	1 "	8 m.
Agua destilada	1 "	1 m.
Hematoxilina de Gomori a 60 grads' C.	1 "	1 m.
Acido acético a 45 %	1 "	60 a 120 m.
Agua		5 m.
Alcohol a 80 %	1 "	10 m.
Alcohol a 80 % saturado con carbonato de sodio	1 "	30 m.
Alcohol a 80 %	1 "	10 m.
Mezcla de Fast-green en alcohol a 90 %	1 "	30 m.
Alcohol abs.: 9 Alcohol a 80 % saturado con carbonato de sodio: 1.-	1 "	1½ m.
Alcohol a 80 %	1 "	15 m.

Montar en Euparal (los autores emplearon bálsamo de Canadá)

El proceso de espermatogénesis en los Amniotas se lleva a cabo, como se sabe, en el testículo, dentro de los túbulos seminíferos, a partir de células en apariencia indiferentes, poseyendo una serie de caracteres estructurales generales de célula somática y, como tal se las considera. Es casi unánime la opinión de que, al comienzo del proceso espermatogénico, existen sucesivas mitosis espermatogoniales, si bien se desconoce el número exacto de esas divisiones celulares; es el período de multiplicación o proliferación celular. Entre esas células somáticas o espermatogonias, se han distinguido, repetidas veces, dos tipos de acuerdo a ciertos detalles de estructura, o a diferente tinción por ciertos colorantes, etc. En general, se habla de espermatogonias primarias y espermatogonias secundarias, sin que se conozca bien la significación de ellas; aunque se considera que éstas últimas se derivan de las primeras y, de ahí, esas denominaciones. Muy recientemente,

Leblond y Clermont (14), en sus estudios sobre la espermatogénesis de la rata, con nuevas técnicas, han llegado a la conclusión de que existen dos tipos de espermatogonias que distinguen con las denominaciones de "A" y "B" y, cuyos caracteres estructurales serían, según expresan dichos autores en el glosario de su trabajo, los siguientes: Tipo A, con núcleo ovoide, pálido y delgada membrana nuclear y finos gránulos de cromatina; Tipo B, con núcleo esférico, oscuro, gruesos gránulos de cromatina adosados a la membrana nuclear.

Por mitosis de la espermatogonia B se originarían, pues, los espermatocitos primarios (o de primer orden o espermatocitos I); los espermatocitos I, comienzan a crecer y lo hacen progresivamente hasta constituirse en la célula de mayor volumen del epitelio seminífero. Al mismo tiempo que van creciendo, se observan cambios nucleares que corresponden a una larga profase, con la cual se inicia el complicado proceso de la meiosis. Luego el espermatocito I entra en metafase, anafase y telofase, dando origen a dos espermatocitos II (o secundarios o de segundo orden). Estos últimos experimentan, a su vez, una división (segunda división meiótica o división II) dando origen, cada uno de ellos, a dos espermatidas, las cuales no se dividen más; pero, en cambio, sufren complicadas transformaciones que dan lugar a la formación de los espermatozoides (un espermatozoide por cada espermatida).

La complejidad del proceso espermatogénético, la extraordinaria importancia de su conocimiento, especialmente en cuanto a los hechos de mayor significación, ha llevado a dividir el proceso en la forma que hemos resumido a continuación:

ESPERMATOGENESIS

Etapas	Períodos	Tipos celulares	Divisiones Celulares	
Espermatocito-génesis	1. Multiplicación	Espermatogonias	Mitosis	} Meiosis
	2. Crecimiento	Espermatocito I	División I	
	3. Maduración	Espermatocito II	División II	
Espermiogenesis	4. Transformación de las espermatidas	Espermatidas Espermatozoides		

En la presente publicación nos ocuparemos solamente de la espermatocitogenesis en el toro del punto de vista cromosómico y de acuerdo a los resultados que hemos obtenido con las técnicas utilizadas. Por otra parte, es sabido que, con los métodos actuales no ha sido posible aún, poner en evidencia, en forma irrefutable, a los cromosomas durante la espermiogenesis.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Krallinger, Makino y, sobre todo, por Melander y Knudsen y por Knudsen, —como se ha mencionado—, así como los nuestros, habremos de ver que el proceso de espermatocitogénesis en el toro presenta ciertas particularidades que no parecen, algunas de ellas, seguir la marcha señalada, en general, para los Amniotas.

RESULTADOS

Espermatogonias. — En el epitelio seminífero del toro, O. Knudsen (12), describe dos tipos de espermatogonias que, de acuerdo a las denominaciones de Leblond y Clermont (14), aquél autor las designa con las letras A y B. La espermatogonia A correspondería a la ya conocida hasta entonces y mencionada por todos los autores anteriores a Knudsen; por el contrario, la espermatogonia B es descrita por primera vez, por el mencionado autor, siendo muy diferente a la espermatogonia A en cuanto a su morfología y la de sus cromosomas durante el proceso mitótico.

