

00381 2ej. 20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"PAPEL DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN LA DIFERENCIACION ~~DE LA~~ DE LA GONADA DE ~~Xenopus laevis~~ Xenopus laevis"

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
(Biología)**

**P R E S E N T A :
MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO**

**Director de tesis: Dr. Horacio Merchant Larios
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1989



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I.- RESUMEN	1
II.-INTRODUCCION	
1.- Desarrollo y diferenciación sexual de la gónada	
1.1 Embriología de la gónada	4
1.2 Teoría corticomedular	5
1.3 Antígeno HY	6
2.- Parabiosis en anfibios	7
3.1	
3.2.1 Gónadas diferenciadas	9
3.2.2 Presuntas áreas gonadales	10
3.- Efecto de las hormonas esteroides sexuales en los vertebrados, enfoque particular en los anfibios.	11
4.- Biosíntesis de esteroides en los vertebrados, enfoque especial en anfibios.	
4.1 Metabolismo de esteroides	16
4.2 Localización de la actividad de la enzima 3 hidroxisteroide deshidrogenasa	20
III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	22
IV.- MATERIAL Y METODOS	
1.- Liberación de los gametos y mantenimiento de las larvas.	26
2.- Reversión sexual experimental	
2.1 Estrógenos	27
2.2 Antiestrógenos	27
2.3 Inhibidores de aromatasas	27
2.4 Andrógenos aromatizables	28
2.5 Andrógenos no aromatizables	28
3.- Microscopia de luz	
3.1 Fijación, deshidratación e inclusión del tejido	29
3.2 Corte	29
3.3 Análisis histológico	30
4.- Microscopia electrónica	
4.1 Fijación e impregnación del tejido	30
4.2 Análisis ultraestructural	31

5.- Histoquímica	
5.1 Inclusión y corte	32
5.2 Preparación del medio experimental para la 3 hidroxisteroide	32
6.- Metabolismo de esteroides	
6.1 Tejido animal e incubación	34
6.2 Extracción, purificación e identificación de los metabolitos radioactivos	35
6.3 Revelado de los esteroides	36
6.4 Recuperación de los esteroides del cromatograma	37
6.5 Determinación de la pureza radioquímica.	37
7.- Bioquímica del receptor a hormonas esteroides	38
V.- RESULTADOS	
1.- Morfología	40
2.- Reversión sexual	
2.1 Estrógenos y antiestrógenos	46
2.2 Andrógenos e inhibidores de aromatasas	47
3.- Biosíntesis de esteroides	
3.1 Histoquímica	48
3.2 Metabolismo	49
3.3 Receptor a hormonas sexuales	51
VI.- DISCUSION	
1.- Embriología de la gónada	52
2.- Histoquímica	57
3.- Metabolismo	61
4.- bioquímica del receptor	63
5.- Esteroides en la diferenciación sexual de la gónada de los anfibios	69
VII.- CONCLUSIONES	76
VIII.- APENDICE	78
IX.- BIBLIOGRAFIA	84

I.- RESUMEN

El origen de las células de la médula de la gónada de los vertebrados es aún tema de controversia en la actualidad. Se ha propuesto que estas células derivan a partir del blastema mesonefrico. Sin embargo, hay investigaciones hechas en otras especies de vertebrados las cuales proponen que las células de la médula se originan del epitelio celómico. Para determinar el origen embrionario de estas células se estudiaron todos los eventos celulares que se llevan a cabo durante el desarrollo de la gónada de las larvas del anfibio Xenopus laevis; desde la formación de la cresta genital hasta que ocurre la diferenciación sexual de la gónada. En este trabajo se describió por primera vez el desarrollo de la gónada embrionaria de X. laevis utilizando la técnica de alta resolución como la microscopía electrónica. En todas las etapas estudiadas se encontró similitud entre las células medulares y las del epitelio celómico.

Se ha propuesto que las hormonas esteroides participan en la diferenciación sexual de la gónada de los vertebrados. En X. laevis se ha visto que la diferenciación sexual de la gónada puede ser controlada por un factor epigenético de naturaleza hormonal. En este trabajo se evaluó el efecto de las hormonas esteroides sexuales en la diferenciación sexual de la gónada de X. laevis empleando estrógenos, antiestrógenos, inhibidores de aromatasas y andrógenos. La única hormona que revirtió 100% el sexo gonadal de las larvas, fué el benzoato de estradiol. Se

observó un efecto parcial en la diferenciación sexual de la gónada con otros estrógenos. Se obtuvieron los mismos resultados con el antiestrógeno y los inhibidores de aromatasas. Los andrógenos no influyeron en la diferenciación sexual de la gónada.

Los estudios morfológicos se extendieron para investigar los procesos de esteroidogénesis antes de que se lleve a cabo la diferenciación sexual de la gónada. Se estudió el metabolismo de hormonas esteroides en dos fases críticas del desarrollo embrionario: formación de la cresta genital (etapa 49) y gónada indiferenciada (etapa 54). Se utilizó como precursor la testosterona y demostró que la vía de biosíntesis en la región urogenital de las larvas de X. laevis es semejante a la de los embriones de mamíferos. En el presente trabajo también se utilizó la técnica histoquímica para detectar la actividad de la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β HSD) en la región urogenital de las larvas normales y tratadas con estrógenos, antiestrógenos e inhibidores de aromatasas. En todas las etapas estudiadas el único tejido esteroidogénico detectado fué la glándula interrenal y la gónada fué negativa.

Por otra parte se sabe que las hormonas esteroides ejercen su acción biológica a través de una proteína receptora, está se ha estudiado mucho en los mamíferos. En los anfibios unicamente hay un estudio del receptor a estrógenos realizado en el hígado de adultos de X. laevis. En la presente investigación se buscó el receptor a estrógenos en la región urogenital e hígado de larvas de X. laevis y el receptor a andrógenos en el cerebro y complejo

urogenital de las mismas. Sin embargo, no se pudo demostrar la presencia de la proteína receptora en ninguno de los tejidos estudiados.

En el presente estudio se plantea la posibilidad que los esteroides sexuales actuen como moduladores del factor(es) de la diferenciación sexual de la gónada y no como los responsables directos de este proceso(s).

II.- INTRODUCCION

1.-Desarrollo y diferenciación sexual de la gónada.

Durante el desarrollo embrionario u ontogénesis se llevan a cabo cambios morfogenéticos y funcionales que culminan en la formación de un organismo complejo. Durante este proceso en la mayoría de los vertebrados ocurre la morfogénesis y diferenciación sexual de la gónada.

La gónada está formada por los siguientes componentes: epitelio celómico o superficial, tejido mesenquimático (elementos somáticos) y células germinales primordiales (c.g.p.) de origen extragonadal.

El origen embriológico de las células somáticas de la gónada de los vertebrados ha sido tema de controversia desde la época clásica de la embriología. Vanini, (1951) sugirió que estas células derivaban a partir del blastema interrenal, al que ubicó en una zona vecina al mesonefros e independiente del mismo. Sin embargo, este planteamiento no se sostuvo durante mucho tiempo.

Otra hipótesis vigente durante muchos años fue propuesta por Witschi (1967), con base en una serie de observaciones realizadas en los anfibios. En ella sostiene que la gónada indiferenciada está formada de dos territorios estructurales, la médula y la corteza. La primera se forma por células que provienen del blastema mesonéfrico y la segunda por la proliferación de las células del epitelio celómico.

La hipótesis de la participación del mesonefros en la

formación de la gónada ha ganado numerosos simpatizantes (Bycov, 1978; Upadhyay y col., 1979; Zamboni y col., 1979) aunque también ha sido cuestionada por otros (Merchant-Larios y Centeno-Urruiza, 1979; Merchant-Larios y Villalpando, I. 1981; Merchant y col., 1984).

En la actualidad no se ha determinado cuál es el origen embrionario de las células medulares que forman la gónada, por lo que consideramos importante estudiar en este trabajo si el mesonefros participa en la morfogénesis gonadal.

Por otra parte, Witschi (1956) intentó explicar la diferenciación sexual de la gónada con su teoría dual de los inductores córtico-medulares. En ella propone que la médula y la corteza producen sustancias inductoras, la medularina y la cortecina, respectivamente. Witschi (1967) sugirió que los inductores tienen una doble función, estimular la diferenciación de un sexo e inhibir el desarrollo del otro. El propuso que la interacción entre éstos es semejante a una reacción inmune, de manera que la corteza produce la antimedularina y la médula la anticortecina. En el momento de la diferenciación sexual de la gónada, dependiendo del sexo genético del individuo, domina o prevalece uno de los dos territorios, potencialmente la médula se diferenciará como un testículo y la corteza como ovario. En la actualidad, a pesar del avance técnico, los inductores de la diferenciación sexual propuestos por Witschi no se han identificado.

Otra posible explicación de la diferenciación sexual de la

gónada se basa en la presencia de un antígeno de histocompatibilidad denominado HY. Este se ha asociado al sexo heterogamético; algunos estudios proponen que su presencia determina la diferenciación sexual del testículo (Watchel, 1975, 1980; Silvers y Watchel, 1977; Zenzes y col., 1978; Polani y Adinolfi, 1983). De estos estudios se deduce que su ausencia determina la diferenciación sexual del ovario.

El antígeno HY ha sido detectado en diferentes especies de vertebrados: Mamíferos (Zenzes y col., 1978; Watchel y col., 1975; Watchel y Bresler 1980; Polani y Adinolfi, 1983), aves (Bacon, 1970; Watchel y col., 1975; Muller y col., 1980 y Ebensperger y col., 1988), reptiles (Zarboski y col., 1979), anfibios (Zarboski, P 1979; Watchel, 1980) y peces (Muller y col., 1979; Pechan y col., 1979; Reinboth y col., 1987).

En los últimos años se ha cuestionado el papel que juega el antígeno HY en la diferenciación sexual de la gónada. Se ha visto que éste aparece en los ovarios de machos revertidos con esteroides como en los anfibios Xenopus laevis (Watchel y col., 1980) y Pelodytes punctatus (Zarboski P, 1979).

Aparentemente, el hecho de que la presencia del antígeno pueda ser evocada por las hormonas esteroides, indica que el antígeno HY aparece como una consecuencia y no como la causa de la diferenciación sexual de la gónada. Los datos contradictorios que existen en la literatura respecto a la participación de este antígeno en la diferenciación sexual del testículo (Ohno y col., 1978) hacen evidente la necesidad de investigar más en este campo.

2.- Parabiosis

Para obtener más información de la acción de las hormonas esteroideas en la diferenciación sexual de la gónada de los anfibios, se han usado otros métodos experimentales como la parabiosis, el trasplante de gónadas diferenciadas y el trasplante de presuntas áreas gonadales. Los experimentos pioneros sobre parabiosis fueron realizados por Burns (1925). Su técnica experimental consiste en unir las larvas a manera de siameses en la etapa de neurula o de botón caudal. Posteriormente se establece en éstas una anastomosis circulatoria y se obtiene una circulación común antes de que ocurra la diferenciación sexual de la gónada. Con esta técnica se trata de reproducir el efecto Free Martin encontrado en los bovinos. Los resultados obtenidos con este método son muy variables y dependen de la especie en estudio (Houchon, 1971).

Hay diferentes modalidades de parabiosis, la realizada de cabeza a cola, la de cabeza a cabeza; la más común es aquella en la que las larvas se unen a todo lo largo del cuerpo; la reversión sexual sólo se obtiene con esta última debido quizá a que los factores sexuales se difunden más fácilmente en este caso.

Se ha visto que si los miembros de un par parabiótico poseen el mismo sexo genético, la diferenciación sexual ocurre normalmente, pero si tienen diferente carga genética hay una circulación cruzada de hormonas, de tal manera que los esteroideos producidos por el testículo embrionario masculinizan a la gónada femenina (Houchon, 1971).

La parabiosis se ha realizado en algunas especies de anfibios como en los urodelos, Triturus torosus (Witschi y McCurdy, 1929), A. tigrinum y P. waltlii (Burns, 1930) en ello: se observó que hay siempre un dominio de la gónada masculina sobre la femenina.

Para analizar la relación que existe entre la constitución genética y la diferenciación sexual de la gónada durante la parabiosis, se han llevado a cabo algunas combinaciones genéticas en el urodelo P. waltlii (Gallien 1962;1965), en el que uno de los parabiontes es heteroploide. Los resultados obtenidos con la unión entre un macho haploide y una hembra diploide son variables. Algunas veces la hembra feminiza al testículo y en otras el parabionte haploide (el macho) impide el desarrollo ovárico de la hembra. Sin embargo, en P. waltlii la combinación $2n$ o $3n$ en el macho, siempre inhibe el desarrollo de la gónada femenina sea ésta $2n$ o $3n$.

Por otra parte para determinar si hay un efecto dominante de las hormonas sexuales en la diferenciación sexual de la gónada se han realizado combinaciones parabióticas heterosexuales entre individuos de diferentes especies como: Ambystoma mexicanum y Ambystoma tigrinum (Burns, 1935), Ambystoma maculatum y Triturus torosus, así como en Ambystoma tigrinum y Ambystoma jeffersonianum (Witschi, 1937).

En cada una de las parejas estudiadas una de ellas se caracteriza por ser de mayor tamaño y porque su velocidad de desarrollo es más rápida con respecto a la segunda; la especie de mayor tamaño en este caso la hembra, ejerce un efecto

dominante sobre la gónada masculina. Esto afecta directamente la diferenciación sexual de los testículos que son transformados en pequeños ovarios (Burns, 1935; Witschi, 1937).

En los anuros también se ha realizado la parabiosis, pero los resultados son menos dramáticos que en los urodelos (Witschi, 1931; Houchon, 1971). En los primeros, la parabiosis entre un macho y una hembra influye sobre todo en la diferenciación sexual del ovario. Se ha visto que en la combinación heterosexual entre Discoglossus pictus y Pelodytes punctatus hay un claro dominio de la gónada masculina sobre la femenina, la cual finalmente se diferencia como un ovotestis (Houchon, 1971).

En otras especies de anuros como Bombina variegata, Pelobates cultripes, Pelodytes punctatus, Alites obstetricans y Limnodynastes tanmaniensis, la combinación heterosexual no afecta la diferenciación sexual de la gónada de ninguno de los parabiontes, de tal forma que cada uno de éstos se diferencia de acuerdo a su sexo genético (Houchon, 1971).

A pesar de la amplia información obtenida con la técnica de parabiosis, el papel que desempeñan las hormonas esteroides en la diferenciación sexual de la gónada no se ha aún esclarecido.

Otra de las formas en las que pueden ser revertidas las gónadas de los anfibios, en este caso las hembras genéticas, es a través del trasplante de gónadas ya diferenciadas (testículos) en la cavidad abdominal de las larvas, en las cuales no ha ocurrido aún la diferenciación sexual de la gónada, como en X. laevis (Mikamo y Witschi, 1963; 1964) y en P. waltlii (Collenot col., 1975). Al realizar el trasplante, si el

acceptor es un macho genético éste se diferencia normalmente. Si el receptor es hembra, los ovarios son transformados en testículos. La funcionalidad de las hembras revertidas con esta técnica ha sido comprobada a través de la cruce de los animales revertidos con otra hembra normal (Mikamo y Witschi, 1963; 1964).

El análisis del cariotipo de X. laevis, no muestra diferencias de tipo estructural en los cromosomas sexuales del macho y de la hembra (Mikamo y Witschi, 1966). Sin embargo, se sabe que la constitución genética de este anfibio es ZZ para los machos y ZW para las hembras; esto fue demostrado a través de estudios genéticos en los descendientes obtenidos tanto de machos invertidos con la administración de hormonas esteroides (Chang y Witschi, 1953), como en las hembras revertidas a través del trasplante testicular (Mikamo y Witschi, 1963; 1964). Otro de los métodos utilizados para esclarecer la participación de las hormonas esteroides en la diferenciación sexual de la gónada, se realizó transplantando las presuntas áreas gonadales (Humphrey, 1928, 1948; Collenot, 1975). Con esta técnica se seleccionan las larvas en el estadio de botón caudal, se aísla el área posterior que dará origen a la gónada y se implanta en la misma posición que ocupaba, en un embrión receptor que esté en una etapa igual de desarrollo (Collenot, 1975). Estos experimentos fueron hechos en Ambystoma tigrinum (Humphrey, 1945) y en P. waltlii (Collenot, 1975). Las combinaciones entre individuos del mismo sexo, no parecen afectar la diferenciación sexual de la gónada. Sin embargo, en las combinaciones entre

individuos con diferente carga genética, el testículo inhibe el desarrollo del ovario y éste se transforma en un testículo funcional. Se demostró que los animales revertidos con esta técnica, son funcionales (Humphrey, 1945, 1948). Una de las ventajas obtenidas al emplear esta técnica, fué la de una mayor supervivencia de las larvas con este tipo de trasplante comparada con el bajo índice de supervivencia de las larvas de un par parabiótico. Otro tipo de trasplante utilizado consiste en asociar la parte anterior del área mesodérmica que formará la gónada de un embrión de genotipo femenino y la posterior de otro masculino; también en este caso el área de la gónada femenina transplantada generalmente es inhibida (Houillon y Charlomagne, 1971).

3.- Hormonas esteroides

La idea acerca de la posible participación de las hormonas esteroides en la diferenciación sexual de la gónada, surgió al observar el efecto Free Martin. Este es un fenómeno que se observó por primera vez en embriones gemelos de bovinos con sexo genético diferente (Moore y col., 1957) y ocurre por anastomosis vascular del corion de las placentas de tal manera que la testosterona producida por el testículo embrionario (Lillie y Bascom, 1922) se difunde a través del sistema circulatorio y organiza un ovotestis en la hembra (Willer, 1921). El análisis de estos resultados dio origen a una teoría hormonal en la que se propone a las hormonas esteroides u hormonas sexuales como

agentes responsables de la diferenciación sexual de la gónada (Lillie, 1916, 1917).

Esto condujo a la apertura de un área de investigación que plantea la posibilidad de modular la diferenciación sexual de la gónada a través de los esteroides. A partir del efecto Free Martin se ha experimentado con hormonas esteroides en diferentes especies de vertebrados.

En el marsupial Didelphis virginiana la hormona esteroide dipropionato de testosterona provoca una feminización de los machos genéticos (Burns, 1939; 1950; 1955; 1956 y 1961); éste es el único caso en los mamíferos en donde se ha logrado una reversión del sexo gonadal con esteroides. Por otra parte la administración de esteroides, estrógenos y andrógenos a las hembras gestantes de roedores, no parece tener ningún efecto en la diferenciación sexual de la gónada de los embriones de rata y ratones (Turner, 1940; Reynaud, 1942), de conejo (Jost, 1947) y de hamster (Brunner y Witschi, 1946). En otros mamíferos, los experimentos realizados con esteroides in vitro no han logrado revertir la gónada (McCarrey y Abbot, 1979).

Los esteroides en los reptiles, al igual que en otras especies de vertebrados no mamíferos, provoca una respuesta diferente en cada una de las especies estudiadas. La inyección de estrona en los machos genéticos de Lacerta agilis feminiza parcialmente al testículo (Dantchakoff, 1937), mientras que en Lacerta vivipara, los estrógenos y andrógenos no parecen modificar la diferenciación sexual de las gónadas (Dufaure, 1966).

En otras especies de reptiles como la tortuga Chrisemys

marginata, el dipropionato de testosterona administrado a las hembras durante la etapa de gástrula, impide la diferenciación normal del ovario (Risley, 1940). En la tortuga Testudo graeca el estradiol administrado antes y después de la diferenciación sexual impide la transformación normal de los cordones testiculares en túbulos seminíferos (Pieau, 1970) y en Chelydra serpentina el estradiol feminiza cuando es administrado en etapa embrionaria (Gutske y col., 1988).

En las aves, los andrógenos no ejercen ningún efecto, pero el tratamiento con estrógenos durante el período crítico de la diferenciación afecta la determinación sexual del testículo y causa una feminización de los machos genéticos (Wolff y Ginglinger, 1935). Los mismos resultados han sido obtenidos en la codorniz Coturnix coturnix (Haffen, 1966).

En los anfibios, las hormonas esteroides se han usado para investigar su efecto en la diferenciación sexual de la gónada empleando dos estrategias experimentales. Administrar directamente las hormonas en el agua donde están desarrollándose las larvas en Rana sylvatica (Mintz, 1948) y en Ambystoma opacum (Mintz y Witschi, 1947; Foote, 1941), en Pleurodeles waltlii (Gallien, 1954) y en Xenopus laevis (Gallien, 1956; Chang y Witschi, 1953), o a través de una inyección, en Rana temporaria (Gallien, 1944) y en Rana catesbeiana (Pucket, 1939).

En los anfibios se ha visto que el esteroide dominante, capaz de revertir el sexo gonadal de las larvas, parece ser el correspondiente al sexo genético heterogamético (Gallien, 1954; 1955; 1956; Chang y Witschi, 1953; Mintz, 1948). Es decir, en

las especies en las que el sexo homogamético es ZZ para los machos y ZW para las hembras, los estrógenos revierten a los machos, en A. opacum (Foote, 1941) en P. waltlii (Gallien, 1954) y en X. laevis (Gallien, 1956; Chang y Witschi, 1953). En los anfibios con carga genética XX (hembra) y XY (macho) como en R. sylvatica (Mintz, 1948) y Pseudacris nigrata triseriata (Witschi y col., 1958), los andrógenos son los que influyen en la determinación sexual de la gónada.