Uno de nosotros había observado, en el epitelio seminífero del toro, y con la técnica del pretratamiento con soluciones hipotónicas, figuras mitóticas, cuyos cromosomas eran, evidentemente, diferentes de los cromosomas goniales; sin embargo, no había llegado a interpretarlos como pertenecientes a otro tipo de espermatogonia. En esos momentos, la mayor preocupación era lograr una técnica mejorada para el estudio de los cromosomas en el toro. Luego, al conocer el trabajo citado de Knudsen, pudimos aclarar aquél problema y considerar a aquellas figuras como pertenecientes a espermatogonias B, que Knudsen terminaba de describir por vez primera en el toro.

Espermatogonia A. — Situadas casi siempre muy cerca o en contacto con la membrana basal del túbulo, la forma de la espermatogonia A durante la interfase, profase y metafase, es esférica con un diámetro de 12 micrones. El contacto más o menos estrecho con elementos vecinos (células de Sertoli u otras espermatogonias y, a veces, espermatocitos I) puede hacer variar la forma mencionada, lo que por otra parte, es un hecho bastante generalizado.

En plena metafase, la espermatogonia A suele alargarse y, generalmente, lo hace paralelamente a la membrana basal, sobre todo cuando se halla en contacto con ésta. En la telofase, la longitud de la célula llega a ser el doble de su ancho.

Knudsen ha estudiado también el huso acromático y encuentra que el gran eje de éste, forma generalmente un ángulo agudo con la membrana basal; tiene muy poca afinidad por los colo-

rantes empleados por dicho autor y el diámetro del huso, al nivel de la placa metafásica, es de unos 5 micrones, mientras el diámetro de la placa misma es de unos 9 micrones: la placa desborda pues al huso. Es muy difícil observar centriolos, si es que existen realmente.

En cuanto a la morfología de los cromosomas de la espermatogonia, ha sido estudiada con detalle primeramente por Krallinger (6); este autor, describió la forma y dió las dimensiones de cada uno de los 60 cromosomas que hallara en la metafase gonial; así, encuentra que todos los cromosomas tienen forma de pequeños bastoncitos, algunos tan pequeños que casi son redondos, con excepción de uno que Krallinger describe en forma de V y que considera como el cromosoma X. Este cromosoma en forma de V no ha sido encontrado por ninguno de los autores posteriores a Krallinger; Makino (8), fué el primero en discrepar con esa interpretación de Krallinger y, estudiando minuciosamente la serie fotográfica de la metafase presentada por éste último autor, llegó a la conclusión de que la V estaba formada por un cromosoma (una rama) y por la continuación de otro (la otra rama), atribuyendo el error de interpretación a la técnica empleada por Krallinger. Es así como Makino estableció que todos los cromosomas, sin excepción, del complemento diploide son de naturaleza ortotelmítico, según la nomenclatura de Oguma. Este hecho fué confirmado por Melander y Knudsen (10) y Knudsen (12), quienes los califican como telecéntricos, de acuerdo a la terminología más reciente. Nosotros hemos observado también esa morfología de todos los cromosomas del toro en placas metafásicas de espermatogonias A donde los elementos estaban separados unos de otros como para hacer evidente dicha naturaleza; de acuerdo a la terminología, más reciente aún, decimos que son acrocéntricos, pues, el término telocéntrico se ha reservado para aquellos cromosomas que "por fractura transversal del centromero han perdido un brazo quedando aquél organelo en posición estrictamente terminal" (15). Aun que hasta ahora no se ha descrito con certeza cromosomas sexuales en la mitosis espermatogonial del toro, uno de nosotros (13, foto 3) señaló la probable existencia del complejo X - Y en la metafase de espermatogonia A; pero, evidentemente, esto requiere más estudios.

En la anafase de la espermatogonia A, los cromosomas se distribuyen rápida y sincrónicamente a sus respectivos polos. En la telofase es dable observar, bastante a menudo, restos de las fibras del huso entre las futuras células hijas.

Espermatogonia B. — La existencia de la espermatogonia B

y su descripción detallada en el toro, se debe, —como ya hemos mencionado—, a O. Knudsen (12). Nosotros hemos podido confirmar la descripción de Knudsen, sea con la técnica empleada por dicho autor, sea con otras mencionadas en este trabajo. Con la técnica del pretratamiento con soluciones hipotónicas y reacción nucleal de Feulgen - Rossenbeck, uno de nosotros ha puesto también en evidencia a la espermatogonia B en las diversas fases de la mitosis, como se dará a conocer próximamente.