Algunos estudios han demostrado que se puede revertir el sexo gonadal de las larvas cuando éstas son tratadas con estrógenos en etapas tempranas, generando de esta manera una población 100% femenina en X. laevis (Gallien, 1954; 1955; 1956; Chang y Witschi, 1953), en P. waltlii, (Gallien, 1950; 1954; Witschi, 1953) y en A. opacum (Foote, 1941).

La administración de las hormonas sexuales femeninas, provoca también diferentes respuestas en cada una de las especies de anfibios estudiados. En los anuros los estrógenos ejercen un grado variable de feminización en los machos genéticos. Se ha observado que la reversión sexual es completa y permanente en R. temporaria (Gallien, 1944) y en P.n. triseriata (Witschi y col., 1958) y además funcional en X. laevis (Witschi, 1955; 1956).

En otros anfibios como Pelobates cultripes se logra una feminización completa pero temporal; en Pelodytes punctatus Triturus alpestris y Discoglossus pictus la gónada se feminiza parcialmente y se observa intersexualidad. Sin embargo, el anuro Bombina variegata no responde a la acción de las hormonas sexuales femeninas. En los casos donde se presenta una

reversión sexual temporal o intersexualidad, los individuos tienden a regresar a su sexo genético una vez que dejan de estar en contacto con las hormonas esteroides. En los urodelos, como P. waltlii, la administración de hormonas esteroides femeninas, durante largos períodos, causa una reversión funcional de todos los machos genéticos (Gallien, 1950; 1954).

Por otra parte se ha observado que los estrógenos, feminizan a dosis bajas y masculinizan en dosis altas (Gallien, 1944). Esta acción dual de las hormonas esteroides ha sido denominado efecto paradójico (Padoa, 1936; Mintz, 1945; Gallien, 1941; 1944; 1954; 1955; 1956; Witschi y col., 1958) y se presenta también con las hormonas sexuales masculinas. En la actualidad no se sabe a qué se debe este fenómeno.

La variabilidad de la respuesta a la administración de las hormonas esteroides en los ránidos, parece depender de la dosis administrada. Se ha visto que cuando se inyectan dosis bajas de testosterona en las larvas de una especie indiferenciada, como Rana temporaria, durante toda la vida larvaria se obtiene el 100 % de machos (Gallien, 1937, 1944). Los experimentos realizados por Mintz y Witschi (1946) y Mintz (1948), demostraron también la acción masculinizante de la testosterona administrada en dosis pequeñas en R. sylvatica.

Los estudios del efecto de los andrógenos en la diferenciación sexual de la gónada, se han extendido a otras especies de anuros como Rana hyla (Witschi y Crown, 1937), Rana clamitans (Mintz y col., 1945), R. catesbeiana (Pucket, 1939), Bufo americanus (Chang, 1955) y en P. nigrita triseriata

(Witschi y col., 1958); en todas éstas se ha logrado una reversión sexual completa.

Algunos estudios revelan que los andrógenos no tienen ningún efecto en la diferenciación sexual de la gónada en otros anfibios como Pelobates cultripes, Pelodytes cultripes, Pelodytes punctatus, Bufo bufo, Discoglossus pictus, Alites obstetricans y Bombina variegata (Gallien, 1965). Se ha demostrado que los esteroides no sólo influyen en la diferenciación sexual de la gónada, sino que también afectan la diferenciación normal de otros órganos (Gallien, 1954; Collenot, 1965; Witschi, 1953).

Existe en la literatura un panorama muy amplio de estudios realizados en los anfibios con hormonas esteroides sexuales. Sin embargo, no se sabe cómo participan éstas en la diferenciación sexual de la gónada. Para dilucidar esto, en nuestro trabajo abordamos este aspecto experimentalmente utilizando hormonas esteroides, inhibidores específicos de la síntesis de estrógenos y antiestrógenos.

4.- Biosíntesis de esteroides

Puesto que las hormonas esteroides aparentemente están relacionadas de una manera directa o indirecta en la diferenciación sexual de la gónada, se ha investigado en los vertebrados la actividad esteroidogénica de esta glándula durante la etapa embrionaria, antes y después de que ocurra la diferenciación sexual de la gónada.

En general el metabolismo de hormonas esteroides se ha estudiado más en los mamíferos y la mayoría de los trabajos se realizaron en los adultos; sólo hay algunos efectuados en la etapa embrionaria en seres humanos (Bloch y col., 1967 ; Acevedo y col., 1963; George y Wilson, 1978; Roberts y Warren, 1964), en vaca (Lipsset y Tullner, 1965) y en conejo (Milewich y Wilson, 1977., George y Wilson ., 1979).

En los mamíferos se demostró que las vías de biosíntesis de las hormonas esteroides en las gónadas son las siguientes: una denominada la vía de los delta 4, en esta la biosíntesis de los andrógenos y estrógenos puede realizarse a partir de 17α hidroxiprogesterona y la de los delta 5 la cual se inicia con la formación de la 17α hidroxipregnenolona

Por otra parte hay algunos estudios sobre el metabolismo de hormonas esteroides realizados en los vertebrados inferiores, en los que se ha reportado que éste tiene una secuencia análoga a la de los mamíferos; como en peces (Kime, 1980; Lupo Di Prisco y col., 1970; Kime y Hews, 1978), anfibios (Ozon y Stocker, 1974; Antila y Saure, 1979; Gavaud, 1975 Gallien y Chalumeau le Foulgoc, 1960) y en aves (Del Rio y col., 1967; Nakamura y Tanabe, 1974; Fevold y Eik Ness, 1963; Haffen, 1966). Sin embargo, existen diferencias en la biosíntesis de las hormonas sexuales que son especie específicas, como los esteroides producidos en los peces; éstos sintetizan hormonas esteroides como la 11 oxotestosterona y la 11 hidroxitestosterona (Kime y Hews, 1978).

En los anfibios los estudios de la biosíntesis de hormonas esteroideas se enfocaron sobre todo al grupo de los anuros como R. esculenta (Kime y Hews, 1978), R. catesbeiana (Dale y Dorfman, 1977; Muller, 1977), R. temporaria (Ozon y col., 1974; Antila y Saura, 1978), Bufo marinus (kime y Hews, 1978), Rana pipiens (Kime y Hews, 1968), Nectophyroides occidentalis (Gavaud, 1975) Discoglossus pictus pictus (Ozon y Stocker, 1974) y X. laevis (Rao y col., 1968, 1969 y Redshaw y Nicholls, 1971). En los urodelos únicamente se han estudiado dos especies: P. waltlii (Ozon, 1967) y Triturus cristatus cornifex (Lupo di Prisco, 1972). En los ápodos no existe ningún trabajo realizado hasta la fecha.

La biosíntesis y distribución de los andrógenos varía en cada una de las especies de anfibios estudiados. La 5 α dihidrotestosterona parece ser el metabolito que más se produce, y esta ampliamente difundido en la mayoría de los anfibios como R. esculenta (Kive y Hews, 1978), R. temporaria (Ozon y col., 1964; Antila y Saure, 1978), R. pipiens (Antila y Saure, 1978), Bufo marinus (Kive y Hews 1978) y Discoglossus pictus (Ozon y Stocker, 1974). Únicamente en las larvas de X. laevis no se detectó este andrógeno. Sin embargo, en esta misma especie se encontró 5 α dihidrotestosterona en el plasma de los adultos (Muller, 1976). En otros anfibios se han encontrado andrógenos como la testosterona y la androstendiona en P. waltlii (Ozon, 1975), en Triturus cristatux cornifex (Prisco, 1972) y en X. laevis (Rao y Col., 1968;1969; Brauer, 1966: Redshaw y Nichols 1971).

Otros metabolitos producidos en las gónadas de los anfibios como D. pictus, son los compuestos 5α reducidos como 5α androstandiona y los androstandioles 5α -androstan- 3β , 17 diol y el 5β -androstan- 3α , 17β diol) y sus respectivos isómeros, (Ozon y Stoker, 1974). Un andrógeno que es poco común en los anfibios es la dehidroepiandrosterona; éste únicamente se ha encontrado en el urodelo Triturus cristatus cornifex (Lupo di Prisco y col., 1972).

El metabolismo de los estrógenos también se ha estudiado poco en los anfibios. La presencia de estrona y estradiol se ha demostrado en los ovarios juveniles y adultos de X. laevis, (Redshaw y Nichols, 1971; Gallien y Chalumeau le Foulgoc, 1960) en la etapa embrionaria en esta misma especie (Rao y col., 1968, 1969; Antila y Teravainen, 1974 y Breuer y col., 1966); en los adultos de otras especies como Bufo marinus (Kime y Hews 1978), P. waltli (Ozon, 1967) y R. esculenta (Kime y Hews, 1978), también se ha encontrado estrona y estradiol.

Por otra parte hay pocos trabajos realizados para localizar los receptores a hormonas esteroides en los vertebrados inferiores. Sólo hay un trabajo hecho sobre el receptor a estrógenos en el escualo Acanthias acanthias (Callard y Mak, 1985). Los receptores a estrógenos y andrógenos no se han estudiado en las gónadas en ninguna especie de anfibio en la etapa embrionaria, los primeros únicamente se han encontrado en los adultos de Xenopus laevis (Westley y Knowland 1978).

El metabolismo de hormonas esteroides sexuales se ha investigado en la etapa larvaria y en el adulto del anfibio X.

laevis. Sin embargo, se sabe poco acerca del metabolismo de hormonas esteroideas en la gónada antes de que se lleve a cabo la diferenciación sexual de la misma. Tampoco se sabe si hay receptores a estrógenos y andrógenos en la gónada de este anfibio. Por lo tanto en este trabajo realizamos investigaciones a este respecto, para tratar de entender los mecanismos que llevan a una gónada indiferenciada a diferenciarse como un ovario o un testículo.

Por otra parte la biosíntesis de hormonas esteroideas, también se ha estudiado con la ayuda de técnicas histoquímicas. Una enzima detectada con esta metodología y que está estrechamente asociada a los procesos de esteroidogénesis es la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β HSD). Esta es necesaria para la síntesis de todas las hormonas biológicamente activas y ha sido una herramienta útil para la ubicación del tejido esteroidogénico, antes y después de que ocurra la diferenciación sexual de la gónada.

La 3β hidroxisteroide deshidrogenasa se ha localizado en la gónada de los mamíferos (Rubin y col., 1963; Golmann y col., 1972; Levy y col., 1959) y en los vertebrados no mamíferos como aves (Narbaitz y Kolodny, 1964; Ozon, 1969), reptiles (Chieffi y Botte, 1963; y anfibios (Nandi, 1967; Narbaitz y Kolodny, 1964., Xavier y col., 1970; Redshaw y Nikolls, 1971; Zarnoska y col., 1972; Hsu y col., 1978; Chieffi y Botte, 1963; Collenot, 1964, 1967; Rapola, 1962; Gallien y col., 1964;

En este último grupo el conocimiento de esta enzima puede reducirse a algunos trabajos realizados en el adulto (Nandi,

1967; Xavier y col., 1970; Redshaw y Nicholls, 1971; Zarmoska, y col., 1972) y en la etapa larvaria (Gallien, 1964; Collenot, 1964; Hsu y col., 1978).

La actividad de la 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa se demostró, en la etapa de gónada indiferenciada y en los ovarios de R. catesbeiana durante el desarrollo embrionario (Hsu y col., 1978) y en el urodelo P. waltlii (Gallien, 1954; Collenot 1964; 1975; Collenot y Collenot, 1977); así como en los ovarios y testículos de animales adultos de X. laevis (Pesonen y Rapola, 1962; Zarmoska y col., 1972), Rana esculenta (Chieffi y Botte, 1963), Triturus cristatus cornifex (Della y col., 1962) y Nectophyroides occidentalis Angel (Xavier, 1970).

Esta enzima se ha localizado en la glándula interrenal de P. waltlii en diversos estadios del desarrollo embrionario (Gallien, y col., 1964), en las larvas de R. sylvatica (Hsu y col., 1977), en larvas y adultos de Rana esculenta (Chieffi y Botte, 1963), en los adultos de Bufo bufo (Pesonen y Rapola, 1972) y en las larvas de Xenopus laevis, (Rao y col., 1966). Así mismo se encontró actividad de la 3 β hidroxisteroide deshidrogenasa en la glándula interrenal, ovarios y testículos de los descendientes de P. waltlii revertidos con estrógenos (Collenot, 1964). La actividad de esta enzima parece disminuir en la glándula interrenal y en las gónadas de las larvas de R. sylvatica que han sido tratadas con hormonas esteroides (Hsu y col., 1978).

III.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.

A pesar del gran número de reportes que existen en la literatura sobre la acción de las hormonas esteroides en la diferenciación sexual de la gónada en muchas especies de anfibios, en la actualidad aún no se esclarece cómo participan estas hormonas en la diferenciación sexual gonadal.

En este trabajo investigamos los mecanismos que llevan a una gónada a diferenciarse como un ovario o un testículo, estudiando cómo influyen los esteroides sexuales en la morfogénesis y diferenciación sexual de la gónada, del anfibio X. laevis.

Por otra parte se sabe que el sexo gonadal de los machos genéticos de X. laevis puede modificarse epigenéticamente con la administración de hormonas esteroides cuando éstos son tratados con estrógenos en etapas tempranas (26 y 27). Este complejo proceso, incluye también la reversión sexual de las células somáticas que forman la gónada. La fácil modulación del programa de diferenciación sexual de la gónada, establecido desde el momento de la fertilización en las larvas de X. laevis, nos hizo pensar que estábamos ante un interesante modelo de control epigenético de naturaleza hormonal que modula la diferenciación sexual de la gónada.

Como vimos en la introducción, Witschi (1967) propuso una teoría en la que plantea que la médula y la corteza tienen un origen embriológico diferente. La médula se forma por la migración de células procedentes del blastema mesoneférico y la corteza por proliferación de las células del epitelio celómico. Nosotros cuestionamos esta teoría dual sobre el origen de las

células somáticas que forman la gónada. Por lo anterior en este trabajo abordamos primero el problema del desarrollo de la gónada, con un enfoque sobre el origen embriológico de las células somáticas que constituyen este órgano. Estudiamos cada uno de los eventos celulares que se llevan a cabo durante el desarrollo normal de la gónada de las larvas de X. laevis, desde la formación de la cresta genital hasta que ocurre la diferenciación sexual de la misma, utilizando técnicas de alta resolución como la microscopía electrónica. Este estudio es necesario como un antecedente obligado para realizar e interpretar los estudios de reversión sexual experimental con hormonas esteroides administradas exógenamente a las larvas de X. laevis.

Por otra parte, en la actualidad se sabe poco sobre la capacidad de biosíntesis de hormonas sexuales en las gónadas embrionarias de los anfibios, antes de que ocurra la diferenciación sexual de la gónada. Tampoco se han estudiado los receptores a estrógenos y andrógenos en la gónada de ningún anfibio en la etapa embrionaria.

Con base en los antecedentes y razones expuestos anteriormente en nuestro trabajo extendimos los estudios morfológicos para ahondar más en los procesos de esteroidogénesis durante el desarrollo ontogénico de las larvas de X. laevis. En la primera parte de este trabajo estudiamos la ubicación de una enzima clave en la esteroidogénesis como la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa, en la segunda el metabolismo de hormonas esteroides y los sitios receptores a las mismas.

Para tratar de esclarecer el papel de las hormonas esteroides en la diferenciación sexual de la gónada partimos de la siguiente hipótesis de trabajo: La diferenciación sexual de la gónada tiene como base la activación diferencial del genoma de las células somáticas gonadales, lo cual determina la síntesis de enzimas clave en la vía esteroidogénica, éstas sintetizarían preferencialmente andrógenos en el caso de los machos y estrógenos en las hembras. Así mismo los receptores específicos a las hormonas estrogénicas y androgénicas pudieran también ser el producto de la activación diferencial del genoma y modular la respuesta selectiva a los esteroides exógenos.

OBJETIVOS

- 1.- Establecer el origen embriológico de las células que forman la médula de la gónada del anfibio X. laevis.
2. Determinar la localización del tejido esteroidogénico durante el desarrollo ontogénico de las larvas de X. laevis, normales y tratadas con estrógenos antiestrógenos e inhibidores de la síntesis de estrógenos
- 3.- Determinar la etapa en la que se inicia la síntesis de estrógenos y andrógenos en la zona urogenital de las larvas de

X. laevis, antes de la diferenciación sexual de la gónada.

4.- Indagar la presencia de receptores a estrógenos y andrógenos en el área urogenital, hígado y sistema nervioso de las larvas de X. laevis, antes y después de que ocurra la diferenciación sexual de la gónada.

IV.- MATERIAL Y METODOS

1 .- Liberación de los gametos y mantenimiento de las larvas.

Los experimentos se realizaron en larvas de X. laevis obtenidas de ejemplares adultos de laboratorio. La maduración y liberación de los gametos en las hembras y los machos, se indujo con gonadotropina coriónica humana (Gonadotrotyl-C de Laboratorios Roussel). La hormona liofilizada fue reconstituida en una solución de NaCl al 0.7% y se aplicó intradérmicamente con una jeringa de tuberculina en la región de los ganglios linfáticos dorsales, de acuerdo al siguiente método.

El primer día se administraron 50 UI (unidades internacionales) a los machos, el segundo 75 UI a las hembras y el tercero 200 UI a los machos y 500 UI a las hembras. Los huevos fertilizados fueron colectados 16 horas después de la administración de la última dosis de gonadrotrofina coriónica. Los embriones obtenidos se pusieron en una solución de Holfreter (ver preparación en el apéndice) y agua en una proporción 1:1 hasta la eclosión.

Las larvas se mantuvieron en agua desclorinada a una temperatura de 21 ± 1 °C, con ciclos de luz - oscuridad de 12 horas cada uno de ellos y aereación constante durante todo el desarrollo embrionario. Las larvas se alimentaron con polvo de alfalfa y con alimento especial de Carolina Biological Company.

2.- Reversión sexual experimental

Para evaluar la acción de los esteroides sobre la diferenciación sexual de la gónada, se seleccionaron en un microscopio estereoscópico grupos de 100 larvas que estuvieran en la misma etapa de desarrollo. Estas fueron mantenidas en un volumen constante de 7 litros de agua durante el periodo de experimentación. Todas las hormonas esteroides utilizadas, antiestrógenos e inhibidores de aromatasas fueron disueltos en alcohol al 95 % y se agregaron al agua donde estaban desarrollándose las larvas. Los tratamientos hormonales que recibieron éstas se dividieron en cinco grupos.

Estrógenos

En este grupo se administraron hormonas con diferente capacidad estrogénica, benzoato de estradiol a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{l}$, estrona a 75, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{l}$ y estriol a 100, 200 y 400 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Antiestrógenos

Unicamente se evaluó la acción del tamoxifén, en las dosis de 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Inhibidores de aromatasas

Se administraron dos tipos de inhibidores de las aromatasas 1,4,9 (11) Androstatrien - 3, 17 diona y 1,4,6 (11) Androstatrien- 3, 17 diona. Cada uno de estos se evaluó a una concentración de 100, 200, 400 y 600 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Andrógenos aromatizables

Se estudió la acción de hormonas que pueden utilizarse como precursores de estrógenos: propionato de testosterona, androstendiona, dehidroepiandrosterona y noretisterona a una concentración de $100\mu\text{g}/\text{l}$. Esta última es un progestágeno y se ha visto que tiene una actividad androgénica y estrogénica.

Andrógenos no aromatizables

Se administraron andrógenos que no son utilizados como precursores de estrógenos: 5α - dihidrotestosterona, androsterona y androstandiol (3β - 17β) también a una concentración de $100\mu\text{g}/\text{l}$.

Para cada uno de los cinco grupos se hizo un grupo testigo, que únicamente recibió por tratamiento alcohol al 95 %, es decir, el vehículo en el que fueron disueltas las hormonas esteroides.

3.-Microscopía de luz

Todas las larvas sometidas a los diferentes tratamientos con hormonas esteroides fueron sacrificadas de la etapa 56 a la 62 en éstas la gónada ya se diferenció sexualmente. Cada etapa larvaria se estableció de acuerdo a las características de desarrollo externo reportado por (Nieukoop y Faber, 1956). La mitad de éstas se procesó con la técnica de rutina para microscopía electrónica (ver material y métodos) y la otra con la técnica histológica de inclusión en parafina para microscopía

de luz, que se da a continuación.

Fijación, deshidratación e inclusión del tejido

Se aisló la región urogenital de las larvas de X. laevis y se fijó por inmersión en Carnoy o Bouin a 4 °C, dos horas. Después, el tejido se lavó con agua corriente de la llave durante 20 minutos y se deshidrató en alcoholes porcentuales del 50 % al 100 %, 20 minutos en cada uno de ellos. Inmediatamente después de la deshidratación el tejido se pasó a xilol, dos horas a temperatura ambiente. La región urogenital se impregnó en una mezcla de xilol- parafina 1:1, 1:2 y 1:3, una hora en cada una de ellas a 60 °C y posteriormente se puso en parafina pura durante seis horas a la misma temperatura. Finalmente el tejido se incluyó en parafina a temperatura ambiente en moldes de plástico.