Cuando se inicia la profase de la espermatogonia B, ésta comienza a crecer y lo hace progresivamente, alcanzando dimensiones dobles en plena metafase; es decir, unos 23 micrones, según O. Knudsen. La forma de la espermatogonia B es, generalmente, esférica o casi esférica durante todo el ciclo de la mitosis. Las dimensiones que alcanza la espermatogonia B la hacen la célula de mayor tamaño del epitelio seminífero del toro. Este hecho no es el generalmente observado en los demás Amniotas, donde la célula que alcanza a tener mayores dimensiones es el espermatocito I, al final de su crecimiento, lo que ha servido para designar el período de la espermatocitogenesis correspondiente, con el término *crecimiento*.

Los cromosomas de la espermatogonia B se distinguen perfectamente de los cromosomas de la espermatogonia A durante toda la mitosis, sea por su morfología, sea por cierto comportamiento, especialmente, en la anafase.

En las profase, los cromosomas de la espermatogonia B son en forma de largos filamentos como en la espermatogonia A; pero, en la extremidad distal de cada uno de ellos existe como una especie de abultamiento o botón que se tiñe intensamente, que Knudsen interpreta como un signo de comienzo de espiralización. A medida que avanza la profase, los cromosomas se hacen menos largos, el botón distal aumenta algo de tamaño y ya, al final de la profase, los cromosomas de la espermatogonia B, tienen el aspecto de coma.

En la metafase, los cromosomas de la espermatogonia B se van acortando aún más, acercándose a la forma esférica con lo que adquieren el máximo de contracción y la mayor intensidad tintorial. La placa ecuatorial en plena metafase, es de relativo poco espesor (1 a 2 micrones), mientras el diámetro es mayor que en la espermatogonia A (alrededor de 14 micrones, según Knudsen). El huso es más fusiforme que el de la espermatogonia A y sus fibras más arqueadas. Mientras es difícil percibir centrilos en las extremidades del huso de la espermatogonia A, esas formaciones son a menudo bien visibles en la B.

En la anafase, los cromosomas de la espermatogonia B mantienen su forma esférica o casi esférica y, hecho notable, la distribución de ellos a cada polo se hace en forma asincrónica, lo que da a las figuras anafásicas de la espermatogonia B, un aspecto especial característico, con los cromosomas más o menos esparcidos sobre las fibras del huso. Este último desaparece prontamente, no siendo visible ya al final de la anafase.

Durante la telofase, los cromosomas se mantienen contraídos, presentando la misma forma casi esférica que en los estados anteriores.

Al final de la telofase, se forman dos espermatocitos I.

ESPERMATOCITO I

INTERFASE. — En la interfase el espermatocito I posee un núcleo espérico el cual contiene cromosomas casi esféricos, provenientes de la telofase de la espermatogonia B. El diámetro celular, según Knudsen, es de unos 14 micrones. Antes de pasar al estado siguiente, comienza a desaparecer la contracción de los cromosomas y, como lo ha señalado Knudsen, se puede observar en ellos cortas y anchas espirales.

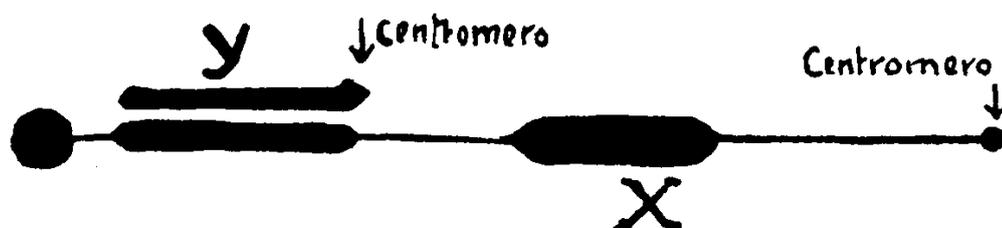
PROFASE I. Estadio leptoténico. — La decontracción iniciada en la interfase se continúa y bien pronto los cromosomas parecen como largos filamentos, con el extremo distal abultado y fuertemente teñido, pareciéndose en esto, a los cromosomas de la profase temprana de la espermatogonia B. Los extremos proximales de los cromosomas tienden a convergir hacia una zona determinada de la carioteca, donde se encuentra el cromocentro, mientras los extremos distales se reparten en el resto del núcleo, con lo que se va constituyendo el "bouquet". A lo largo de cada cromosoma se observan espesamientos dispuestos como las cuentas de un rosario, los que se conocen generalmente con la denominación de cromómeros, aunque su verdadera significación, — como se sabe—, es aún discutida.

Estadio cigoténico. — La disposición en "bouquet" de los cromosomas se hace más aparente y la iniciación del apareamiento entre cromosomas homólogos, puede observarse muy bien en ciertas figuras. Al final de este estadio el apareamiento se ha completado, constituyéndose así los bivalentes.

Estadio paquiténico. — Los bivalentes se acortan algo y, a su vez, se hacen más espesos. El "bouquet" es ahora mejor definido y los cromosomas ocupan solamente una mitad del núcleo, quedando la restante con un aspecto claro, que contrasta fuertemente con la intensidad de la coloración de los elementos del "bouquet". Los extremos distales de los cromosomas permanecen

abultados y fuertemente teñidos, dando a éste estadio un aspecto característico.

Melander y Knudsen (10) describen, por primera vez, en el paquiténico al complejo X - Y, cuya morfología resumimos en el esquema siguiente inspirado en el de los autores citados:



Esquema del X-Y en el paquiténico (s/Melander y Knudsen)

Estadio diploténico. — Se inicia la separación de los cromosomas homólogos; sin embargo, la presencia de quiasmas, limita dicha separación y los cromosomas de cada bivalente quedan unidos al nivel del o de los quiasmas. Nosotros hemos observado de 1 a 3 quiasmas, según el bivalente. El diploténico ha de ser de muy corta duración, si se tiene en cuenta lo difícil que resulta encontrar figuras en este estadio. En algunas de las figuras que hemos logrado en este estadio, hemos tenido oportunidad de observar al bivalente X - Y, tal cual lo muestran Melander y Knudsen en el trabajo mencionado. Al final del diploténico, los bivalentes presentan aspectos variables, de acuerdo con el número de quiasmas y la situación de éstos, es así como hemos observado bivalentes en forma de cruz, de la letra alfa, de cadena con dos eslabones, de la cifra ocho, etc.

Diacinesis. — Los centrómeros de cada bivalente se separan y los bivalentes presentan dos brazos, cuya longitud se halla limitada por la situación del quiasma más proximal. Melander y Knudsen (10), muestran al bivalente X - Y con una forma parecida a un signo de admiración (!) en el cual el punto representa al heterocromosoma Y apuntando hacia la base del "bouquet". Al final de la diacinesis desaparece la membrana nuclear y se hace visible el huso.

PROMETAFASE. — Después de la diacinesis los centrómeros de cada bivalente se encuentran como atraídos fuertemente hacia los respectivos polos del huso, produciéndose como un estiramiento de los bivalentes, dándole a éstos un aspecto particular. La presencia de quiasmas limita, más o menos, el alargamiento: es el estado de "Premetaphase strecht" que Knudsen asimila al des-

cripto por Hughes - Schrader en Mantids y Phasmids, aunque es más pronunciado en el toro. Hacia el final de este estado, al irse acortando los bivalentes, éstos presentan un aspecto fusiforme.

No es raro encontrar en la prometafase, algún bivalente en forma de V con dificultades en la co - orientación, debido a que el quiasma se ha producido en la vecindad del centromero; entonces, la fuerza de retención ejercida por el quiasma, se opone a la repulsión y separación del centromero de cada elemento del bivalente. La situación de tal bivalente es fuera de la placa prometafásica; algunas veces, Knudsen, lo ha encontrado en plena metafase. Piensa este autor, que es posible que alguno de éstos bivalentes no se divida durante la primera división meiótica y que sea incorporado en esa forma (indiviso) en uno de los núcleos hijos. Esta presunción se encuentra sostenida por el hecho de que cromosoma en forma de V formado por dos cromátidas para cada rama de la V, no es raro encontrarlo fuera del "bouquet", durante la segunda división meiótica, en la profase.

METAFASE I. — La contracción que los bivalentes han iniciado en el estadio anterior, se va acentuando hasta que en plena metafase son casi esféricos. Krallinger (6) contó en la metafase I, 30 bivalentes; Makino (8), confirmó ese número haploide y, además, describió por primera vez en el toro, al bivalente X - Y. Ni Melander y Knudsen (10), ni Knudsen (12), parecen haber contado los cromosomas en la metafase I, así como tampoco mencionan al complejo X - Y en esa fase. Las únicas fotomicrografías publicadas hasta ahora, de la metafase I en el toro, se encuentran en los trabajos de Melander y Knudsen (10) y de Postiglioni Grimaldi (13), siendo superior la del último autor, en cuanto a la separación entre los bivalentes, los que pueden ser contados sin dificultad; además, en la figura 8 de la publicación del último autor, se muestran perfectamente los bivalentes, entre los cuales se puede apreciar la presencia del complejo sexual X - Y, semejante al dibujo que presenta Makino (8). Esta última figura sería, pues, la primera que aparece fotografiada en la literatura.