Corte

Se obtuvieron cortes de 8 a 10 μ de grosor en un microtomo para parafina de American Optical modelo 820. Los cortes obtenidos se pasaron con un pincel a un baño María, a una temperatura de 45 °C. Una vez que se extendieron se montaron en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente, luego fueron desparafinados con tres cambios de xilol de 10 minutos cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente se pasaron por alcoholes en porcentajes decrecientes desde alcohol absoluto, 95%, 90 %, 80 %, 70 % y 50 %, 10 minutos en cada uno. Los cortes se hidrataron en agua destilada por espacio de 15 minutos.

Análisis histológico

Se escurrió el agua de las laminillas y se sumergieron en hematoxilina de Harris, 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se lavó el exceso de colorante con agua corriente de la llave y se pusieron en una solución de carbonato de litio un minuto. Los cortes fueron puestos en una mezcla de alcohol acidulado al 1% durante 2 minutos y se pasaron a alcohol al 70% Estos se hidrataron en agua destilada 5 minutos, se tiñeron con eosina acuosa al 1% 4 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Las laminillas se deshidrataron en alcoholes porcentuales del 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto, 5 minutos en cada uno de ellos. Estas se sumergieron por xilol 5 minutos y se montaron con Bálsamo de Cánada. Los cortes se observaron en un microscopio Ultraphot II de Carl Zeiss.

4.- Microscopía electrónica

La liberación de los gametos, así como el mantenimiento y alimentación de las larvas, se realizó de acuerdo al método reportado anteriormente (ver material y métodos, página 26). Se sacrificaron en promedio 9 larvas de cada una de las etapas de desarrollo estudiadas, desde la 49 a la 56.

Fijación e impregnación del tejido

Se aisló la región urogenital (mesonefros y gónada) e inmediatamente se fijó por inmersión en un fijador trialdehídico modificado (sin acroleína) a 4 °C, una hora. Posteriormente el

tejido se enjuagó con un amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y se posfijó en tetraóxido de osmio al 1% en cacodilato de sodio 0.1 M a 4 °C una hora. Después la región urogenital se enjuagó con agua destilada y se deshidrató con acetona al 70 %, 80 %, 90 %, 95 % y acetona absoluta 10 minutos en cada una de ellas. La impregnación se realizó en mezclas de epón (ver preparación en el apéndice) y acetona absoluta en las siguientes proporciones: 1:1, 1:2, 1:3 y epon puro, 24 horas en cada uno de ellas a temperatura ambiente. El tejido se incluyó finalmente en epon puro y se dejó polimerizar 24 horas a 60 °C.

4.2.- Análisis ultraestructural

La región urogenital se estudió alternando cortes semifinos para microscopía de luz de 1 μ m de grosor y cortes finos para microscopía electrónica de 80 a 100 nm. El tejido se cortó en un ultramicrotomo LKB III modelo 8800, los cortes obtenidos para microscopía de luz se tiñeron por inmersión en una solución de azul de toluidina al 0.4 %. Se observaron y fotografiaron en un microscopio Ultraphot II de Carl Zeiss. Los cortes finos se montaron en rejillas de cobre de 100 y 200 mesh, se contrastaron con citrato de plomo, se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico, modelo EM-A9 de Carl Zeiss.

5.- Histoquímica

Para este estudio se tomaron larvas de X. laevis normales, tratadas con benzoato de estradiol, tamoxifen e inhibidores de aromatasas en las siguientes etapas: 49, 54, 55, 56, 59, 60 y

66. Cada una de éstas se determinó de acuerdo a las características establecidas en la tabla de Nieukoop y Faber (1956).

Inclusión y corte

Se aisló la región urogenital (mesonefros y gónada) y se incluyó en un agente embebedor (Tissue Tek II de Miles) en una cápsula de plástico y se congeló a -70°C en hexano, en una cámara con acetona y hielo seco. Se obtuvieron cortes de 8 μ de grosor en un criostato (microtomo de congelación) de American Optical Corporation a -20°C , y se colectaron en laminillas con gelatina. Para detectar la actividad enzimática de la 3 hidroxisteroide deshidrogenasa, se preparó el siguiente medio de incubación.

Preparación del medio experimental

Se disolvieron 20 mg de NBT (Nitro Blue Tetrazolium, grado III) de Sigma, en 20 ml de amortiguador Tris-HCl 0.2 M, ph 7.6. Por separado se disolvieron 40 mg de NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotido) también en 20 ml del amortiguador Tris-HCl. Se mezclaron ambas soluciones y se separaron 20 ml de esta solución para utilizarla como medio control. El medio experimental se preparó agregando a los 20 ml restantes de la mezcla arriba descrita, 2 mg de la hormona esteroide (dehidroepiandrosterona). Esta fue disuelta por separado en 0.5 ml de dimetil-formamida. Los cortes se incubaron 2 horas a 37°C en este medio en cajas de Coplin.

Después de la incubación, el tejido se enjuagó con el amortiguador Tris -HCl, 0.2 M, pH 7.6 y se fijó con formalina neutra, 10 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente los cortes se enjuagaron con agua destilada, se tiñeron con una solución acuosa de verde rápido al 1%, medio minuto y se lavaron con agua destilada. Los cortes se montaron con glicerol puro, fueron observados y fotografiados en un microscopio Ultraphot II de Carl Zeiss.

6.- Metabolismo de esteroides

Se empleó testosterona marcada con tritio en los siguientes carbonos 1, 2, 6 y 7 con una actividad específica de 98.8 Ci/mola, la cual se obtuvo de la compañía New England Nuclear de Boston, Massachusetts. Este compuesto fue purificado por cromatografía en capa fina en placas de silicagel, en benceno-acetato de etilo 2:1. La pureza radioquímica de la testosterona, se estableció al recrystalizar una alícuota con testosterona pura no radiactiva, hasta alcanzar una actividad específica constante.

Las hormonas esteroides que se utilizaron fueron las siguientes: androstendiona (4- androsten- 3, 17- diona), androstandiol (5 α androstan- 3 β , 17 β - diol), testosterona (17 hidroxí-4 androsten -3- ona), dihidrotestosterona (5 α androstan - 17 ol -3- ona), estradiol (1, 3, 5 (10) - estratrien - 3, 17- diol), estrona (3-hidroxí-1, 3, 5 (10)- estratrien- 17 ona). Estos compuestos se obtuvieron de Steraloids Corporation y de Sigma Laboratories. Cada uno de los compuestos se recrystalizó

varias veces para verificar su pureza. Todos los solventes utilizados fueron de grado analítico y se redestilaron antes de usarse.

Tejido animal e incubación

Se aisló la región urogenital de 40 larvas de X. laevis normales para cada una de las etapas estudiadas; establecimiento de la cresta genital (etapa 49) y la (etapa 54) de gónada indiferenciada. Las etapas se establecieron de acuerdo a las características de desarrollo presentes en la tabla de (Nieukoop y Faber, 1956). Cada una de éstas se incubó por separado en un matraz Erlenmeyer con 4 μ Ci de testosterona tritiada marcada en los carbonos 1, 2, 6 y 7 a una concentración 0.5 μ M, en 5 ml de una solución Holfreter para anfibios ph 7.3.

El control del experimento consistió en incubar la hormona radiactiva en las mismas condiciones que el experimental, pero sin el tejido; en ninguno de los casos se utilizaron cofactores. La incubación de tejido se realizó en un incubador metabólico modelo O2156 de American Optical durante una hora a 22 °C en agitación constante con una atmósfera de 95 % de oxígeno y 5 % de bióxido de carbono. La reacción enzimática se detuvo adicionando 5 ml de una solución de diclorometano saturado con agua. Los matraces se mantuvieron en congelación hasta el momento de homogenizar el tejido. Después el tejido se homogenizó, con acetato de etilo empleando homogenizadores tipo Elvehem; el homogenado se dejó reposando 24 horas a temperatura ambiente.

Extracción, purificación e identificación de los metabolitos radiactivos.

Los metabolitos radiactivos formados durante la incubación fueron extraídos del tejido homogenizado con acetato de etilo y de la fase acuosa con diclorometano saturado con agua, este proceso se repitió 5 veces para cada una de las fases. La fase orgánica (diclorometano) se colectó en matraces Erlenmeyer y se hizo pasar a través de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua. al terminar las extracciones el diclorometano se evaporó en un baño María con atmósfera de nitrógeno. El extracto seco se redisolvió en 10 ml de metanol y se tomaron alícuotas por triplicado de 1/200 del volumen del extracto y de la fase acuosa, 1/10 para determinar el contenido de tritio en cada uno de ellos. Cada alícuota se disolvió en 10 ml de una solución de centelleo, Instagel (Packard Instrument Company Inc) para las muestras acuosas y el extracto con una mezcla formada por 4 g de PPO(2,5, difenil - oxazol) y 200 mg de dimetil POPOP 1,4 -bis 2 (4- metil - 5 fenil - oxazolil; - benceno) disueltos en un litro de tolueno de grado centelleo.

Para separar los lípidos que podrían interferir durante el proceso de purificación de los esteroides radioactivos formados los extractos se disolvieron en 5 ml de metanol al 90% saturado con heptano. Después se tomaron alícuotas de 1/200 para determinar el contenido de radioactividad en cada una de las fases. Posteriormente se agregó al extracto 200 fg de las siguientes hormonas. 17 β estradiol, estrona, testosterona,

androstendiona, androstandiol y 5 α dihidrotestosterona.

Todo el resto del extracto obtenido se cromatografió y cada una de las hormonas radioactivas producidas se separaron por cromatografía en capa fina en placa de sicagel en un sistema formado de cloroformo-acetato de etilo en una proporción 80:20.

Se utilizaron hormonas esteroides no radiactivas como estándares a una concentración de 1 μ g para localizar cada uno de los metabolitos radioactivos producidos en las etapas estudiadas. Posteriormente cada uno de los cromatogramas se pasó por un Radiocromatograma Scanner para ratificar que el pico de radioactividad detectado para cada metabolito, coincidiera con la posición ocupada por las hormonas no radiactivas. Los esteroides no radioactivos utilizados como referencia y los agregados al extracto inicial, se revelaron con reacciones de color.

Revelado de los esteroides

a).- Absorción de luz ultravioleta La función 3 cetona le proporciona al esteroide la capacidad de absorber la luz ultravioleta de una longitud de onda de 250 nM. Esta propiedad se utiliza para identificar hormonas esteroides con este tipo de estructura.

b).- Reacción de azul de Turnbull

Los estrógenos poseen en el anillo A una estructura fenólica que reacciona con el azul de Turnbull (ferrocianuro férrico) y produce un color azul estable en presencia del ácido clorhídrico

concentrado.

Recuperación de los esteroides del cromatograma

Una vez localizados los esteroides en los cromatogramas, tanto por reacciones de color como por absorción de luz ultravioleta y radiactividad, se recortaron de los cromatogramas cada uno de los metabolitos revelados y se lavaron con metanol absoluto, éste solvente es muy polar y tiene una alta afinidad por los esteroides. Posteriormente el metanol se evaporó en baño María con atmósfera de nitrógeno.

Determinación de la pureza radioquímica

La actividad específica de un compuesto marcado radioactivamente se define como la cantidad de radioactividad por unidad de masa. Puesto que la cantidad de testosterona marcada utilizada como precursor en este estudio es muy pequeña, los productos obtenidos tienen también una masa insignificante del orden de los picogramos. Para poder establecer la estructura de cada uno de los metabolitos radioactivos aislados por cromatografía, se agregó una cantidad extra de esteroide frío, no marcado, que sirve como acarreador específico para cada uno de los compuestos formados. El esteroide se agregó a los cristales (fase en donde se forman los cristales de los esteroides) y a las denominadas aguas madres (fase en la que se encuentran las hormonas esteroides que no alcanzaron a formar cristales y otros metabolitos formados durante la incubación).

La determinación de la actividad específica se llevó a cabo

tomando una alícuota aproximadamente de un miligramo de los cristales y de las aguas madres previamente secadas. Cada una de las muestras se pesaron en una electrobalanza Cahn modelo G-2 calibrada a un miligramo. Las muestras radioactivas se pusieron en viales de vidrio con 10 ml de una solución de centelleo y se contaron 1 minuto en un espectrometro de centelleo líquido Beckman modelo 2660 .

7.- Bioquímica del receptor a hormonas esteroides

Para demostrar la presencia del receptor a hormonas esteroides se realizó la técnica siguiente.

Se aisló la región urogenital de larvas normales de X. laevis de las etapas 49 y 57 a 4 °C, así como de larvas tratadas con benzoato de estradiol en las etapas 53 y 60. El tejido se homogenizó en un homogenizador tipo Elvehem con pistilo de teflón a 4 °C y se pasó a tubos (ultraclear centrifuge tubes de Beckman) y se centrifugó una hora a 3000 revoluciones por minuto (rpm) en un rotor SW.50.1 en una centrifuga L8 de Beckman. Se separó el citosol y se incubó con una solución 2 nM de estradiol tritinado durante 18 horas a 4 °C.

Posteriormente se agregó al citosol una mezcla de carbón al 0.25 % y dextran 0.025 % a 4 °C y se incubó 10 minutos a la misma temperatura. Después de la incubación el citosol se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm a 4 °C en una ultracentrifuga de Beckmann con un rotor SW. 50.1

Inmediatamente después de la centrifugación, se separó de los

tubos la fase acuosa y se pusieron 400 μ l de ésta a gradientes lineales de sacarosa del 20 % al 35 %. Los tubos fueron sellados y la muestra se centrifugó a 25000 g, 2 horas a 4 °C en una ultracentrifuga de Beckman con un rotor SW 50.1. Al finalizar la centrifugación, los gradientes fueron fraccionados por goteo y colectados en viales de vidrio. Se le agregó a cada uno de los viales 5 ml de Instagel (solución de centelleo para muestras acuosas), se agitaron en un vortex, se limpiaron con alcohol y se contaron un minuto en un contador de centelleo líquido modelo 2660 de Beckman.

El receptor a estrógenos, se trató de detectar también en el hígado y cerebro de las larvas normales en las etapas 55 y 56 y en las larvas de X. laevis tratadas con benzoato de estradiol en las mismas etapas. Asimismo, se buscó el receptor a andrógenos en el área cerebral y urogenital de las larvas, para lo cual se incubó con mibolerone marcada con tritio y se siguió la técnica arriba reportada.

V.- RESULTADOS

1.-Morfología

Uno de los primeros eventos que se llevan a cabo en la morfogénesis de la gónada del anfibio X. laevis, es la formación de las crestas genitales. Estas se forman en la etapa 49 como una evaginación del epitelio colómico y se localizan paralelas al mesenterio intestinal en la región medial del mesonefros (Fig. 1). En esta etapa hay algunas células germinales primordiales (c.g.p) en la cercanía de las crestas genitales y otras ya están presentes en las mismas (figs. 1 y 2).

En la misma etapa se observa a la glándula interrenal localizada en la región dorsomedial del mesonefros (Figs.1 y 2); ésta es homóloga a la suprarrenal de los mamíferos. Sin embargo, la interrenal de X. laevis, no tiene una médula y una corteza bien diferenciada y organizada como en los mamíferos. Al microscopio electrónico se ve que esta glándula está formada de dos tipos celulares: Células de tipo cromafin con numerosos gránulos electrodensos en su citoplasma y células de tipo esteroidogénico con numerosas inclusiones lipídicas y mitocondrias con crestas tubulares (Figs. 3 y 5), las cuales se encuentran presentes únicamente en las células productoras de hormonas esteroides. Es interesante notar que al inicio del desarrollo estas células son las más diferenciadas y las más abundantes que se encuentran en la región cercana a donde se desarrollará la gónada.

En la etapa 50, se observan los tres tipos celulares que forman el blastema mesonéfrico, células cromafines con numerosos

gránulos electrodensos en su citoplasma, células de forma ameboide con inclusiones de densidad electrónica media y células con citoplasma poco diferenciado y núcleos con grandes zonas heterocromáticas (Fig. 4). En la etapa 51 las crestas genitales empiezan a elongarse y las primeras células germinales que llegan a las crestas permanecen en la región distal (Fig. 6). En estas etapas se observa al microscopio de luz el movimiento de algunas células del epitelio celómico hacia la parte interna de la cresta genital (Fig.6). El desplazamiento de estas células es detectado al microscopio electrónico por la interrupción de la lámina basal que cubre al epitelio celómico y a través de la cual migran las células hacia el interior de la gónada (Fig. 7).

Al principio las primeras células que forman la médula se localizan en la zona intermedia, cercanas a la región donde están ubicadas las primeras células germinales primordiales que llegaron a la gónada (Fig 7). El espacio interepitelial cercano a la región proximal de las crestas genitales, es muy estrecho y posee abundantes fibras de colágena. En todos los embriones estudiados no se encontró en esta zona ninguna célula migrando que nos indicara su procedencia de la región mesonéfrica hacia la gónada, para formar la médula gonadal.

Durante las etapas 52 y 53 se nota el crecimiento de la gónada el cual es indicado por la presencia de figuras mitóticas en la región correspondiente a la médula (Fig.10). Al microscopio electrónico se ve que existe una similitud ultraestructural entre las células del epitelio celómico y las de la médula (Fig.9 y 11). En la etapa 52, se observa que hay

una invaginación del epitelio gonadal que da origen a las células de la médula de la gónada (Fig.9). Asimismo no se encontró ningún parecido ultraestructural entre estas células y las del llamado blastema mesonéfrico (Figs.4 y 8).

La última fase del establecimiento de la gónada indiferenciada se lleva a cabo en las etapas 54 y 55. En estas ocurre una segregación de los dos territorios estructurales que forman la gónada indiferenciada la médula y la corteza. La primera se encuentra en la región central de la gónada y la segunda se distribuye en la periferia (Fig. 12 y 14). La segregación de estos territorios ocurre por la invasión de tejido mesenquimático (conectivo) que procede de la región mesonéfrica.

En estas mismas etapas se ve que la médula aparece sólo en una de las gónadas, mientras que en la otra únicamente se ve tejido mesenquimático (Fig.14). Esta observación es frecuente debido a que la médula no se encuentra distribuida a todo lo largo de la gónada uniformemente, sino en forma de masas compactas separadas por tejido conectivo. En estas mismas etapas en la zona central de la médula se nota que empieza a aparecer una pequeña cavidad, la cual se mantiene en el caso de que la gónada se diferencié como ovario (Fig.12). Al microscopio electrónico se observa que aún existen puentes de contacto entre la médula y la corteza, la presencia de desmosomas en la médula indica que esta región empieza a organizarse como un epitelio (Fig. 12 y 13). Hasta esta etapa tanto los futuros machos como las hembras tienen el mismo patrón

de morfogénesis de la gónada. Por lo tanto la diferenciación sexual surge a partir de una estructura común a ambos sexos que es la gónada indiferenciada, semejante a lo que ocurre en los mamíferos.

En la etapa 56 se lleva a cabo la diferenciación sexual histológica de la gónada en ovarios y testículos. La diferenciación sexual del ovario, se manifiesta por el crecimiento de la cavidad central en la zona medular, la cual esta presente desde la etapa de gónada indiferenciada, así como por la presencia de las células germinales primordiales en la zona periférica denominada corteza (Fig.16), la cavidad al ir creciendo desplaza al epitelio de la médula hacia la corteza. Al microscopio electrónico se observa una lámina basal que bordea a las células de la corteza. Sin embargo, hasta este momento del desarrollo de la gónada femenina, las células germinales primordiales no han iniciado la meiosis; este proceso se hace evidente en las gónadas de las larvas a partir de la etapa 62 (Fig. 19).

En el caso de la diferenciación sexual del testículo las células germinales primordiales migran hacia la zona medular y se asocian con las otras células somáticas que forman la gónada, en ésta se observan algunos cordones presentes (Fig. 15 y 23). El epitelio cortical en este caso se reduce a una capa delgada de células que cubren externamente al testículo (Fig. 15). Al microscopio electrónico se observa que existe una lámina basal delimitando el epitelio cortical de la médula (Fig. 22).

En las larvas tratadas con benzoato de estradiol a partir de

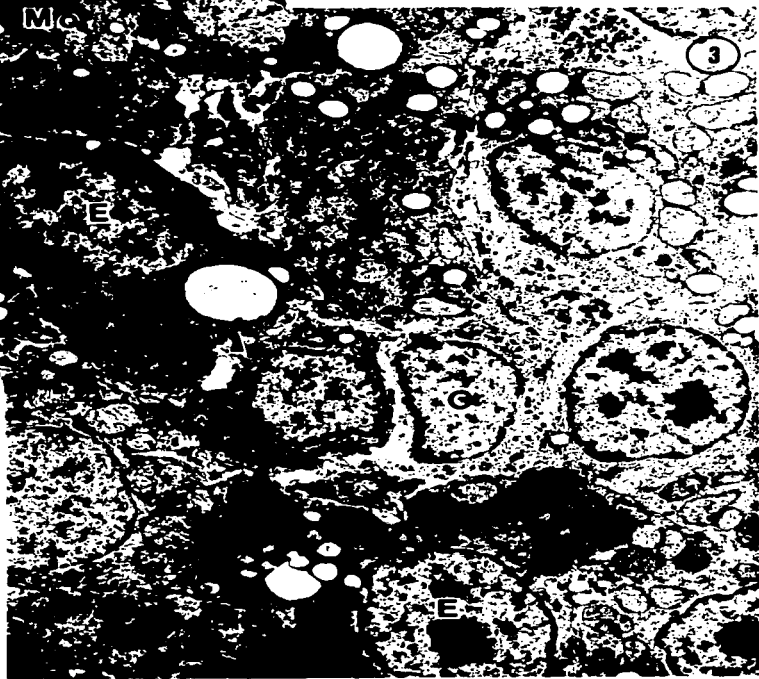
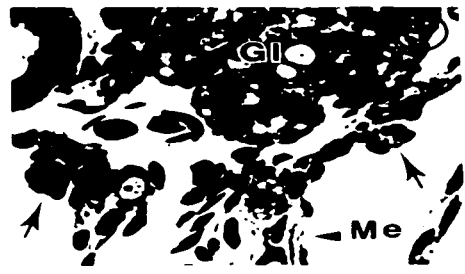


Fig. 1. Etapa 49. Fotografía de luz en la que se observan las dos crestas genitales localizadas (flechas) a ambos lados del mesenterio intestinal y la glándula interrenal (GI). 550 X

Fig. 2. Etapa 50. Se muestran las dos crestas genitales (flechas), la de la derecha contiene una célula germinal primordial que ocupa casi toda la cresta. Se observan también las células del blastema mesonéfrico (BM), la glándula interrenal (GI) y un túbulo mesonéfrico (TM). 550 X

Fig. 3. Etapa 50. Micrografía electrónica que ilustra los dos tipos principales de células presentes en la glándula interrenal. Células cromafines (C) con numerosos granulos electrodensos y células esteroidogénicas (E) con zonas numerosas inclusiones lipídicas (flechas) en su citoplasma. Estas células son las más abundantes y poseen mitocondrias (Mc) con crestas tubulares (Mc). 5823 X



Fig. 4. Micrografía electrónica, se muestran los tres tipos celulares que forman el blastema mesonéfrico. Células cromafines (C) con numerosos granulos electrodensos, células de forma ameboide (A) con citoplasma poco diferenciado e inclusiones de densidad media y células con núcleos con grandes zonas heterocromáticas (H). 6900 X

Fig. 5. Etapa 49. Micrografía electrónica de una célula esteroidogénica de la glándula interrenal, se observan las mitocondrias (Mi) con crestas tubulares y una parte del núcleo (N) de una inclusión lipídica (L). 19000 X.



Fig. 6. Etapa 51. Fotografía de luz; se observan las dos crestas genitales separadas por un mesenterio intestinal (Me). Algunas células del epitelio celómico se desplazan hacia la parte interior en la gónada izquierda (flecha). 350 X

Fig.7 . Etapa 51. Micrografía electrónica de la cresta genital en la misma etapa de desarrollo. La lámina basal del epitelio celómico (flechas) es interrumpida por células (*), que parecen migrar hacia el interior de la gónada . Se observa también una parte de una célula germinal primordial (cgp) localizada en la región distal de la gónada. Note lo estrecha que es la gónada en la región cercana al mesonefros. 7200 X

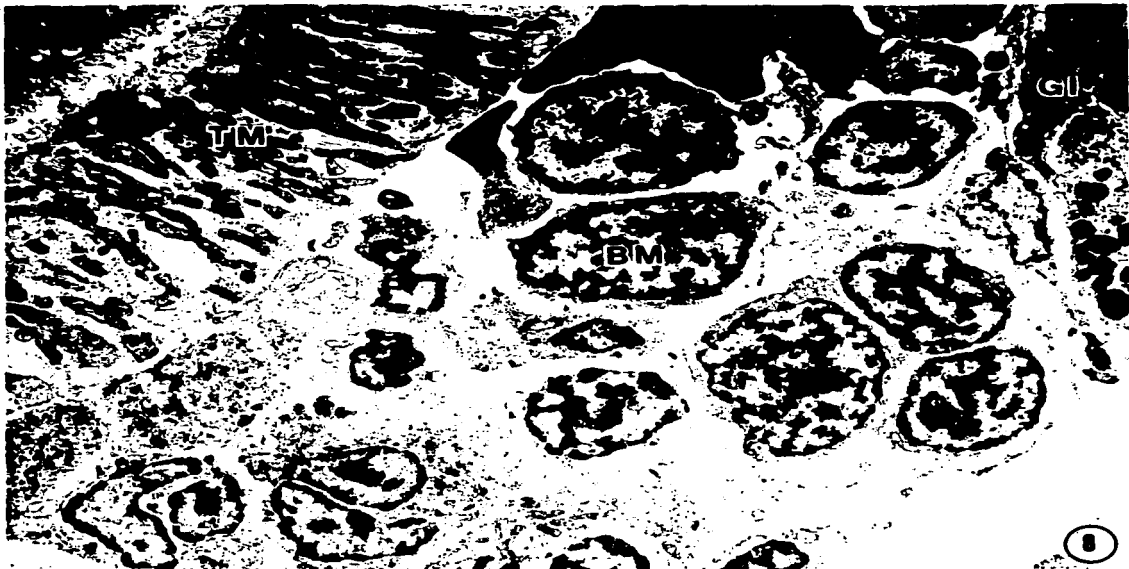


Fig. 8. Etapa 52. Micrografía electrónica de la región mesonéfrica que muestra sus componentes principales. Túbulo mesonéfrico (TM), parte de la glándula interrenal (GI) y el llamado blastema mesonéfrico (BM) situado entre las dos estructuras, formado por varios tipos celulares. Note la diferencias en las características citológicas de estas células y las de la figura 9. 6840 X.

Fig. 9. Etapa 52 . Micrografía electrónica de una gónada, la flecha indica lo que parece ser una invaginación del epitelio celómico, el cual dará origen a las primeras células de la médula. 6840 X

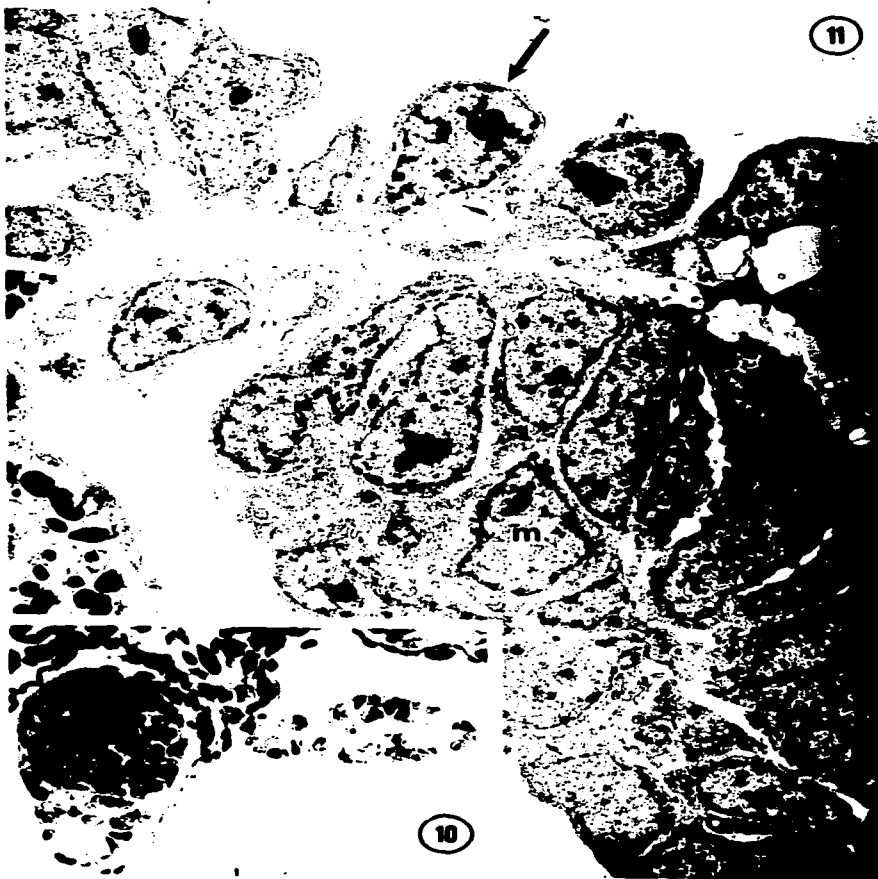


Fig. 10 . Etapa 52. Fotografía de luz que muestra las dos gónadas con un desarrollo asimétrico; la del lado izquierdo tiene una apariencia compacta. La presencia de las dos figuras mitóticas (flechas) sugiere su crecimiento. 550 X.

Fig. 11 . Etapa 52. Micrografía electrónica de la parte proximal de la gónada en la región cercana al mesonefros. El epitelio superior está formado por una simple capa de células (flecha). En la parte baja se observan a las primeras células que forman la médula (m). 6400 X.



Fig. 12. Micrografía electrónica en la que se observa una lámina basal continua (flechas) entre las células de la corteza (C) y las de la médula (M). La presencia de desmosomas (D) en la zona medular (flechas), sugiere que esta región ha empezado a organizarse como un epitelio. 6400 X.

Fig. 13. Etapa. 55. Micrografía electrónica en la que se muestran a mayor amplificación los desmosomas (D) del epitelio medular. 7500 X.

Fig. 14. Etapa 55. Fotografía de luz que muestra la gónada derecha con una médula (M), separada de la corteza (C). Mientras que la gónada izquierda únicamente posee tejido conectivo. 336 X.

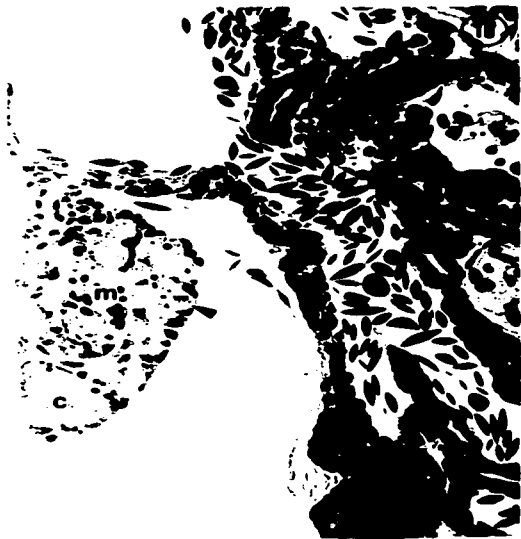
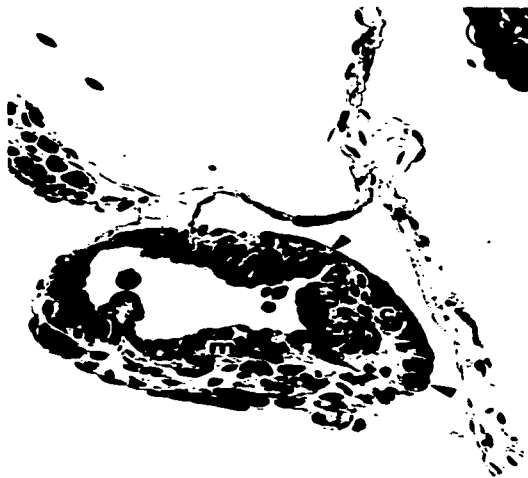
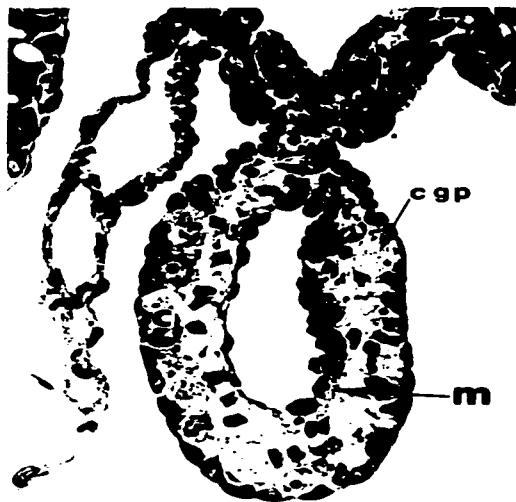


Fig. 15. Etapa 56. Fotografía de luz, se muestra un testículo con el epitelio adelgazado (C) y la zona medular (M) compacta con algunos cordones. 336 X.

Fig. 16. Etapa. 56. Fotografía de luz, se observa un ovario típico con una cavidad muy desarrollada en la zona medular (m). La mayoría de las células germinales primordiales (cgp) están localizadas en la corteza (C). 336 X.

Fig. 17. Fotografía de luz de un ovotestis de una larva sacrificada en la etapa 62. El tratamiento con benzoato de estradiol se inició en la etapa 52. Las células germinales primordiales (flechas) están ubicadas en la médula (m) y en la corteza (c). 336 X.

Fig. 18. Ovotestis fijado en la etapa 62, se muestra la bisexualidad de la gónada. Algunas células germinales primordiales (flechas) han migrado a la médula (m) y otras permanecen en la corteza (C). 336 X

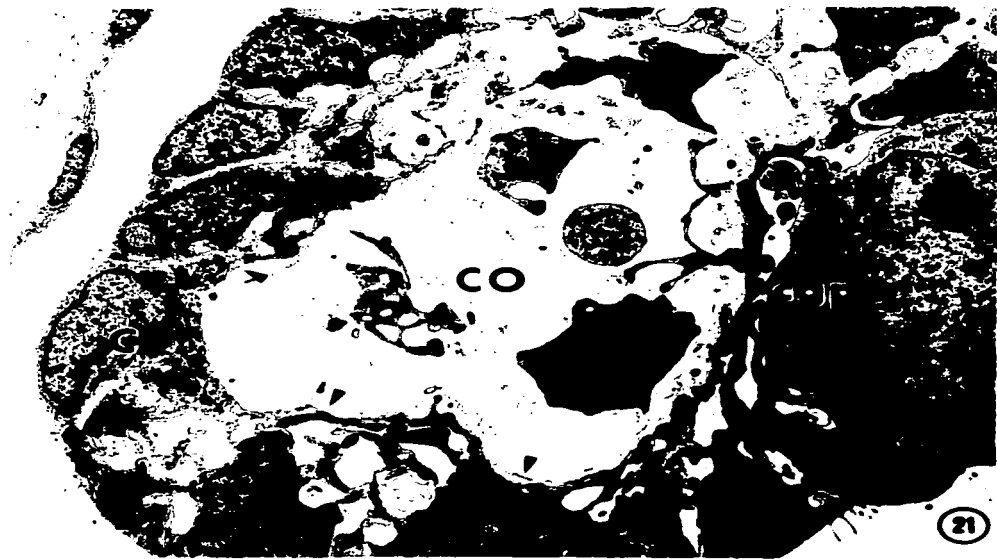


Fig. 19. Ovario fijado en la etapa 62, el tratamiento con benzoato de estradiol se inicio en la etapa 55. Muchos ovocitos localizados en la corteza (C) estan en meiosis (flechas) y uno en proceso de crecimiento (Oc). 336 X

Fig. 20. testículo afectado por el estradiol administrado a partir de la etapa 54 y sacrificado en la etapa 62. Se observa una organización anormal de la médula (m) y la medula (m).336 X.

Fig. 21. Micrografia electrónica de un ovario de una larva en la etapa 56. Se observa la cavidad ovarica en la parte central (CO) y una célula germinal primordial (cgp) localizada en la corteza (C). Asi como la presencia de una lamina basal (flechas) que delimita al epitelio en la cavidad ovarica 6900 X.



Fig. 22. Micrografía electrónica se observa una parte de la médula (M), la presencia de dos láminas basales (flechas) que limitan al epitelio del testículo denominado también (C) de la médula (M). 4330 X

Fig. 23. Micrografía electrónica que muestra el aspecto de los cordones testiculares (CT), se observa una célula germinal primordial (cgp) incluida en uno de éstos. 5823 X

la etapa 49, se llevan a cabo cada uno de los eventos celulares reportados en este estudio durante el desarrollo normal del ovario de X. laevis. No se encontraron autofagosomas en la zona medular en ninguno de los embriones tratados con benzoato de estradiol lo cual indicaría que la reversión sexual de los machos genéticos se lleva a cabo por destrucción de este territorio. Sin embargo, encontramos que hay intersexualidad en las gónadas de las larvas tratadas a partir de la etapa 51 en adelante. La gónada de estos animales se caracteriza por la localización de las células germinales primordiales en la región medular y cortical (Figs. 17,18 y 20); normalmente éstas se ubican sólo en la médula o la corteza una vez que se diferencia sexualmente la gónada.

2.- Reversión sexual

Estrógenos

La administración de benzoato de estradiol en periodos cortos de 1,2,3,5 y 10 días no modifica el sexo gonadal de las larvas de X. laevis. Todas las gónadas de las larvas tratadas a partir de las etapas 52 a la 55 mantuvieron su aspecto indiferenciado. Cuando el tratamiento fué iniciado en la etapa 56 se obtuvieron ovarios y testículos (Tabla 1).

En nuestro estudio el benzoato de estradiol revierte el sexo de la gónada larvaria sólo si éstas se ponen en contacto con la hormona por periodos largos que oscilan entre tres y cuatro meses de duración. Este es el tiempo promedio que las larvas

LARVAS DE <i>Xenopus laevis</i> TRATADAS CON BENZOATO DE ESTRADIOL 100 µg / l					
ETAPA AL INICIAR EL TRATAMIENTO	TIEMPO (DIAS)	ETAPA AL ESTUDIAR LAS GONADAS	INDIFERENCIADAS	OVARIOS	TESTICULOS
52-53	1	52-53	20	0	0
54	1	54	15	0	0
55	1	55	17	0	0
56	1	56	0	13	14
52-53	2	52-53	17	0	0
54-55	2	54-55	12	0	0
56	2	56	0	10	11
54-55	3	54-55	16	0	0
56	3	56	0	18	16
54-55	5	54-55	16	0	0
56	5	56	0	11	9
54-55	10	54-55	21	0	0
56	10	56	0	12	14

Tabla 1. Etapas usadas para evaluar el efecto del benzoato de estradiol a corto plazo. Las gónadas de las larvas de las etapas 52 a la 55 mantienen su aspecto indiferenciado, independientemente de la duración del tratamiento (1 a 10 días). En la etapa 56 las gónadas se diferencian de acuerdo al sexo genético del individuo.

LARVAS DE *Xenopus laevis* TRATADAS CON BENZOATO DE ESTRADIOL 100 µg/l

ETAPA AL INICIAR EL TRATAMIENTO	ETAPA AL ESTUDIAR LAS GONADAS	O V A R I O S	TESTICULOS	OVOTESTIS	% SOBREVIVENTES Cn = 100 INICIALES
44	56 - 65	66	0	0	66
48	56 - 66	68	0	0	68
49	57 - 60	55	0	0	55
50	56 - 63	60	0	0	60
51	56 - 63	25	0	28	53
52	56 - 67	27	0	22	49
53	56 - 65	29	0	31	60
54	58 - 63	30	0	35	65
55	59 - 63	28	24	0	52
56	58 - 65	23	26	0	49
48 (control)	56	23	26	0	49
52 (control)	56 - 57	22	24	0	46

Tabla 2. Se muestran las diferentes respuestas de las gónadas a la acción del benzoato de estradiol en cada una de las etapas estudiadas. De la etapa 44 a la 50 se obtiene 100% de reversión sexual de la gónada. A partir de la etapa 51 a la 54 se observa un efecto parcial. En la etapa 56 la hormona ya no ejerce ningún efecto en la diferenciación sexual de la gónada.

tardan en llegar a la etapa en la que ocurre la diferenciación sexual de la gónada. Se obtuvo 100 % de reversión sexual de las larvas cuando éstas fueron tratadas con benzoato de estradiol a partir de la etapa 44 a la 50 (Tabla 2). El análisis histológico realizado en las gónadas de las larvas sacrificadas al final del tratamiento, mostró que todas tenían ovarios típicos (Fig.16). Cuando los tratamientos fueron iniciados en la etapa 51 a la 54) el benzoato de estradiol no revirtió completamente a la gónada, en este caso se obtuvo una reversión parcial. Las gónadas de estas larvas tuvieron una organización histológica anormal típica de un ovotestis; este término se aplica a las gónadas con características masculinas y femeninas (Fig.17,18 y 20). En las larvas tratadas a partir de la etapa 56, no se observó ningún efecto de la hormona en las gónadas, éstas se diferenciaron de acuerdo al sexo genético del individuo (Tabla, 2).

La estrona afectó parcialmente la diferenciación sexual de la gónada; únicamente algunas larvas respondieron al tratamiento hormonal. El número de ovotestis pareció aumentar conforme aumentó la dosis ensayada y el de ovarios a disminuir; no se obtuvo 100% de reversión del sexo gonadal de las larvas sometidas a este tratamiento (Tabla 3).