Los autores del presente trabajo, presentan también fotomicrografías de espermátocitos en metafase I, que consideran superiores a las de Melander y Knudsen y la de Knudsen.

ANAFASE I. — Knudsen señala que ocasionalmente los cromosomas sexuales se separan antes que los otros: los autosomas se distribuyen rápida y simultáneamente a sus respectivos polos. El mismo autor considera que es raro poder fijar una célula en ese estado dada la extrema rapidez de la distribución cromosómica; al final de la anafase, la velocidad de distribución parece decrecer. Lle-

gado a los polos, los cromosomas permanecen aún distribuidos en una placa. Cada cromosoma está constituido por dos cromátidas unidas en un extremo por el centromero, el cual apunta hacia el polo correspondiente; y por dos ramas (las cromátidas) en dirección divergente.

Nosotros hemos encontrado figuras de anafase I donde es fácil observar a un cromosoma adelantarse a los otros en su recorrido hacia uno de los polos; en otras figuras de anafase, hemos visto dos cromosomas adelantados, uno hacia cada polo, etc., pero no hemos aún podido descifrar si en realidad se trata de heterocromosomas o simplemente de autosomas. Es sabido, que el fenómeno de la precedencia del cromosomas ha sido considerado como un argumento en favor de que se trata del heterocromosoma; pero, consideramos, con otros autores, que ello no es suficiente, por lo cual, por ahora nos mantenemos en situación expectante hasta mientras hayamos hecho un mejor estudio de tales cromosomas, lo que ya hemos iniciado.

TELOFASE I. — Llegados a los polos, los cromosomas inician una nueva contracción; el huso se mantiene hasta los últimos momentos de esta fase. Luego comienzan los fenómenos de reconstrucción de la carioteca, y se constituyen las dos células hijas; es decir, los espermatocitos II.

INTERCINESIS. — Cada cromosomas está constituido por dos cromátidas unidas por un centromero y, como las cromátidas se encuentran muy contraídas, los cromosomas tienen forma semejante a reloj de arena (hour-glass shape, según Knudsen). Inmediatamente antes de entrar en la profase II se inicia la decontracción de los cromosomas.

PROFASE II. — Los cromosomas se encuentran distribuidos por todo el núcleo, mientras en el espermatocito I, —como mencionamos—, ocupan solamente la mitad de éste. El núcleo aparece casi completamente ocupado por los cromosomas bien teñidos, lo que le da un aspecto oscuro. Knudsen ha señalado la presencia, en algunos casos, de un bivalente en forma de V situado por fuera del conjunto cromosómico anteriormente citado y que correspondería al bivalente con dificultades de co-orientación que se ha mencionado al tratar la prometafase. De ser así, este hecho tiene importancia por que implicaría una variación en el número de cromosomas en la segunda división meiótica, y lógicamente, el supuesto bivalente supernumerario pasaría a una de las espermátidas, si es que aún no ha podido dividirse o a dos de la espermátidas si es que los cromosomas de tal bivalente han podido separarse completamente. Todo esto requiere ser estudiado

y, seguramente lo merece, dada las consecuencias a que daría lugar ese fenómeno.

En la profase II, cada cromosoma presenta, en cada extremo, un abultamiento que se tiñe intensamente, lo cual sirve también para distinguir a tales elementos en esa fase de la segunda división meiótica.

METAFASE II. — Los cromosomas del espermatocito II en metafase muestran su doble estructura, estando constituídos cada uno por dos cromátidas unidas por su centromero. Cada cromátida presenta forma semejante a un bastoncito, muy parecida a la forma de los cromosomas de la espermatogonia A. Makino (8) contó 30 cromosomas lo que puede apreciarse, lo mismo que la forma de los mismos, en su dibujo representado en la fig. 12 de dicha publicación. La primera fotomicrografía publicada del espermatocito II en metafase se debe a Melander y Knudsen (10, fig. 20); no hemos encontrado otras en la literatura. Nosotros hemos podido observar varias figuras de espermatocito II en metafase, alguna de las cuales reproducimos en el lugar que reservamos a las fotomicrografías, más adelante. Como sucede en general, en las figuras de metafase, los cromosomas más pequeños tienen tendencia a situarse hacia el interior de la placa. El huso, según Knudsen, forma un doble cono, más estrecho que en cualquier otro estado de la espermatocitogénesis, teniendo aproximadamente unos 15 micrones de largo y, al nivel de la placa, unos 6 micrones de diámetro. Los centriolos son visible. La división de las cromátidas y el respectivo centromero se hace simultáneamente para todos los cromosomas, después de lo cual se inicia la separación y distribución a cada polo de las cromátidas resultantes.