En las larvas tratadas con el estriol, se observó un efecto parcial de esta hormona en la diferenciación sexual de la gónada con cada una de las dosis ensayadas (75, 100, 200 y 400 µg). En cada uno de éstas detectamos número considerable de ovarios y testículos (Tabla 3). Se aplicó la prueba estadística de

LARVAS DE *Xenopus laevis* TRATADAS CON ESTROGENOS *

DOSIS	E S T R O N A			E S T R I O L			S T I L B E S T R O L		
	OVARIOS	TESTICULOS	OVOTESTIS	OVARIOS	TESTICULOS	OVOTESTIS	OVARIOS	TESTICULOS	OVOTESTIS
75 µg	22	26	7	-	-	-	-	-	-
100 µg	20	35	13	26	28	0	19	31	10
200 µg	16	29	15	31	27	0	22	33	8
400 µg	-	-	-	29	0	17	15	28	7
control	18	17	0	21	19	0	1	15	0

*TRATAMIENTO INICIADO DE LA ETAPA 49-56

Tabla 3. Larvas de *Xenopus laevis* tratadas con estrógenos de la etapa 49 a la 56. Se observa un efecto parcial en la diferenciación sexual de la gónada. En ningún caso se obtuvo 100% de reversión sexual.

correlación de Sperman. Sin embargo, nuestros resultados no fueron significativos.

Por otra parte el dietilstilbestrol tampoco logró revertir 100% el sexo de las larvas. Sólo se observó un efecto parcial en la gónada y parece que el número de ovotestis disminuye conforme se incrementa la dosis (Tabla 3).

Antiestrógenos

La dosis de 25 μg de tamoxifen no influyó en la diferenciación sexual de la gónada, el número de machos y hembras se encontraron presentes en una proporción de 1:1, igual que en los animales normales. Tampoco se logró revertir completamente el sexo gonadal de las larvas tratadas con 50 y 75 μg de tamoxifen, pero observamos una reversión parcial en algunas de éstas; se notó un aumento en el número de ovotestis y una disminución en el de ovarios conforme aumentó la dosis empleada (Tabla 4).

Algunos ejemplares de X. laevis tratados con 75 μg de tamoxifen se lograron mantener durante dos años. Estos fueron estimulados varias veces en diferentes periodos con gonadotropina coriónica humana. Los ovocitos liberados de estos animales tenían un aspecto anormal comparados con los de los animales normales. Su tamaño fue mayor, la distribución del pigmento fué irregular y no se distinguía el polo animal del polo vegetal. La dosis de 100 μg de tamoxifen fué letal; únicamente lograron sobrevivir 30% de las larvas y en este caso tampoco se obtuvo 100% de reversión sexual de la gónada en las sobrevivientes (tabla 4). Por otra parte, el antiestrógeno

LARVAS DE *Xenopus laevis* TRATADAS CON TAMOXIFEN *

D O S I S	O V A R I O S	TESTICULOS	OVOTESTIS	NO. DE LARVAS
25 μ g	28	25	0	53
50 μ g	18	27	11	56
75 μ g**	16	23	13	52
100 μ g	7	12	11	30
control	16	19	0	35

* TRATAMIENTO DE LA ETAPA 49 A LA 56

** ALGUNOS ANIMALES TRATADOS CON ESTA DOSIS SE MANTUVIERON DURANTE DOS AÑOS

Tabla 4. Larvas de *Xenopus laevis* tratadas con tamoxifen de la etapa 49 a la 56. El número de ovarios disminuye y el de ovotestis se incrementa.

administrado en esta dosis, no pareció actuar únicamente a nivel de la gónada, sino que afectó el metabolismo de la melanina ya que todas las larvas adquirirían un color blanquecino. Se aplicó la prueba estadística de correlación de Spearman. Las diferencias encontradas con los tratamientos son significativas a $p < 0.001$.

Andrógenos

Los andrógenos aromatizables como el propionato de testosterona, androstendiona y dehidroepiandrosterona no tuvieron ningún efecto en la diferenciación sexual de la gónada de X. laevis. El diagnóstico del sexo gonadal, mostró que el número de hembras y machos fué semejante al reportado en los animales normales (Tabla 5). La única hormona que pareció afectar la diferenciación sexual de la gónada de X. laevis, fue la noretisterona con esta se encontró un número elevado de ovarios y algunos ovotestis, y no se detectaron testículos (Tabla 5).

Los andrógenos no aromatizables como la androsterona, la 5α dihidrotestosterona y el androstandiol (3β , 5α) no tuvieron ninguna influencia en la diferenciación sexual de la gónada, el número de hembras y machos detectado fué de aproximadamente 50 % en cada caso (Tabla 5) en las larvas estudiadas.

Inhibidores de aromatasas.

Los resultados obtenidos con los inhibidores de aromatasas son los siguientes. No se encontró un efecto marcado o polarizado en la proporción de hembras y machos con los dos inhibidores

LARVAS DE *Xenopus laevis* TRATADAS CON ANDROGENOS 100 µg / l

HORMONA	ETAPA AL INICIAR EL TRATAMIENTO	ETAPA AL ESTUDIAR LAS GONADAS	O V A R I O S	TESTICULOS	OVOTESTIS	% SOBREVIVENTES
PROPIONATO DE TESTOSTERONA *	49	56	39	37	0	63
NORETISTERONA	49	56	28	0	7	35
ANDROSTENDIONA **	49	56	41	39	0	80
DEHIDROEPIANDROSTERONA *	49	56	35	38	0	73
ANDROSTERONA ***	49	56	28	26	0	54
5α-DIHIRO-TESTOSTERONA ***	49	56	32	35	0	67
3β, 5α-ANDROSTANDIOL ***	49	56	36	34	0	70
Control	49	56	16	18	0	34

Tabla 5. Andr6genos aromatizables* y no aromatizables** ensayados en las g6nadas de *X. laevis*. Ninguno de los andr6genos aromatizables y no aromantizables, influy6 en la diferenciaci6n sexual de la g6nada.

LARVAS DE *Xenopus laevis* TRATADAS CON INHIBIDORES DE AROMATASAS *

D O S I S	1 . 4 . 9 (11) Androstatrien 3 . 17 Diona			1 . 4 . 9 (11) Androstatrien 3 . 17 Diona		
	O V A R I O S	T E S T I C U L O S	O V O T E S T I S	O V A R I O S	T E S T I C U L O S	O V O T E S T I S
100 µg	15	18	7	12	19	8
200 µg	9	22	12	21	27	8
400 µg	7	25	17	10	23	16
600 µg	5	29	20	16	32	14
control	16	14	0	15	17	0

* TRATAMIENTO DE LA ETAPA 49 A LA 56

Tabla 6. Larvas de *Xenopus laevis* tratadas con inhibidores de aromatasas de la etapa 49 a la 56. El número de ovarios disminuye al aumentar la dosis y el de ovotestis se incrementa con el inhibidor 1,4,9,(11) androstatrien - 3, 17 diona. Con el otro inhibidor el efecto no es tan claro ni tan marcado.

utilizados. Ninguna de las dosis ensayadas del inhibidor 1,4,9 (11) androstatrien - 3, 17 diona revirtió el sexo gonadal de las larvas en un 100%. Con todas las dosis empleadas se encontraron ovarios testículos y ovotestis (Tabla 6). El número de ovotestis pareció aumentar conforme se incrementó la dosis empleada y el de ovarios disminuyó. Los resultados obtenidos con el inhibidor 1,4,6 (11) androstatrien- 3. 17 diona son semejantes a los encontrados con el otro inhibidor. Sin embargo, no se observó una disminución tan marcada en el número de ovarios comparada con el otro (Tabla 6) ni una relación tan clara con la dosis. Para ambos tratamientos se aplicó la prueba estadística de Sperman, pero la sólo fué significativa para el inhibidor 1,4,6(11) androstatrien- 3,17 diona con una $p < 0.001$. Con el otro inhibidor las diferencias encontradas no fueron significativas.

3.- Bioquímica de esteroides

Histoquímica

La actividad de la 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa fué localizada en los cortes a través de un precipitado denso que es el diformazán, el cual se forma debido a una reacción de oxidoreducción entre el colorante NBT (Nitro Blue Tetrazolium) y el aceptor de hidrogenos NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) (Fig. 28).

La observación de los cortes al microscopio óptico muestra los siguientes resultados. En cada una de las etapas de desarrollo estudiadas: Formación de la cresta genital (49), gónada

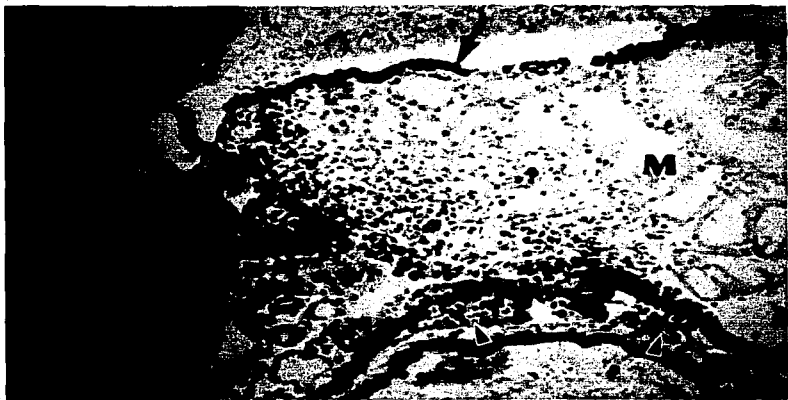


Fig. 24. Corte transversal de la región urogenital de las larvas de X. laevis de la etapa 56. La actividad de la enzima se observó en la glándula interrenal (GI) ubicada en la región medial del mesonefros (M); el precipitado está ausente en las gónadas (➤). Bordeando al complejo urogenital normalmente se encuentran pigmentos (flechas). 336 X

Fig. 25. Corte transversal de la región urogenital de una larva de X. laevis de la etapa 56. Control de la actividad enzimática, note la ausencia del precipitado en la región correspondiente a la glándula interrenal (GI). 336 X

ACTIVIDAD DE LA Δ^4 - 3β HSD EN LAS LARVAS DE
Xenopus laevis

	17 α hidroipregnenolona	Pregnenolona	Dehidroepiandrosterona
GONADA INDIFFERENCIADA 49-55*	-	-	-
OVARIO 56-66*	-	-	-
TESTICULO 56-66*	-	-	-
GLANDULA INTERRENAL 49-66*	\pm	+	++

SÍMBOLOS: REACCIÓN FUERTE ++, MODERADA +, DEBIL \pm , NEGATIVO -
HSD = HIDROXISTEROIDE DESHIDROGENASA
* ETAPA EN LA QUE SE ESTUDIARON LAS LARVAS

Fig. 26. Tabla que resume los experimentos de histoquímica realizados en las larvas de *X. laevis*. Se muestran las diferencias en el depósito de formazán en la glándula interrenal con los diferentes sustratos empleados. La actividad enzimática no se detectó en la gónada.

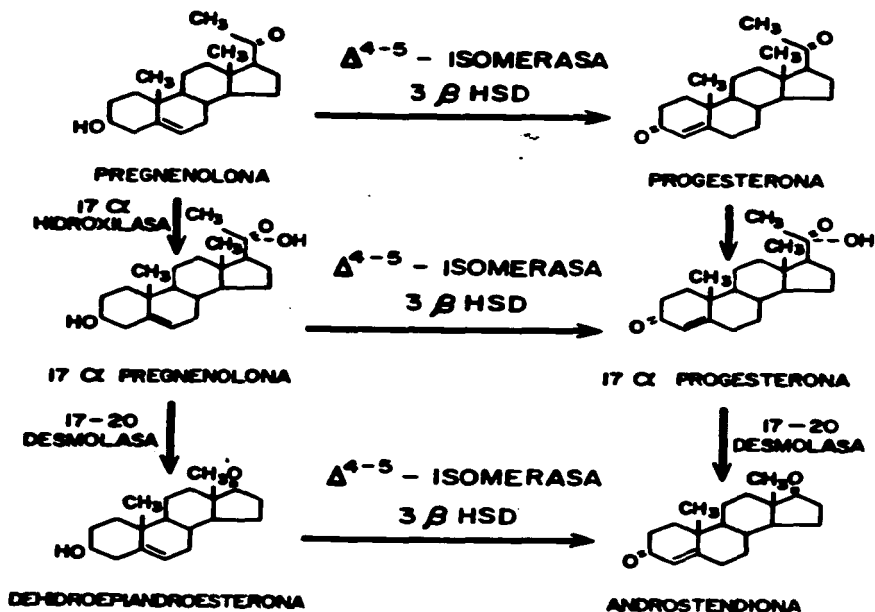


Fig. 27. Se muestran las hormonas esteroides que se utilizaron como sustrato para la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa.

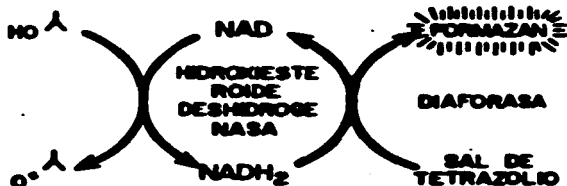


Fig. 28. Esquema que muestra el mecanismo a través del cual se detecta la actividad de la enzima. El hidrógeno de la hormona es captado por el NAD y finalmente transferido a la sal de tetrazolio.

indiferenciada (54-55), ovarios y testículos (56) unicamente se encontró actividad en la glándula interrenal. En X. laevis ésta se encuentra diseminada entre los túbulos del tejido mesonéfrico. La gónada fué negativa en todas las etapas estudiadas (Fig. 24).

En el presente estudio no se encontraron diferencias cualitativas evidentes a la actividad de la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa entre las larvas de X. laevis normales y las tratadas con hormonas esteroides como el benzoato de estradiol, tamoxifen (antiestrógeno) y los inhibidores de aromatasas. La actividad de la enzima en los tratamientos citados anteriormente, también sólo se detectó en la glándula interrenal y la gónada fué negativa (Fig. 24). Los resultados obtenidos con otros sustratos como pregnenolona y 17α hidroxipregnenolona (Fig. 27), utilizados para evaluar la actividad de la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa son semejantes a los expuestos anteriormente, sólo se encontró positividad en la glándula interrenal y la gónada fué negativa. Sin embargo, encontramos diferencias en el depósito de formazán en la glándula interrenal con los tres sustratos empleados. La reacción fué mas intensa con la dehidroepiandrosterona, moderada con la pregnenolona y más débil con la 17α pregnenolona (Fig. 26).

Metabolismo

Los resultados obtenidos sobre el metabolismo de esteroides son los siguientes. El estudio muestra que la región urogenital

(membranosa y gónada) de las larvas de X. laevis en las etapas iniciales de su desarrollo, formación de la cresta genital y etapa de gónada indiferenciada ya; posee la maquinaria enzimática necesaria para biotransformar un precursor radiactivo como la testosterona. Durante el formación de la cresta genital (etapa 49) se demostraron los siguientes metabolitos: 17β estradiol, 5α dihidrotestosterona, androstendiona y androstandiol 3β , 17β (tabla. 7). La temprana capacidad de aromatización presente en la zona urogenital de las larvas de X. laevis se manifestó por la síntesis del 17β estradiol desde esta etapa inicial. A partir de este metabolito se deduce la participación de las aromatasas (enzimas que actúan en el anillo "A" de algunas hormonas esteroideas e intervienen en la conversión de andrógenos a estrógenos). Así mismo, se demostró la actividad de enzimas como la 17β oxidoreductasa, la 5α y la 3α reductasa por la presencia de la androstendiona, androstandiol y la dihidrotestosterona. En la etapa 54 de gónada indiferenciada se encontraron también el 17β estradiol, androstendiona y 5α dihidrotestosterona (tabla, 8). Sin embargo, no se mantuvo la actividad específica del androstandiol en esta etapa en particular. Se encontraron trazas de estrona de las dos etapas estudiadas, pero ésta no mantuvo su actividad específica por más de cuatro cristalizaciones sucesivas, quizá debido a que esta produciéndose en cantidades muy pequeñas a partir de la androstendiona. La actividad específica de cada uno de los metabolitos obtenidos en las dos etapas estudiadas se resume en las tablas 7 y 8. Se propone la siguiente vía

metabólica para integrar cada uno de los metabolitos demostrados (Fig. 29).

Receptor a hormonas sexuales

No se pudo detectar la presencia del receptor a estrógenos en el hígado, región urogenital y cerebro de las larvas de X. laevis en las larvas normales y tratadas con benzoato de estradiol; en ninguna de las etapas estudiadas (Fig. 30). Tampoco se logró demostrar la presencia del receptor a andrógenos en los dos últimos tejidos citados anteriormente.

METABOLISMO DE ESTEROIDES ETAPA 49 DE GONADA INDIFERENCIADA
Xenopus laevis

METABOLITO	CRISTALES dpm - ³H / mg	AGUAS MADRES dpm - ³H / mg
17 β Estradiol	227 202 209	241 246 202
Androstendione	188 188 195	220 231 204
Androstendiol	178 187 158	178 193 178
5 α Dihidrotestosterona	72 79 83	67 90 90

Tabla 7. Pureza radioquímica de los metabolitos aislados en la etapa 49, después de la incubación in vitro con testosterona H-1 ,2,6,7.

METABOLISMO DE ESTEROIDES ETAPA 54 DE GONADA INDIFERENCIADA

Xenopus laevis

METABOLITO	CRISTALES		AGUAS MADRES	
	dpm ³	H/mg	dpm ³	H/mg
17 β Estradiol	478		459	
	805		800	
	498		842	
Androstendione	440		492	
	417		421	
	399		451	
5 α Dihidrotestosterona	193		170	
	213		195	
	166		194	

Tabla 8. Pureza radioquímica de los metabolitos aislados en la etapa 54, después de la incubación in vitro con testosterona H-1,2,6.7.

METABOLISMO DE ESTEROIDES EN LA REGION UROGENITAL DE LAS LARVAS DE *Xenopus laevis*

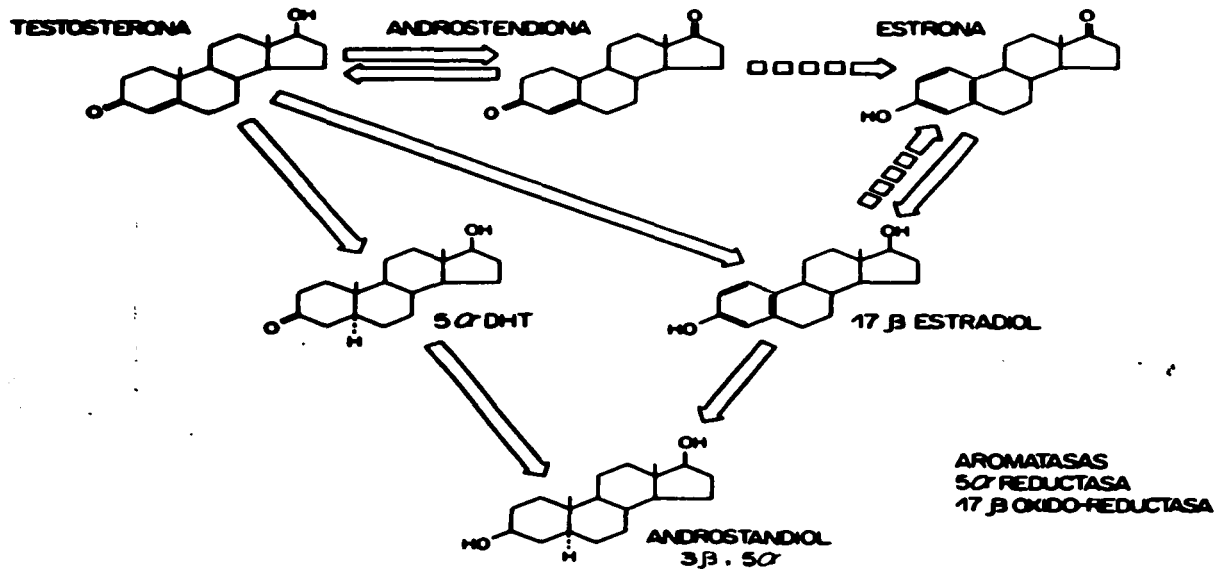


Fig. 29 . Via metabólica demostrada en la región urogenital de las larvas del anfibio *X. laevis*, la flecha punteada indica la posible formación de estrona.

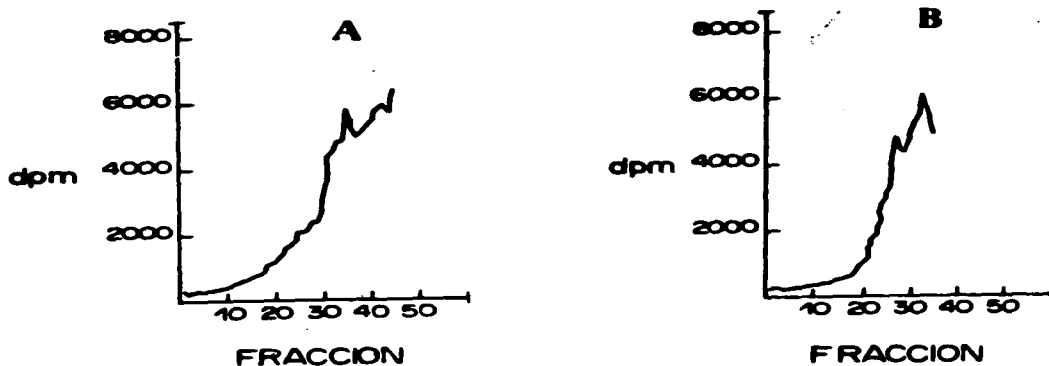


Fig. 30 Perfiles de sedimentación del receptor a estrógenos en gradientes lineales de sacarosa de las larvas de *X. laevis*, tratadas con benzoato de estradiol a partir de la etapa 49 y sacrificadas en la 56. A.- Complejo urogenital, B.- Hígado. En el eje de las abscisas se observa el número de fracciones de citosol y en el de las ordenadas las desintegraciones por minuto. No se identificó una área que correspondiera al complejo estrógeno-receptor en estos tejidos.

VI.- DISCUSION

La diferenciación sexual de la gónada, ocurre en la etapa embrionaria. Con este proceso se inicia la primera fase del programa de diferenciación sexual fenotípica de un organismo. El origen embrionario de las células somáticas que forman la gónada de la mayoría de los vertebrados sigue siendo tema de controversia en la actualidad. Vanini (1951) propuso que las células somáticas derivaban de un tejido cercano al mesonefros al cual denominó "blastema interrenal". Este autor sugirió que estas células migran hacia la gónada desde esta región a través del mesoperitoneo.

En X. laevis encontramos que el único tejido diferenciado desde etapas muy tempranas antes de que se forme la médula de la gónada, es la glándula interrenal. En este estudio no se observó ningún parecido ultraestructural de las células de la médula con los otros tipos celulares presentes en la región que correspondería al "blastema interrenal" propuesto por Vanini (1951).

Witschi (1963) planteó otra hipótesis para explicar el origen embriológico de las células medulares, sostuvo que la gónada indiferenciada estaba formada de dos territorios: La médula y la corteza. La primera se forma por células provenientes del blastema mesonefrico y la segunda a partir del epitelio celómico, planteando de esta manera un origen diferente para cada uno de los compartimentos epiteliales que forman la gónada.

Nosotros cuestionamos la participación del mesonefros en la

formación de la médula de la gónada de modo que en este estudio se compararon ultraestructuralmente las células del epitelio celómico con las del llamado blastema mesonéfrico. En ninguna etapa encontramos semejanza ultraestructural entre las células de esta región topográfica y las de la médula gonadal. Sin embargo, observamos una similitud en la ultraestructura entre las células medulares y las del epitelio celómico, en cada una de las etapas estudiadas. Tampoco se detectó ninguna célula migrando de la región del mesonefros hacia la gónada, lo cual apoyaría morfológicamente la hipótesis de que el mesonefros no participa en la morfogénesis de este órgano.

Las observaciones obtenidos en el presente estudio están en discordancia con las realizadas por otros investigadores (Gropp y Ohnno, 1966; Zamboni y col., 1979; Byscov, 1981; Uphaday y col., 1981). Estos autores sostienen que algunas células derivadas del mesonefros contribuyen a la formación de la gónada. Postulan que las células epiteliales de los cordones sexuales, provienen del epitelio de túbulo mesonéfrico. Esta proposición está basada únicamente en observaciones morfológicas aunque son necesarias más evidencias experimentales para apoyar o refutar esta hipótesis.

Un hallazgo morfológico importante que apoya el origen común para las células de la médula y la corteza, es el depósito de una lámina basal que contribuye a separar compartimentos epiteliales diferentes y que se encuentra bordeando normalmente al epitelio celómico. Esta se interrumpe cuando aparecen las

primeras células que forman la médula de la gónada. La formación tardía de una lámina basal que separa las células de médula en la zona cercana al mesonefros y la actividad mitótica observada en las células que forman la médula sugieren que el crecimiento de ésta es debido a una proliferación de células que se originan en el epitelio celómico. Durante el desarrollo de la gónada en etapas más tardías como la fase final del establecimiento de la gónada indiferenciada, frecuentemente se encuentran así puntos de contacto (puentes celulares) entre la región externa de la gónada y la central denominada médula, lo cual plantea un origen común para estos dos compartimentos epiteliales. En el presente estudio con base en las observaciones morfológicas realizadas, refutamos la hipótesis de la participación del mesonefros en la morfogénesis gonadal temprana.

La hipótesis del origen embriológico dual de la gónada, esta basada en observaciones hechas en material incluido en parafina, lo cual fué una limitante para la interpretación de los resultados obtenidos. Con esta técnica no se preserva bien la ultraestructura de las células y además se extrae mucho material. Esto hace imposible a este nivel tratar de encontrar diferencias en la ultraestructura de cada tipo celular. Si se toma en cuenta lo planteado anteriormente y debido al arreglo topográfico, así como a las características de tinción de las células del blastema mesonefrico, éstas podrían haber sido confundidas con algunas células de la médula (Witschi, 1956).

Por otra parte, en la literatura hay informes de evidencias experimentales, las cuales demuestran que el mesonefros no interviene en la morfogénesis de la gónada de los vertebrados. Merchant y col., (1984) provocaron una agenesia unilateral del mesonefros en embriones de pollo y encontraron que éste no parece contribuir con células a la formación de la gónada, y que la morfogénesis de este órgano se lleva a cabo a pesar de la ausencia del mesonefros. Ellos observaron en los embriones operados cada una de las etapas de desarrollo de la gónada presentes en los embriones normales. Con estos estudios experimentales ellos reforzaron la hipótesis de que el mesonefros no participa en la morfogénesis gónadal.

Un argumento fuerte en favor de esta hipótesis es el hecho de que el mesonefros es un órgano que se diferencia mucho antes de que ocurra la formación de la gónada indiferenciada y la diferenciación sexual de la misma. Si se toma en cuenta este planteamiento las células del mesonefros con una función excretora tendrían que desdiferenciarse morfológica y funcionalmente para contribuir a la formación de un órgano con una función diferente. Este fenómeno normalmente no ocurre en la naturaleza una vez que ya se han diferenciado las células, puesto que esto iría en contra del principio general de economía biológica.

Existen también evidencias de experimentos hechos en los anuros los cuales sugieren que la gónada es capaz de desarrollarse independientemente del mesonefros. Humphrey (1933) extirpó unilateralmente el mesoderma intermediario de R.

ylvatica en la región que da origen al mesonefros. El observó que los cordones sexuales que se ha propuesto se originan del blastema mesonéfrico, se desarrollan en el lado operado a pesar de la ausencia de túbulos mesonéfricos.

Se ha propuesto, con base en observaciones morfológicas de que la gónada embrionaria se forma por la proliferación del epitelio celómico como del mesénquima embrionario, este último proviene de la región mesonéfrica y contribuye de manera importante en la diferenciación sexual de la gónada (Brambell 1927; Merchant-Larios 1978; 1979 y Pelliniemi, 1976). En el presente estudio el mesénquima embrionario parece participar activamente en la formación de la gónada de X. laevis, este contribuye a separar a la médula de la corteza. Es conveniente aclarar que éste invade la gónada en la fase final del establecimiento de la gónada indiferenciada, una vez que ya se han formado los dos compartimentos epiteliales que forman la gónada indiferenciada, (la médula y la corteza), no antes.

Nuestras observaciones apoyan la hipótesis de que la morfogénesis temprana de la gónada (formación de la médula y la corteza) de X. laevis se realiza por la proliferación del epitelio celómico. Sin embargo, el mesénquima embrionario también participa en la formación tardía de la gónada. Estas observaciones implican que el establecimiento de la gónada indiferenciada y su posterior diferenciación no difiere mucho de lo que ocurre en otros vertebrados (Merchant-Larios 1978; 1979).

HISTOQUIMICA

La información sobre la temprana presencia de enzimas claves en la esteroidogénesis normal de la gónada de los anfibios ha sido determinada con la ayuda de técnicas histoquímicas realizadas en cortes histológicos (Levy y col., 1959). Una de las enzimas que más se ha estudiado es la 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β HSD), la actividad de ésta se manifiesta a través de un proceso de oxido-reducción, el cual es dependiente del (NAD) nicotinamide adenine dinucleotido en su forma oxidada. El resultado de esta reacción es un precipitado morado insoluble llamado "formazan", cuyo depósito nos permite localizar el tejido esteroidogénico. Esta técnica nos proporciona una información de tipo cualitativo no cuantitativo. De tal manera que la reacción enzimática puede ser clasificada de acuerdo a un mayor o menor depósito de formazán. En el presente estudio nosotros utilizamos este criterio para evaluar la actividad de esta enzima.

La actividad de la 3β HSD se ha estudiado en las larvas de X. laevis, en el complejo urogenital (mesonefros y gónada) en la etapa indiferenciada, y en los ovarios y testículos. En cada una de éstas el único tejido esteroidogénico detectado es la glándula interrenal Rapola, 1963; Bruer y col., 1966; Rao y col., 1968.

Los resultados obtenidos por Rapola, 1963; Breuer y col., 1966; Rao y col., 1968, son similares a los observados en el presente trabajo. En todas las etapas estudiadas durante el desarrollo larvario de X. laevis, el único tejido

esteroidogénico es la glándula interrenal. Sin embargo, la gónada no muestra actividad enzimática. Este hecho sugiere que probablemente la producción de hormonas esteroides en la etapa embrionaria es suministrada por esta glándula. El hecho de que la gónada sea negativa a la actividad de enzima, no excluye la posibilidad de que en ella se encuentren presentes otro tipo de enzimas que no son detectadas con esta técnica y que intervienen en la biosíntesis de hormonas esteroides sexuales.

En otros anfibios como P. waltlii se ha demostrado la presencia de la 3β HSD en la médula de la gónada indiferenciada. En esta misma especie la enzima se encuentra en las células foliculares una vez que se ha diferenciado el ovario. En el testículo la enzima está ausente en la etapa larvaria, y sólo se detecta en las gónadas de adultos jóvenes en el tejido intersticial (Collenot y Collenot, 1977).

La presencia de esta enzima varía durante el desarrollo embrionario en cada uno de los tejidos que posee capacidad esteroidogénica. En X. laevis no hay actividad de la 3β HSD en los ovarios y testículos en la etapa embrionaria. La actividad enzimática en estos órganos se ha reportado que se manifiesta hasta después de que ocurre la metamorfosis (Chieffi y Botte 1963; Pesonen y Rapola, 1962).

Zarmoska y col., (1972) demostraron la actividad de la 3β HSD en las gónadas postmetamórficas de X. laevis. Ellos utilizaron diferentes sustratos para la enzima como la pregnenolona y la dehidroepiandrosterona. La actividad de la enzima se manifiesta de manera diferencial en las hembras y en

los machos. En éstos últimos observaron que el depósito de formazán es mayor con la dehidroepiandrosterona que con la pregnenolona y se localizó en el tejido intersticial en el testículo. En el caso de la hembra encontraron actividad con los dos sustratos empleados en los ovocitos en crecimiento y maduros, pero no detectaron actividad de la enzima en las células foliculares.

La 3β hidroxisteroide deshidrogenasa participa durante la esteroidogénesis normal en tres pasos importantes. En la conversión de 17α hidroxipregnenolona a 17α hidroxiprogesterona, de pregnenolona a progesterona y de dehidroepiandrosterona a androstendiona. La mayoría de los estudios hechos para ubicar al tejido esteroidogénico en la gónada larvaria de X. laevis han usado como sustrato a la dehidroepiandrosterona (Rapola, 1963; Breuer y col., 1966; Rao y col., 1968). En el presente trabajo empleamos como sustratos la dehidroepiandrosterona, pregnenolona y la 17α hidroxipregnenolona. Nosotros observamos diferencias en el depósito de formazán en la glándula interrenal con cada uno de éstos.

Las diferencias encontradas en la localización del tejido esteroidogénico en las larvas y adultos de X.laevis sugieren que los genes que controlan la expresión de las enzimas que intervienen en la biosíntesis de hormonas esteroideas, parecen encenderse y apagarse en diferentes tejidos durante el ciclo vital de este anfibio.

Cravioto y col., (1986) propusieron la existencia de dos

isoenzimas de la 3β hidroxiesteroide deshidrogenasa una que participa en la deshidrogenación de los esteroides con 21 carbonos y otra en los de 19. Las diferencias de tipo cualitativo detectadas con cada uno de los sustratos sugiere que quizá esto se debe a la existencia de dos isoenzimas diferentes que están presentes en la glándula interrenal de X. laevis desde etapas muy tempranas.

Hsu y col., (1978) reportaron que la síntesis y actividad de esta enzima disminuye en la glándula interrenal y en la gónada de las larvas de R. catesbeiana tratadas con benzoato de estradiol. Los resultados obtenidos por estos autores difieren de los observados en nuestro estudio en el cual los grupos de larvas de X. laevis, sometidas a diversos tratamientos hormonales como (estrógenos, antiestrógenos e inhibidores de aromatasas) no parecen haber afectado la actividad de la enzima. Nosotros no observamos diferencias en el depósito de formazán entre los animales tratados y los normales.

En otras especies se ha demostrado que la actividad de la 3β y 17β HSD es simultánea y se encuentra presente en la glándula interrenal y en pequeñas cantidades en la gónada indiferenciada en larvas de R. catesbeiana. La actividad de la 3β HSD se localizó en el citoplasma de ovocitos en crecimiento y en las células foliculares (Hsu y col., 1978). En X. laevis no detectamos la actividad de la 3β HSD a en la gónada larvaria, tampoco encontramos positividad a esta enzima en los ovocitos en crecimiento con ninguno de los sustratos que empleamos. Cabe aclarar que en este estudio no realizamos histoquímica para

detectar enzimas como la 17 B hidroxisteroide deshidrogenasa.

Metabolismo de esteroides

El metabolismo de la testosterona, 17 β estradiol y dehidroepiandrosterona, se ha investigado en larvas de X. laevis sexualmente homogéneas (100% machos y 100% hembras) antes de que se lleve a cabo la diferenciación sexual de la gónada. Se observó que existen diferencias en la capacidad de metabolizar las hormonas esteroides en los dos sexos. Los machos oxidan el 17 β estradiol a estrona, en un porcentaje mayor que las hembras. Por otra parte las hembras oxidan la testosterona a dehidroepiandrosterona en mayor cantidad que los machos. Sin embargo, no se reportaron diferencias en el metabolismo de la dehidroepiandrosterona en ambos sexos (Breuer y col., 1966).

En el presente trabajo estudiamos la biosíntesis de hormonas esteroides durante dos fases críticas del desarrollo embrionario de la gónada de X. laevis: formación de la cresta genital y etapa de gónada indiferenciada. Es conveniente aclarar que en la presente investigación no trabajamos con poblaciones sexualmente homogéneas (100 % machos y 100 % hembras) Sin embargo, corroboramos que la gónada larvaria de X. laevis, en las etapas iniciales de su formación, tiene la capacidad de sintetizar andrógenos y estrógenos.

Las observaciones realizadas en este estudio muestran que la síntesis de esteroides en poblaciones heterogéneas (machos y hembras potenciales) de las larvas de X. laevis no difieren de los resultados obtenidos en las poblaciones homogéneas. Estos

estudios apoyan la idea de que las hembras y los machos poseen las enzimas necesarias para metabolizar los andrógenos y estrógenos (Breuer y col., 1966; Rao y col., 1968, 1969).

Las poblaciones masculinas y femeninas de larvas de X. laevis, de 17 días de edad son capaces de convertir el 17β estradiol a estrona y tres metabolitos adicionales como estríol, 6α hidroxiestrona y 15α hidroxiestrona (Rao y col., 1968). En nuestro estudio encontramos 17β estradiol y trazas de estrona, pero no consideramos la posibilidad de demostrar la presencia de algunos otros derivados de los estrógenos.

Rao y col., (1969) reportaron que las larvas de X. laevis sintetizan androstendiona y testosterona. Estas observaciones fueron corroboradas en el presente estudio. Sin embargo, Rao y col., 1968 no reportaron la presencia de compuestos reducidos como la 5α dihidrotestosterona y el 3β , 5α - androstandiol encontrados por nosotros. En nuestro estudio demostramos además que la testosterona puede actuar como un precursor en la biosíntesis de otros andrógenos testiculares, como la 5α dihidrotestosterona y el 3β , 5α - androstandiol. Este último parece que es sintetizado sólo en la etapa 49, mientras que en la etapa 54 esta ausente. Esto se debe probablemente a que es producido en cantidades tan pequeñas, que no mantiene una actividad específica constante por más de tres cristalizaciones sucesivas. Nuestros resultados difieren de los obtenidos por otros autores en los cuales no detectaron la 5α dihidrotestosterona y el 3β 5α - androstandiol en las larvas de X. laevis (Rao y col., 1968, 1969; Breuer y col., 1966). Sin

embargo, se ha visto que el androstandiol esta presente en las gónadas de individuos adultos de R. catesbeiana y D. pictus (Ozon y Stocker 1974).

Por otra parte el estudio histoquímico sugiere que el único tejido esteroideogénico en la vida larvaria de X. laevis es glándula interrenal. Se plantea la posibilidad de que exista una cooperación entre esta glándula y la gónada. De manera que los andrógenos se formarían en la glándula interrenal y después serían transferidos a la gónada. La cual tendría el sistema enzimático (aromatasa) que transformarían los andrógenos hacia estrógenos.

Aunque en el presente estudio no exploramos el metabolismo de los corticoesteroides, se sabe que el cortisol y el oxo cortisol son producidos en la glándula interrenal de los adultos de X. laevis (Pesonen y Rapola, 1962).

Nuestras observaciones apoyan la hipótesis de que la vía metabólica en la región urogenital de las larvas de X. laevis es semejante a la demostrada en los embriones de mamíferos (Lippset y Tullner, 1965; Acevedo y col., 1973; Millewich y Wilson, 1977, George y Wilson, 1979). Estos autores demostraron la temprana capacidad de la gónada embrionaria de sintetizar andrógenos (testosterona, androstendiona y dihidrotestosterona) y estrógenos como el 17 β estradiol.

Bioquímica del receptor

Westley y Knowland (1978) cuantificaron los receptores a

estradiol en los hepatocitos de machos adultos de X. laevis. Encontraron que estas células contienen 92 ± 18 sitios de enlace en el citosol y 99 ± 19 en el núcleo. Este número es muy pequeño, de 50 a 100 veces menor comparado con el número de receptores presentes en los tejidos y órganos blanco de los mamíferos.

En el presente estudio y bajo las condiciones experimentales empleadas no fué posible demostrar la presencia de receptores a estrógenos en el citosol de las células de la región urogenital y cerebro de las larvas de X. laevis. Aunque no se excluye la posibilidad de que los receptores se encuentren en muy baja concentración en el tejido estudiado.

La proteína receptora es una molécula que se degrada fácilmente por las condiciones de manipulación en el laboratorio. Sin embargo, se sabe que el receptor se estabiliza en presencia de molibdato de sodio (Madhok y col., 1987). En este trabajo utilizamos este compuesto en el amortiguador para homogenar el tejido, así como la aprotinina (inhibidor de proteasas), lo cual descarta la posibilidad de que la proteína receptora se hubiera degradado.

Por otra parte el complejo hormona receptor ha sido analizado por gradientes de sucrosa, lo cual requiere normalmente de tiempos largos de centrifugación para que sedimente. Esto aparentemente reduce su vida media ya que éste se disocia fácilmente durante la centrifugación. La vida media del complejo en X. laevis, se ha demostrado que es de 210 minutos en el adulto a 4 °C (Westley y Knowland, 1978). Este lapso es diez veces menor que el establecido para el receptor en el útero de

rata a la misma temperatura (Gorski y col., 1986). Para detectar el receptor a estrógenos en el citosol, en el presente estudio empleamos gradientes de sacarosa y centrifugamos durante 120 min. Cabe entonces considerar la posibilidad de que la vida media del complejo en el tejido embrionario sea menor y éste se halla disociado en este paso particular de la técnica empleada y por eso no pudimos detectarlo.

Gorski y col., (1986) plantearon que la localización del receptor a estrógenos en algunas especies varía de un tejido a otro. Las diferencias en la detección pueden ser explicadas por la presencia de diferentes formas alostéricas del receptor o porque este hubiera sufrido alguna modificación. Esto plantea la posibilidad de que la proteína receptora presente en las vida larvaria de X. laevis pudiera ser alostericamente diferente o haber experimentado algún cambio durante la manipulación.

Una hipótesis alternativa a esta para explicar la ausencia del receptor puede ser, que la síntesis de éste estuviera siendo regulada por la pequeña cantidad de hormonas esteroides que empiezan a producirse en estas etapas tempranas en la gónada. De tal manera que la baja producción de éstas induciría una síntesis baja de los receptores, los cuales no estuvieron presentes en una concentración suficientemente alta como para poder detectarlos, planteando una limitación en la sensibilidad de la técnica empleada.

Westley y Knowland (1978) reportaron que en los adultos de X. laevis la concentración del receptor a estrógenos se incrementa cuando son tratados con estradiol exógeno. Estas observaciones

están en desacuerdo con nuestros resultados, ya que nosotros tampoco pudimos detectar el receptor citosólico a estrógenos en las larvas de X. laevis tratadas con benzoato de estradiol. Una posible explicación es que en nuestras condiciones los receptores ocupados por la hormona podrían haber sido translocados al compartimento nuclear.

Se ha discutido que la detección del receptor citoplásmico para estrógenos pudiera ser debido a un artefacto del amortiguador empleado para homogenizar el tejido. Durante este proceso los receptores podrían ser extraídos del compartimento nuclear, lo cual condicionaría la presencia de éstos en esta fracción en particular (Pietras y Szego 1977).