ANAFASE II. — La distribución de las cromátidas se hace sincrónicamente a sus respectivos polos, después de lo cual deben considerarse como otros tantos cromosomas de las futuras células hijas.

TELOFASE II. — No se ven ya más los cromosomas individualmente, aunque se hacen más largos y delgados. El huso se mantiene hasta la formación de la carioteca de las células hijas. De cada espermatocito II se originan, entonces, dos espermátidas terminándose la etapa de la espermatocitogénesis. En adelante, no es posible poner en evidencia los cromosomas.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los autores describen el proceso de espermatocitogénesis en el toro, (*Bos taurus*) especialmente desde el punto de vista cro-

mosómico y en base a los resultados obtenidos utilizando diversas técnicas. El material utilizado así como las técnicas empleadas son resumidas en un cuadro.

Se hace una revisión de las técnicas empleadas anteriormente, algunas de las cuales son usadas por los A. A. para éste trabajo.

Se mencionan resultados obtenidos por autores recientes.

Algunos de los resultados obtenidos por los A. A. se representan en las fotomicrografías.

SUMMARY:

The author describes spermatogenesis in the bull (*Bos taurus*), especially from the point of view of the chromosomes, as seen by the use of various technics. The material used, and the technics employed are summed up in a table.

The technics previously employed are reviewed, some of them having been used by the authors in this research.

Mention is made of the results obtained by recent authors.

Some of the results obtained by the authors are shown in microphotographs.

RESUME ET CONCLUSIONS:

Les auteurs décrivent le procès de spermatogenese dans le taureau (*Bos taurus*) spécialement du point de vue des chromosomes et en prenant comme base les resultats obtenus en utilisant des diverses techniques. Le materiel utilisé de même que les techniques employés sont resumés dans un tableau.

On fait une revision des techniques employés antérieurement dont quelques unes sont utilisés par les A. A. pour ce travail.

On mentionne des resultats obtenus par les A. A. sont représentés dans des photomicrographies.