Por otra parte se ha cuestionado la presencia de un receptor citoplásmico para estrógenos. Aparentemente el receptor libre no es una proteína citoplásmica, sino de naturaleza nuclear. Esta proposición se basa en estudios realizados empleando anticuerpos monoclonales contra el receptor a estrógenos en cultivos celulares y en cortes del tracto reproductivo (Bergovitz y col., 1985).

Gorski y col., (1986) proponen que en el caso de los receptores nucleares los diferentes ambientes que rodean a los núcleos en cada tipo celular, les proporciona propiedades específicas, lo cual condicionaría que pudieran ser o no detectados. Quizá este pudiera ser otra razón que explicaría nuestra incapacidad para detectar los receptores citoplásmicos de X. laevis.

El receptor a estrógenos no parece ser un requisito necesario

para que se manifieste un efecto biológico desencadenado por estrógenos. Sumida y col., 1988) observaron que el estradiol influye en la proliferación de los cultivos de células del útero fetal de cobayos. Las concentraciones del receptor a estrógenos en estos cultivos fueron muy bajas o no detectables. Sin embargo, encontraron que el estradiol en presencia de insulina y de factores de crecimiento epidurales sinergiza con esta hormona e induce la síntesis de receptores a progesterona. Esto sugiere que la acción biológica del estradiol puede ser amplificada por factores metabólicos inducidos por la insulina y por factores de crecimiento, independiente de la presencia del receptor.

En nuestro estudio observamos un efecto biológico de los estrógenos en las larvas de X. laevis al causar la reversión sexual de todos los machos genéticos a hembras fenotípicas, pero no pudimos detectar el receptor a estradiol. Quizá esta respuesta biológica sea mediada a otro nivel, como el sistema nervioso y el estradiol induce la síntesis o secreción de un factor (es) neural(es) que determinan la diferenciación sexual de la gónada. Es posible que el estradiol en el cerebro sea hidroxilado en el anillo A por la 2 estrógeno hidroxilasa y de esta manera sea convertido a catocolestrógenos. Etchegoyen y col., (1986) demostraron la unión de los catecolestrógenos en las membranas de hipotálamo de cuyo: este sitio receptor parece ser diferente de los receptores adrenérgicos y dopaminérgicos.

Una de las críticas que se puede hacer al presente trabajo es que en éste únicamente intentamos localizar el receptor a

estrógenos en el citosol y no en la fracción nuclear que es el lugar donde se ha ubicado bioquímicamente a esta proteína (Auriccio y col., 1980; Callard y Mak, 1985), limitando de esta manera la información en la búsqueda del receptor.

Existen ejemplos en la naturaleza como en el escualo Acanthias acanthias que plantean que los receptores permanecen unidos al núcleo durante el proceso de homogenización, a pesar de haber empleado concentraciones elevadas de sal para extraerlos (Callard y Mak, 1985). El complejo nuclear en el anfibio X. laevis posee un coeficiente de sedimentación de 3.5 S. Este valor fué determinado utilizando gradientes de estradiol tritiado y es diferente del reportado en el útero de rata (Puca, y col., 1971) y en el hígado del anfibio D. pictus (Ozon y Belle, 1973). Esto abre la posibilidad también de que el receptor citósolico en la región urogenital de las larvas de X. laevis pudiera tener un coeficiente de sedimentación diferente al encontrado en otras especies de vertebrados.

En general es aceptado que los estrógenos difunden pasivamente a través de la membrana plasmática al citoplasma de la células blanco en donde se une al receptor. Existen algunos experimentos, los cuales indican que las hormonas esteroides interactúan con componentes de la membranas de las células blanco (Pietras y Szego 1975; 1977; 1980).

Se demostró que las células aisladas de endometrio, hígado y mucosa intestinal, tienen una alta afinidad a enlazarse a estrógenos inmovilizados a un soporte inerte, la temperatura en este proceso parece ser muy importante. Se ha observado que la

concentración de estrógenos que se acumula normalmente en las células blanco disminuye a baja temperatura. Esto sugiere que las alteraciones en el estado físico cambia la reorientación de varios componentes (macromoléculas) en la membrana lo cual puede contribuir a que haya poca interacción entre los receptores de superficie y los estrógenos (Pietras y Szego, 1977). Sin embargo, la naturaleza y origen de estos receptores y la manera en la cual ellos contribuyen al reconocimiento y regulación de la respuesta biológica deben ser aún establecidos.

En los últimos tres años han aparecido en la literatura una serie de estudios en donde se propone que los esteroides pueden ejercer su efecto biológico a través de un mecanismo no genómico. Kubli (1984) propuso una hipótesis para explicar el papel fisiológico de muchos metabolitos de la testosterona y de la progesterona. El reportó que la acción biológica de algunos esteroides puede ser explicada por medio de un cambio en el potencial de la membrana celular o a través de canales específicos. Es importante mencionar que los conocimientos sobre el mecanismo de acción genómico de las hormonas esteroides es un campo que esta evolucionando y se basa fundamentalmente en modelos. Por lo tanto los mecanismos de acción de las hormonas sexuales deben ser aún establecidos.

ESTEROIDES

La diferenciación sexual de la gónada de los anfibios, se ha demostrado que es susceptible de ser modificado por un factor epigenético de naturaleza hormonal.

Gallien, 1953; Chang y Witschi, 1955, obtuvieron la reversión sexual de la gónada de las larvas de X. laevis tratadas con estradiol y con benzoato de estradiol. Estos autores demostraron que los machos revertidos a hembras fenotípicas, son funcionales al cruzarlos con un macho normal. En el presente trabajo observamos que la única hormona esteroide capaz de revertir en un 100 % el sexo gonadal de las larvas del anfibio X. laevis, fué el benzoato de estradiol. Sin embargo, no logramos hacer que se reprodujera ninguno de los animales revertidos para comprobar los resultados obtenidos por los autores arriba mencionados.

Chang y Witschi (1953) demostraron que los machos genéticos revertidos con estradiol a hembras fenotípicas, pueden regresar a su sexo genético normal, si son tratados con testosterona inmediatamente después de finalizar el tratamiento con estradiol. En el presente trabajo no incluimos en el diseño experimental este tipo de experimento.

En otras especies de anfibios, como R. sylvatica y R. esculenta se ha reportado que hay reversión sexual de la gónada de las larvas tratadas con estrógenos como la estrona y el estriol que tienen una actividad biológica muy débil (Witschi y col ., 1958). Nuestros resultados difieren de los observados por estos autores, puesto que nosotros no logramos revertir completamente el sexo gonadal de las larvas con estos estrógenos.

Chang y Witschi (1953) encontraron que la feminización completa de la gónada de las larvas de X. laevis, se lleva a

cabo en un periodo de tres días. La etapa crítica en la que ésta responde a las hormonas esteroides es la 26 y 27. Ellos observaron que hay intersexualidad en las gónadas de éstos animales, cuando el tratamiento se inicia en la etapa 26. La parte anterior de la gónada, se diferencia como un ovario y la posterior como testículo. Si el tratamiento se prolonga hasta la etapa 27 la parte posterior de la gónada se transforma en ovario. En este estudio, nosotros observamos que el benzoato de estradiol no tiene ningún efecto en la diferenciación sexual de la gónada, si se administra a las larvas en periodos cortos que van de uno a diez días. En nuestros experimentos, el esteroide únicamente induce reversión, cuando las larvas fueron puestas en contacto con la hormona por periodos largos que van de tres a cuatro meses. Este es el tiempo promedio que tardan en llegar a la etapa de la diferenciación sexual de la gónada, desde que se inicia el tratamiento.

Por otra parte, la gónada se revierte, si el benzoato de estradiol es administrada en etapas tempranas de la (49 a la 52). En etapas posteriores la reversión es parcial o nula, lo cual sugiere que el proceso(s) que determinan la diferenciación sexual de la gónada es susceptible de ser modulado por el estradiol, sólo antes de que se lleve a cabo otro evento que dispare la diferenciación sexual de la gónada.

Con respecto al tratamiento con tamoxifen, se ha informado que los ovarios de embriones de pollo son modificados al administrarles tamoxifen entre al tercero y el séptimo día de desarrollo. La gónada derecha se diferencia como un testículo,

la izquierda muestra una médula con numerosos cordones y el epitelio cortical se reduce a una delgada banda. En los recién nacidos se observa que el epitelio gonadal está presente en la parte media de la gónada y en otras está desprovista del mismo. Estas alteraciones sólo fueron observadas en el 74 % de los individuos tratados (Salzgeber y col., 1976).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que el tamoxifen tiene una actividad antiestrógena muy débil, ya que pocas larvas de X. laevis son afectadas. Además, parece haber respuesta diferencial en los individuos, puesto que con ninguna de las dosis ensayada encontramos 100 % de reversión sexual o de intersexualidad. El tamoxifen en los anfibios es muy tóxico parece afectar el metabolismo general a diferencia de lo reportado en los embriones de aves que parecen tolerar más este compuesto (Scheib y col., 1981; Salzgeber y col., 1976).

Gallien (1956), Witschi (1956) y Foote y Foote (1941) realizaron experimentos con el andrógeno metiltestosterona y observaron que esta hormona no logra revertir a las hembras genéticas de X. laevis. En el presente estudio encontramos que algunos andrógenos capaces de ser transformados a estrógenos por las larvas, no afectan la diferenciación sexual de la gónada, observamos la relación normal 1:1 de machos y hembras presentes en las larvas normales.

Se ha demostrado que el dietilstilbestrol feminiza completamente a los embriones de pollo y codorniz (Shwarzel y col., 1979). Sin embargo, en las larvas de X. laevis encontramos que este compuesto sólo tiene un efecto parcial en

la diferenciación sexual de la gónada.

Witschi (1967) experimentó con esteroides en diferentes especies de anfibios y llegó a la conclusión de que las hormonas esteroides exógenas tenían un efecto teratógeno en la diferenciación sexual normal de la gónada. Es decir, que la hormona destruye uno de los dos territorios (médula o corteza) que forman la gónada en la etapa embrionaria. En nuestro estudio la gónada de los animales tratados con benzoato de estradiol, se desarrolla igual que en los animales normales.

En los tratados no encontramos autofagosomas en las células de la médula, lo cual no apoya la idea de que, la reversión sexual se lleva a cabo por la desaparición teratógena de uno de los dos territorios gonadales. En el presente estudio proponemos que la reversión sexual de la gónada se debe a que el estradiol exógeno inhibe el desarrollo de la médula de los machos genéticos, de tal forma que favorece el desarrollo de la corteza.

Existen datos contradictorios sobre el papel que juegan las hormonas esteroides sexuales en la diferenciación sexual de la gónada de X. laevis. En esta especie el benzoato de estradiol provoca la reversión sexual de la gónada de los machos genéticos a hembras fenotípicas. Mientras que el trasplante de testículos, revierte a las hembras genéticas a machos fenotípicos. Esto sugirió que las sustancias inductoras de la diferenciación sexual normal de la gónada, no son únicamente las hormonas esteroides.

Los estudios de embriología han demostrado que cada individuo

tiene una constitución bisexual. Por consiguiente la unisexualidad que se establece durante el desarrollo ontogénico necesita de la supresión de alguno de los dos sexos (Witschi, 1963). En experimentos posteriores este autor llegó a la conclusión que la diferenciación sexual de la gónada no se debe a la acción de las hormonas esteroides, sino que ocurre por la presencia de sustancias inductoras de origen intragonadal. "La medularina" y la "cortecina", producidas por la médula y la corteza respectivamente (Witschi, 1967). Estas sustancias inductoras aparentemente tienen una doble función. Estimulan la diferenciación de un sexo e inhiben el desarrollo del otro.

La hipótesis propuesta por Witschi fué apoyada por Mintz (1945). Ella sugirió que la reversión sexual de R. clamitans con propionato de testosterona se debe a una destrucción de la corteza. Debido a esto la médula se hipertrofia como un fenómeno compensador. La desaparición del tejido cortical remueve la acción de la cortecina, la cual estimula la diferenciación de la corteza (+) y la cortecina (-) que inhibe el crecimiento medular. De esta manera la médula queda libre para diferenciarse bajo la influencia de sus propias sustancias inductoras.

Por otra parte, (Foote y Foote, 1960) encontraron que los experimentos con esteroides andrógénos y estrógenos administrados a la gónada aislada en cultivo, fueron ineficaces en revertir el sexo gonadal de las larvas de X. laevis. Estos resultados sugirieron que la acción de las hormonas esteroides sexuales no se debe a un efecto localizado en la gónada, sino a

otros factores extragonadales que se encuentran presentes en los individuos completos.

Nuestros estudios apoyan la hipótesis de que las hormonas esteroideas en X. laevis no parecen estar implicadas directamente en la diferenciación sexual de la gónada. Las enzimas que intervienen en la biosíntesis, se manifiestan muy temprano durante el desarrollo ontogénico en la mayoría de los vertebrados. Se ha visto que los embriones de X. laevis poseen la capacidad de metabolizar hormonas esteroideas como progesterona a partir de la etapa de gástrula (Antila y Teravainen, 1974). El hecho de que los esteroideos estén presentes antes de que se lleve a cabo la morfogénesis de la gónada, sugiere que la biosíntesis de hormonas esteroideas es un proceso independiente de la diferenciación sexual de la gónada y no una consecuencia, al menos en esta especie.

La presencia de hormonas esteroideas sexuales en etapas muy tempranas, antes de que exista cualquier sustrato anatómico que las produzca (formación de una glándula), sugiere un papel regulador general del metabolismo. Las hormonas esteroideas posiblemente actúan en la comunicación de célula a célula donde son metabolizadas con diferentes propósitos. En X. laevis, las hormonas esteroideas, intervienen de manera indirecta en la diferenciación sexual de la gónada y quizá actúen como moduladores de la síntesis del inductor(es) primario(s) de la diferenciación sexual de la gónada.

VII.- CONCLUSIONES

1.- Nuestras observaciones morfológicas sugieren que las células de la médula del anfibio X. laevis se originan a partir del epitelio celómico y no del blastema interrenal como había sido propuesto.

2.- El desarrollo y diferenciación sexual de las gónadas de las larvas de X. laevis, revertidas con benzoato de estradiol es semejante al de las larvas normales.

3.- El único tejido esteroidogénico detectable con técnicas histoquímicas durante el desarrollo embrionario de las larvas de X. laevis es la glándula interrenal. Esto no excluye la posibilidad de que la gónada posea las aromatasas, lo cual le permitiría convertir los andrógenos a estrógenos.

4.- El complejo urogenital de las larvas de X. laevis posee la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar andrógenos y estrógenos a partir de testosterona. Nuestro estudio plantea que la vía de biosíntesis en este anfibio es semejante a la demostrada en los embriones de mamíferos.

5.- Las hormonas esteroides sexuales no parecen intervenir de manera directa en la diferenciación sexual de la gónada de X. laevis.

6.- No se pudo demostrar la presencia del receptor a estrógenos en el área urogenital de las larvas de X. laevis. Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que esta proteína se encuentre presente en los tejidos estudiados.

VIII.- APENDICE

Citrato de plomo

Citrato de plomo 0.03 g
 Agua bidestilada10 ml
 NaOH 10 normal0.1 ml

Pesar 0.03 gr de citrato de plomo y disolverlos en 10 ml de agua bidestilada fría (hervida previamente 15 minutos). Agregar 0.1 ml de NaOH 10 normal. Proteger de la luz durante la preparación y guardar en una jeringa cubierta con aluminio a temperatura ambiente.

Azul de Toluidina

Tetraborato de sodio40 g
 Azul de toluidina (o)..... 5 g

Disolver el azul de toluidina en 300 ml de agua destilada, agregar el tetraborato de sodio, disolverlos bien y aforar a un litro. Hervir 15 minutos, filtrarlo una vez que este frío y almacenar en un frasco ámbar.

Formalina Neutra

Formaldehido al 40 %100 ml
 Agua destilada1000 ml
 Fosfato de sodio monobásico.....4 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro....6.56 g

Disolver el fosfato de sodio monobásico y dibásico en 500 ml de agua destilada y agregarle 100 ml de formaldehído al 40 %. Después aforar a un litro con agua destilada. Ajustar el ph a 7 con NaOH 1 N o con HCl 1 N y Almacenar en un frasco ámbar.

Fijador Dialdehídico

Glutaraldehído al 50 %.....6 ml
Paraformaldehído2 g
Dimetil sulfoxido (DMSO)2.5 ml
Amortiguador cacodilato de sodio 0.2 M, ph 7.450 ml
Cloruro de calcio.....0.001 g

Disolver por separado 2 gramos de paraformaldehído en 25 ml de agua destilada previamente hervida. Calentar esta solución a 60 - 70 °C con agitación constante (emplear un agitador magnético). Si no se disuelve ponerle de dos a tres gotas de NaOH 1 N, calentar a la misma temperatura hasta que la solución este transparente y dejar enfriar. Después agregar a los 50 ml del amortiguador cacodilato de sodio, los 25 ml de paraformaldehído que fueron disueltos, 2.5 ml de dimetil sulfoxido, 6 ml de glutaraldehído al 50 % y 0.001 gr de cloruro de calcio. Agitar bien y aforar a 100 ml en un matraz aforado, ajustar el ph a 7.4 en un potenciómetro.

Solución Holfreter para Anfibios

Cloruro de sodio3.5 g
 Cloruro de potasio.....0.05 g
 Cloruro de calcio0.10 g
 Bicarbonato de sodio.....0.02 g

Disolver todas las sales en un litro de agua destilada y almacenar en refrigeración.

Amortiguador Tris-HCl

Hcl 0.2 M....8.27 ml
 Tris hydroxy methyl amino methan 0.2 M.....12.11 g

Preparar una solución de ácido clorhídrico 0.2 M, agregar este a 100 ml de agua destilada y aforar a 500 ml. Por separado disolver el tris en 500 ml de agua destilada. Después se toman 25 ml de la solución de HCl y 19.2 ml de la solución del Tris, ajustar el ph a 7.6.

Preparación de Epon

El epon se prepara a partir de dos mezclas stock denominadas "A" y "B".

Mezcla "A"

DDSA (Dodecenylsuccinic anhydride)..... 81 ml
 Epon 812.....50 ml

Mezcla "B"

NMA (Nadic Metil Anhídrido).....	44 ml
Epon 812.....	50 ml

Mezcla de trabajo

Mezcla A.....	7 ml
Mezcla B.....	3 ml
DMP-30 (dimetil sulfoxido).....	0.15 ml

Fijador Bouin

Solución saturada de ácido picrico.....	75 ml
Formaldehído.....	25 ml
Acido acético glacial	5 ml

Agregar a la solución saturada de ácido picrico, los 25 ml de formaldehído y los 5 ml de ácido acético glacial. Mezclar bien, filtrarlo y almacenar a temperatura ambiente.

Fijador Carnoy

Alcohol absoluto.....	60 ml
Cloroformo.....	30 ml
Acido acético glacial.....	5 ml

Mezclar el alcohol absoluto con el cloroformo y el ácido acético glacial, agitar bien y almacenarlo a temperatura ambiente.

Tetraóxido de osmio

Una cápsula de osmio1 g
 Cacodilato de sodio 0.1 M, ph 7.4.....100 ml

Lavar la cápsula de tetraóxido de osmio con mezcla crómica, después enjuagarla bien con agua de la llave y luego con agua destilada. Tomar ésta con una gaza limpia y rayarla con un lápiz de diamante suavemente. Meterla a un frasco bien limpio, agitar para que se rompa la cápsula y agregarle el amortiguador cacodilato de sodio 0.1 M. Almacenar en un frasco ámbar cubierto con papel aluminio a 4 °C.

Eosina al 1%

Eosina amarilla..... 1g
 Agua destilada100 ml
 Acido acético.....0.1 ml

Disolver la eosina en los 100 ml de agua destilada y ponerle de 5 a 6 gotas de ácido acético.

Hematoxilina de Harris

Hematoxilina.....1 g
 Alumbre de potasio.....20 g
 Oxido de mercurio rojo.....0.5 g
 Alcohol absoluto.....10 ml

Disolver el gramo de hematoxilina en 10 ml de alcohol absoluto y por separado 20 gramos de alumbre de potasio en 200 ml de agua caliente. Después de 24 horas se mezclan ambas soluciones, se le agrega a la mezcla 0.5 gr de oxido de mercurio rojo y se calienta hasta que ebullla. Se deja enfriar y se guarda en un frasco ámbar.

Amortiguador para Homogenar

Tris- Hcl..... 20 mM
 Etilen Diamin tetraceto..... 3 mM
 Ditiotreitol..... 0.5 mM
 Glicerol..... 10 ml
 Aprotinina..... 10000 U.K.
 Molibdato de sodio..... 20 mM

Amortiguador para Gradientes

Tris-Hcl20 mM
 Etilen Diamin tetraceto.....1.5 mM
 Ditiotreitol.....0.25 mM
 Glicerol.....10 ml
 Molibdato de sodio.....10 mM

Se preparó un buffer para gradientes con sacarosa al 5% y otro al 20 %.