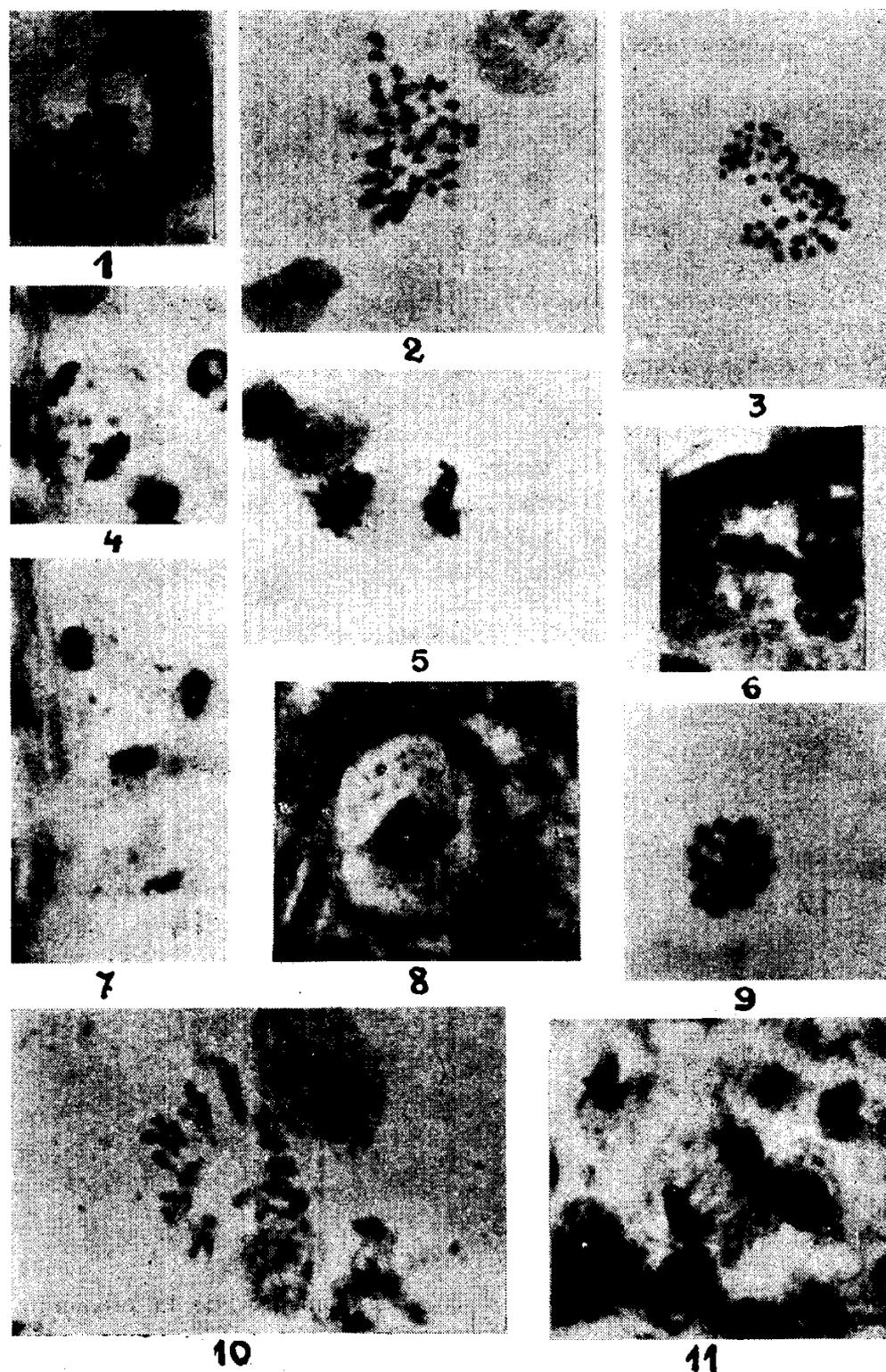
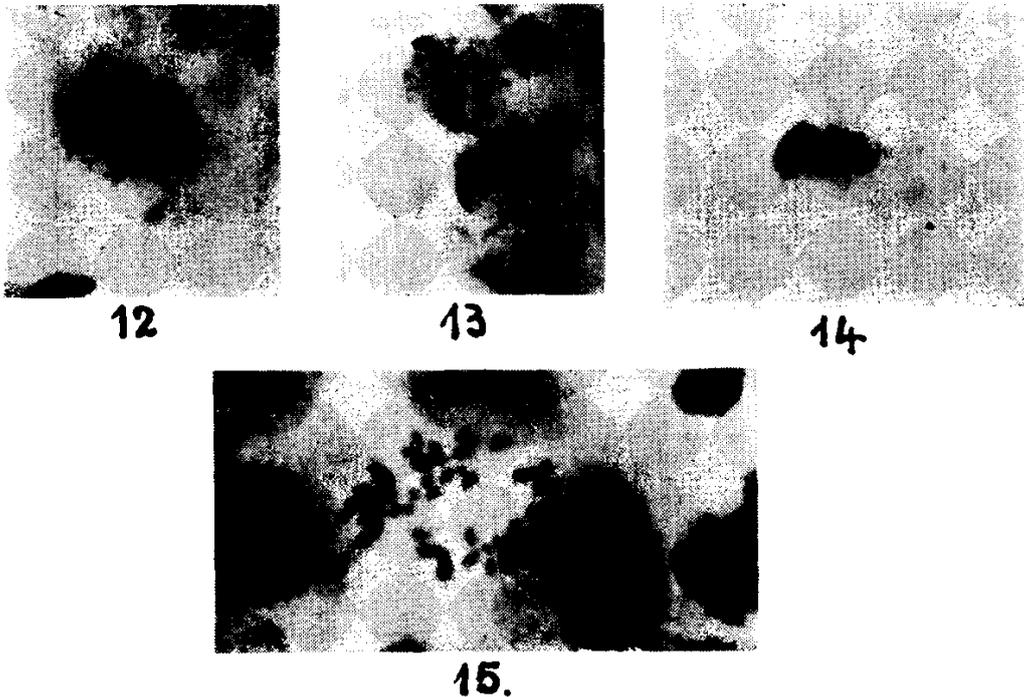


Fig. 1 — Metafase espermatogoniel A, en vista polar. M. 20. Zenker-formol. Incl. paraf.-Hem. férrica.

- Fig. 2 — Metafase espermatogonial A. M. 30. Alcoh.-acét. — Hem-Gomori, Aplast.
- Fig. 3 — Metafase espermatogonial B. M. 30. Alcoh.-acét. — Hem-Gomori, Aplast.
- Fig. 4 — Anafase final de espermatogonia A. M. 1. Bouin. Incl. paraf.-Hem. férrica de Heiden.
- Fig. 5 — Anafase final. Los cromosomas permanecen distribuidos en una placa en cada polo. M. 35. Sol, fis. 50%. Alcoh.-acét. - Hem. Gomori. Aplast.
- Fig. 6 — Metafase espermatogonia B y huso (vista lateral). M. 35. Alcohol-acét. - Hem. Gomori - Fast green. Incl. paraf.
- Fig. 7 — Dos espermatogonias A en telofase, y huso. M. 1. Bouin. Incl. paraf. Hem. Gomori - Fast green.
- Fig. 8 — Metafase de espermatocito I. M. 35. alcoh. acét. - Hem. Gomori Incl. paraf.
- Fig. 9 — Metafase espermatocito I. M. 35. alcoh. acét.-Hem. Gomori. Aplast.
- Fig. 10 — Diacinesis. M. 31. alcoh. acét. - Hem. Gomori. Aplast.
- Fig. 11 — Anafase espermatocito I, y huso. alcoh. acét. - Hem. Gomori - Fast. green. Incl. paraf.



- Fig. 12, 13 y 14 — Espermatocito I en tres momentos de la prometafase (vista lateral). alcoh. acét. - Hem. Gomori. - Aplast.
- Fig. 15 — Espermatocito II en metafase. Sol. fis. - alcoh. acét. - Hem. Gomori - Aplast.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- (1) Van Hoof, L. — La spermatogenese dans les mammiferes. II. Les spermatocytes leptotenes et amphitenes dans le Taureau. *La Cellule*, Vol. 30,7-25. 1913.
- (2) Masui, K. — The spermatogenesis of the domestic mammals. II. The spermatogenesis of cattle (*Bos taurus*). *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*. Vol. 3,357-403. 1919.
- (3) Wodsedalek, J. E. — Studies on the cells of cattle with special reference to spermatogenesis, etc. *Biol. Bull.* Vol. 30,290-316. 1920.
- (4) Krallinger, H. F. — Uber die Chromosomenzahl beim Rinde sowie allgemeine Bemerkungen ueber die Chromosomenforschung in der Säugetierklasse. *Verh. Anat. Gessell.* Vol. 36,209-214. 1927.
- (5) Krallinger, H. F. — Gibt es einen Spermatozoendimorphismus beim Hausrind? Zugleich eine Chromosomenstudie und ein Beitrag zur Kritik der Chromosomenlehre. *Arb. dtsh. Ges. Zchtgskde.* Vol. 40,1-43. 1928.
- (6) Krallinger, H. F. — Cytologische an einigen Haussauegetieren. *Arch. Tierernahr. Tierzucht.* Vol. 5,127-187. 1931.
- (7) Matthey, R. — Les chromosomes des vertébrés. F. Rouge. Lausanne. 1949.
- (8) Makino, S. — Chromosome Studies in Domestic Mammals. IV. Karyotypes of Domestic Cattle, etc. *Cytologia.* Vol. 13,247-264. 1944.
- (9) Makino, S., and Nishimura, I. — Water - Pretreatment Squash Technic. *S. T.* Vol. 27,1-7. 1952.
- (10) Melander, Y., and Knudsen, O. — The spermatogenesis of the bull from a karyological point of view. *Hereditas*, Vol. 39,505-517. 1953.
- (11) Melander, Y. and Wingstrand, K. G. — Gomori's hematoxinilin as a chromosome stain. *S. T.* Vol. 28,217-23. 1953.
- (12) Knudsen, O. — Cytomorphological investigations into the spermiocytogenesis of bulls with normal fertility, etc. *Path. et Micr. Scad. Suppl. CI.* 79 pags. 1954.
- (13) Postiglioni - Grimaldi J. — Chromosomes in *Bos taurus* as revealed by prefixation treatment with hypotonis solutions. *Stain Tech.* Vol. 31, Nº 4, 173-78. 1956.
- (14) Leblond, C. P. and Clermont, Y. — Definition of the stage of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Vol. 55, p. 548. 1952.

- (15) De Robertis, E. D. P., Nowinski, W. W. y Sáez, F. A. —
Citología General 3ra. ed. "El Ateneo". B. Aires. 1955.

AGRADECIMIENTOS

Los autores se complacen en agradecer a las personas que se mencionan a continuación, por la atención que le han prestado para la obtención del material utilizado en este trabajo: Sr. Administrador del Frigorífico Nacional, Dn. José P. Malagrabá y demás autoridades de ese establecimiento frigorífico; a los Sres. Oria y Maure por su intervención en la obtención del material en playa de faena de dicho Frigorífico. A los Drs. Magallanes, Escuder, Petrucelli y Simoncini, del Lab. de Biología Animal de la Dirección de Ganadería, por la intervención que les cupo en la castración de los animales mencionados en este trabajo; al Dr. Luis A. Barros por la confección de numerosas copias fotográficas, algunas de las cuales figuran en ésta publicación. Al Dr. Micucci y Bach. La Mata por la confección de algunas preparaciones a la Sta. Gladys Pagalday por la realización de secciones de materiales incluídos en parafina.

Montevideo, Setiembre 20 de 1956.