IX.- BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, H. F., Axelrod, L. R., Ishikawa, E y Takaki, F. 1963. J. Clin. Endocrinol. Met. 23: 885.
- Allen, B., M. 1904. The embryonic development in the ovary and testes of the mammals. Am. J. Anat. 3:89-135.
- Anttila, E y Teravainen. 1974. Metabolism of exogenous 4-C progesterone during early development in Xenopus laevis. Differentiation. 2:137-141.
- _____. 1977. Early steroid metabolism in Xenopus laevis, Rana temporaria y Iriturus vulgaris embryos. Differentiation. 8:71-77.
- _____. y Saure, E. 1978. Seasonal variation of androgen interconversion in testicular tissue of Rana temporaria in vitro. 35:326-327.
- _____. 1979. Seasonal variation of the androgen interconversion in testicular tissue of Rana temporaria in vitro. Experientia. 35:326-328.
- Arai, R., Shikita, M y Tamaoki, B. 1964. In vitro bioconversion of progesterone 4-C to 17 hydroxyprogesterone and androst-4-ene, 3, 17, dione in testicular tissue of Trilobodon hakonensis Gunther. Gen. Comp. Endocrinol. 6:68-73.
- Auricchio, F., Migliaccio, A Sampaolo y Rotondi, A. 1980. En Perspectives in Steroid Receptors Research. Ed. F. Bresciani. Raven Press, New York. pag 133-142.
- Bacon, L. D. 1970. Immunological tolerance to female wattle isographs in male chick on transplantation. Transplantation. 10:124-126.
- Bergqvist, A., Jeppsson, S y Ljungberg, O. 1985. Histochemical demonstration of estrogen and progesterone binding in endometrial tissue and in uterine endometrium. J. Hist. Cytoch. 32 (2), 155-161.
- Beyer, C., Vidal, N y Mijares, A. 1970. Probable role in the aromatization in the induction of estrous behavior by androgens in the ovariectomized rabbit. Endocrinology. 87:1368-1370.
- Bloch, E. 1967. In vitro steroid synthesis by gonads and adrenals during mammalian fetal development. Proc. 2nd. Int. Cong. 132: 675-679.
- Blood, D. N y Fishman, J. H. 1983. Tamoxifen treatment failure in hormonally responsive breast cancer. Correlation with steroid receptors. Cancer. 51:1190-1194.

Braham, W., Sheeham, D. M., Zeher, D. R., Medlock, K. L., Nelson, C. J y Redlon, E. 1985. Inhibition of the rat uterine gland genesis by tamoxifen. 117:2238-2248.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms cantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Bioch. 72:248-154.

Brambell, F.W. 1927. The development and morphology of the gonads of the mouse. Part I. The morphogenesis of the indifferent gonad and of the ovary. Proc. R. Soc. London. Ser B. 101: 391-409.

Breuer, H., Danh, K., Mikamo, B y Witschi, E. 1966. Differences in the steroid metabolism of male and female larvae of Xenopus laevis. Excerpta. Med. Int. Congr. series III, 215.

Brodie, H. J., Brodie, A. M y Schwarzel, W. C. 1973. Studies on estrogen synthethasa from rat ovary. The Endocrinology Society Fifty fifth Annual Meeting. pag 200.

Brodie, A. M., Wu, J., March, D. A y Brodie, H. J. 1980. Aromatase inhibitors III. Studies on the antifertility effect of -4- acetoxy-4- androstene, 3,17 dione. Biol. Reprod. 18:365-376.

Brodie, H. J. 1980. Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis VIII. The development of inhibitors of the enzyme systems in human placenta. Endocrinology. 92:866-880.

Bruner, J.A y Witschi, E. 1946. Testosterone induced modifications of sex development in female hamsters. Am. J. Anat. 79:293-320.

Burns, R.K. 1925. The sex of parabiotic twins in amphibia. J. Exp. Zool. 42: 31- 90.

_____. 1930. The process of sex transformation from female to male. J. Exp. Zool. 55:123-129.

_____. 1935. The process of sex transformation in parabiotic Amblystoma III. Conversion of testis in ovar in heteroplasic pair of A. tigrinum and A. punctatum. Anat. Record. 63:101 -129.

_____. 1938. The effects of cristalline sex hormones on sex differentiation in Amblystoma. Anat. Record. 71:447-467.

_____. 1939. The differentiation of sex in the opposum Didelphis virginiana and its modification by the male hormone testosterone propionate. J. Morphol. 65:79-119.

_____. 1950. Sex transformation in the opposum: Some new results and a retrospect. Arch. Anat. Microsc. et Morphol. Exp. 39: 467-485.

_____. 1955. Experimental reversal of sex in the gonads of the opossum Didelphis virginiana. Proc. Nat. Acad. Sci. 41: 669- 676.

_____. 1956. Hormones versus constitutional in the growth of embryonic sex primordia in the opossum. J. Anat. 98:35-67

_____. 1961. Role of hormones in the differentiation of sex. In "Sex and internal secretions" (W. C. Young, ed) 3rd ed., V. I. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland. pag. 76-185

Byskov, A.G. 1978. The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. Biol. Reprod. 19:720-735.

_____. 1981. Gonadal sex and germ cells differentiation. En. Mechanisms of sex and differentiation in animals and man. Eds. Austin, C.R y Edwards, R.G. Academic Press London. pag 145-164.

Callard, G. V y Mak, P. 1985. Exclusive nuclear localization of estrogen receptors in Squalus testis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:1336-1340.

Certain, P., Collenot, G., Collenot, A y Ozon, R. 1964. Mise en evidence histochimique de une 3β hydroxy steroide deshydrogenese dans le testicule du triton Pleurodeles waltlii Michah. C. R. Soc. Biol. 158: 1040 -1043.

Chang, C. Y y Witschi, E. 1953. Genic control and hormonal reversal of sex differentiation in Xenopus. J. Exp. Zool. 123:140-144.

_____. 1953. Parabiosis and gonad transplantation in Xenopus laevis Daudin. J. Exp. Zool. 123:1-27.

_____. y Witschi, E. 1955. Breeding of sex reversed males of Xenopus laevis. Proc. Soc. Expetl. Biol. Med. 89:150-152.

_____. y Witschi, E. 1955. Independence of adrenal hyperplasia and gonadal masculinization in the experimental adrenogenital syndrome of frogs. Endocrinology. 56:597-605.

_____. 1955. Hormonal influence on sex differentiation in the toad bufo americanus. Anat. Record. 123:467-485.

Chieffi, G y Botte, V. 1963. Histochemical reaction for steroid 3β - ol dehydrogenase in the interrenal and the corpuscles of Stannus of Anguilla anguilla and Conger conger. Nature. 200:793-794.

_____. Osservazioni histochemiche sulla attivita della steroid 3 -olo- dehydrogenasi nell'interrenali e nelle gonadi di girini e adulti di Rana esculenta. Riv. Istoch. Norm. Pat. 9:172-174.

Collenot, M. A. 1964. Mise en évidence histochimique d'une 3β hydroxy steroïd deshydrogenasa dans le gonads non différenciés et en cours de différentiation des males génétiques del urodele Pleurodeles waltli. Michah. C. R. Acad. Sci. Paris. 259:2535-2537.

Collenot, A. Unisexual female offspring in the salamanders Pleurodeles waltli Michach. 1975. En. "Intersexuality in the Animal Kindom" (Reinboth, R. ed) Spring Verlag. pag 311-317.

_____ y Collenot, A. 1977. La activité 3β hydroxysterioide dans Pleurodeles waltli (amphibien urodele) visualisation sur coupes serices a l'aide d'une nouvelle technique histochimique. J. Embryol. Exp. Morph. 42:29-42.

Cravioto, M., Ulloa, A., Bermudez, A., Herrera, J., Lisker, R., Méndez J. P y Pérez Palacios, G. 1986. A new inherited variant of the 3 hydroxysteroid deshydrogenase isomerase deficiency syndrome: Evidence for the existence of two isoenzimes. J. Clin. Endocrinol. Metabolic. 62:360-386-

Etchegoyen, S.G., Cardinali, P.D., Pérez, A.E., Tamayo, J y Pérez-Palacios, G. 1986. Binding and effects of catecholestrogens on adeny lato ciclasa activity and adrenoceptors benzodiazepina and GABA receptors in guinea pig-hypotalamicmembranes. Eur. J Pharmacol. 129:1-10.

Dale, E y Dorfman, R. I. 1977. Conversion of progesterone 4-C to testosterone by testicular tissue of american bullfrog. Gen. Comp. Endocrinol. 9:313-318.

Dantchakoff, U. 1937. Sur l'action de l'hormone sexuelle chez les reptiles. C.R. Acad. Sc. Paris. 205: 424-427.

Del Rio, G., Lupo di Prisco y Chieffi, G. 1967. Steroid hormones in the testicular tissue of Gallus domesticus. Experientia. 23: 594.

Della, Corte, F., Galgano, M y Cosenza, L. 1962. Su alcune reazioni istochimiche per gli steroidi nel testicolo di Triturus cristatux carnifex (Laur). Arch. Zool. ital. 47:353-363.

Dufaure, J.P. 1966. Recherches descriptives et experimentales sur les modalités et les facteurs du développement de l'appareil génital chez le lézard vivipare. (Lacerta vivipara Jacquin). Arch. Anat. Micr. Morph. Exp. 55: 437-497.

Ebensperger, C., Drews, U., Mayerová, A y Wolf, U. 1988. Serological antigen in the female chicken occurs during gonadal differentiation. Differentiation. 37: 186-191.

Fevold, H.R y Eik Nes. 1963. Progesterone metabolism by testicular tissue of the English sparrow, Passer domesticus. Gen. Comp. Endocrinol. 3:335-345.

Foote, C. I. 1941. Modification of sex development in the marbled salamander by administration of synthetic sex hormones. J. Exp. Zool. 86: 291-319.

_____, Foote, M. F. 1959. Effects in vivo and in vitro of water soluble testosterone on gonads of two species of anurans. Arch. Anat. Microscop. 48:71-81.

_____, y Foote, F. M. 1960. Maintenance of gonads of Xenopus laevis in organ culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105:107-109.

Fortune, J. E y Tsang, P. C. 1981. Production of androgen and estradiol 17 α by Xenopus ovaries treated with gonadotropins in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 43:234-242.

Gallien, L. 1937. Action masculinizante du propionate de testosterone dans la differentiation du sexe Chez Rana temporaria C.R. Acad. Sc. 205:375-377.

_____. 1941. Recherches experimentales sur la action amphisexuelle de la hormone femelle estradiol dans la differentiation du sexe chez Rana temporaria L. Bull. Biol. France et Belgique. 75:369-397.

_____. 1944. Recherches experimentales sur la organogenese sexuelle chez les batraciens anoures. Bull. Biol. France et Belgique. 78: 257-359.

_____. 1950. Inversion du sexe feminization chez l'urodele Pleurodeles waltlii Mich. traité sur le benzoate de oestradiol. C.R Acad. Sc. 231: 919-920.

_____. 1954. Inversion experimentale du sexe sous la action des hormones sexuelles chez le triton Pleurodeles waltlii Mich. Analyse des consequences genetiques. Bull. Biol. France et Belgique. 88: 131.

_____. 1955. Descendance unisexuee d'une femelle de Xenopus laevis ayant subi pendant sa phase larvaire l'action gynogene du benzoate de estradiol. C.R. Acad. Sc. 240: 913-915.

_____. 1956. Inversion experimentale du sexe chez un anoure inferieur X. laevis Daudin analyse des consequences genetiques. Bull. Biol. France et Belgique. 90:163-183.

_____, y Chalumeau le Foulgoc, M. T. 1960. Mise en evidence de steroids oestrogens dans le ovaire juvenil de Xenopus laevis Daudin et cicle des oestrogens au cours de la ponte. C R. Acad. Sci. Paris. 251:460-462.

_____. 1962. Comparative activity of sexual steroids and

genetic constitution in sexual differentiation of amphibians embryos. Gen. Comp. Endocrinol. 1:346-355.

_____, Certain, P y Ozon, R. 1964. Mise en évidence d'une 3 hydroxystéroïde déshydrogénase dans le tissu interrénal de l'urodèle Pleurodeles waltlii Michah aux diverses stades du développement. C.R.Acad. Sc. Paris. 258: 5729-5731.

_____. 1965. Recherches comparatives sur la inversion sexuelle par les hormones stéroïdes chez les amphibiens. Mémoires de la Société Zoologique de France.

Gavaud, J. Biosynthesis of androgens in the gonads of Nectophyroides occidentalis. 1975. J. Physiol. (Paris). 70:549-559.

George, F. W y Wilson, J. D. 1978. Conversion to androgen to estrogen by the human fetal ovary. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47:550-555.

George, F. W y Wilson, J. D. 1979. The regulations of androgen and estrogen formation in fetal gonads. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 14(4), 1297-1306.

Golman, A. S., Baker, M. K y Staneck, A. E. 1972. Development of 3 hydroxysteroid and glucosa-6- phosphate dehydrogenase in the testis, adrenals and ovaries of the rabbit fetus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140:1486-1492.

Gorski, J., Whelshons, W. V., Sakai, D., Hansen, J., Walent, J., Kassiss, J., Shuit, J., Stack, G y Campen, C. 1986. Evolution of a model of estrogen action. R. Progr. Horm. Res. 42:297-329.

Gropp, A y Ohno, S. 1966. Presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular interstitial and tubular) cells in cattle Bos taurus Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 74: 505- 528.

Guaraya, S. S. 1976. Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of steroid synthesizing cellular sites in the testis of nonmammalian vertebrates, Int. Rev. Cytol. 47:99-136.

Gutske, W.H.N y Chymiy, D.B. 1988. Sensitive periods during embryogeny for hormonally induced sex determination in turtles. Gral. Comp. Endocrinol. 71: 265-267.

Haffen, K. 1966. Intersexualité chez la caille Coturnix coturnix. Obtention d' un cas de ponte ovulaire par un mâle génétique. C.R. Acad. Sci. 261: 3876- 3979.

_____. 1974. Biosynthesis of steroid hormones by the embryonic gonads of vertebrates. En. Advances in morphogenesis. Ed. Abercomb y Brachet. Academic Press, New York and London. pag 205-303.

Houchon, D. 1971. Differentiation sexuelle et intersexualité dans la parabiose chez six especes d'amphibiens anoures appartenant aux familles des Discoglossidae, Pelobatidae, Limnodysnastidae. Ann. Emb. Morph. 4: 237- 268.

Houillon, C y Charlomagne, J. 1971. Developpment d'un double système de glandes génitales dans les chimeres homoplastiques a corps double chez l'amphibien Urodele Pleurodeles waltlii Michah C.R. Acad. Sc. Paris. 272: 1546-1549.

Humphrey, R. R. 1928. Sex differentiation in gonads develop from transplants of the intermediate mesoderm of Amblystoma. Biol. Bull. 55: 317- 339.

_____. 1933. The development and sex differentiation of the gonad in the wood frog Rana sylvatica following extirpation or orthotopic implantation of the intermediate segment and adjacent mesoderm. J. Exp. Zool. 65: 243-269.

_____. 1945. Sex determination in ambystomid salamanders: a study of the progeny of females experimentally converted into males. Am. J. Anat. 76: 33- 66.

_____. 1948. Reversal of sex in females of genotype WW in the axolotl (*Siredon o Ambystoma mexicanum*) and its rearing upon the role of the Z chromosomes in the development of the testis. J. Exp. Zool. 109(2), 172-185.

_____. 1953. The development and sex differentiation of the gonad of in the wood frog Rana sylvatica following extirpation or orthopic implantation of the intermediate segment and adjacent mesoderm. J. Exp. Zool. 65:247-269.

Hsu, C., Liang, H., Yu, N y Chiang, C. 1978. A histochemical study of the adrenogenital syndrome in frog tadpoles. Gen. Comp. Endocrinol. 35:347-354.

Ikasawa, H y Kobayashi, M. 1974. Effects of testosterone and estradiol on the development of sexual characters in young Rana nigromaculata. Biol. Reprod. 11:398-415.

Jost, A. 1947. Recherches sur la différentiation de l'embryon de lapin II. Action des androgenes synthese sur la histogenese

genital. Arch. Anat. Microscop et Morphol. Exp. 36: 242-270.

Kalt, R. M y Tandler. 1971. A study of fixation of early amphibian embryos for electron microscopy. J. Ultrastruc. Res.41: 633-645.

Kime, D . E y Hews, E, A. 1978. In vitro biosynthesis of 11 β hydroxy-and-11-oxotestosterone by testes of the pike Esox lucius and the perch Perca fluviatilis. Gen. Comp. Endocrinol. 36:604-608.

_____. 1980. Comparative aspects of testicular androgen biosynthesis in nonmammalian vertebrates. En. Steroids and their mechanism of action in nonmammalian vertebrates. ch.2. pp Eds. Delrio, G., and Brachet, J. Raven Press, New York. pag 17-19.

Kime, D. E. y Hews, E. A. 1978. Androgens biosynthesis in vitro by testes from amphibian. Gen. Comp. Endocrinol. 35:280-288.

Kubli, G. C. 1984. Physiological role of 5 and 5 α progesterone metabolites on the CNS. Trends in pharmacological Sciences. 5:439-442.

Levy, H., Deane, H. W y Rubin, B. L. 1959. Visualization of steroid 3 β -ol dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology. 72:932-943.

Lillie, R.F. 1916. The theory of the Freemartin. Science. 43: 611-613.

_____. 1917. The free martin: A study of the action of hormones in the fetal life of the cattle. J. Exp. Zool. 23:371-452.

_____. y Bascom, K. F. 1922. An early stage of the Free Martin and the parallel history of the interstitial cells. Science 55: 624-625.

Lipsett, M. B y Tullner, W.W. 1965. Testosterone synthesis by the fetal rabbit gonad. Endocrinology. 77: 273-277.

Loser, R., Seibel, K., Roos, W y Eppenberger V. 1985. In vivo and in vitro antiestrogenic action of 3-hydroxytamoxifen, tamoxifen and 4- hydroxytamoxifen. Eur. J. cancer. Clin. Oncol. 21(8), 981-999.

Lupo di Prisco., Materazzi, G y Chieffi, G. 1970. In vitro steroidogenesis in the testicular tissue of the fresh water teleost Esox lucius. Gen. Comp. Endocrinol. 14:595-598.

_____. Basile, C., Delrio, G., y Chieffi, G. 1972. Biosynthesis of steroids hormones in the urodele Triturus cristatus carnifex. Comp. Bioch. Physiol. 41(B), 245-249.

- McCarrey, J.R y Abbot, U.K. 1979. Mechanism of genetic gonadal sex determination and germ sex cells development in animals. *Advances in genetics*. 20: 217-290.
- Madhok, T. C., Leung, B. S y Stout, L. E. 1987. Characterization of molybdate stabilized estrogen receptors by hydrophobic interaction PHLC:Resolution of two subunits. *Horm. Res.* 25:29-36.
- Merchant, Larios. H. 1978. Ovarian differentiation. En: *The vertebrate ovary*. Ed. R. E. Jones. Ed. Plenum. Press, New York. pag. 47-81.
- _____ y Centeno, B. 1979. Origin of the somatic cells in the rat gonad: An autoradiographic approach. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19(4B), 1219-1229.
- _____ y Villalpando, I. 1981. Ultrastructural events during early gonadal development in Rana pipiens and Xenopus laevis. *Anat. Record.* 199:349-360.
- _____ y Popova, L y Reiss-Brion, M. 1984. Early morphogenesis of chick embryo in the absence of mesonefros. *Develop. Growth. Differentiation.* 26(5), 403-417.
- Mikamo, K y Witschi, E. 1963. Functional sex reversal in genetics females of Xenopus laevis, induced by implanted testis. *Genetics.* 48:1411-1421.
- Mikamo, K y Witschi, E. 1964. Masculinization and breeding of the WW Xenopus. *Experientia.* 20:622-623.
- _____. 1966. The mitotic chromosomes in Xenopus laevis. Normal, sex reversed and female WW. *Cytogenetics.* 5:1-19.
- Millewich, L., George, F. W. Wilson, J. D. 1977. Estrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. *Endocrinology* 100:187-196.
- Mintz, B., Foote, L. C y Witschi, E. 1945. Quantitative studies on response of sex characters of differentiated Rana clamitans larvae to injected androgens and estrogens. *Endocrinology.* 37:286-296.
- _____ y Witschi, E. 1946. determination of the threshold dose of testosterone propionate induce testicular development in genetically anourans. *Anat. Record.* 96:30.
- _____. 1947. Effects of testosterone propionate on sex development in female Amblystoma larvae. *Physiol. Zool.* 20:355-373.

- _____. 1948. Testosterone propionate minimum for induction of male development in anurans: Comparative data from other vertebrates. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69:358-361.
- Muller, U. y Wolff, U. 1979. Cross reactivity to mammalian anti H-Y antiserum in teleostean fish. Differentiation. 14:185-187.
- _____. Guichard, A., Reiss, Brion, M y Scheib, D. 1980. Induction of H-Y antigen in the gonads of male quail embryos by diethylstilboestrol. Differentiation. 16:129-133.
- _____. Zenzes, M. T y Wolff, U. 1979. Appearance of the H-W (H-Y) antigen in the gonads of oestradiol sex-reversed male chicken embryos. Nature. 280:144-144.
- _____. Guichard, A., Reiss-Brion, M y Scheib, D. 1980. Induction of the h-Y antigen in the gonads of male quail embryos by diethylstilbestrol. Differentiation. 16:129-133.
- Muller, C.H. 1977. Plasma 5 α -dihydrotestosterone and testosterone secretions in the bullfrog Rana catesbeiana: stimulation by bullfrog LH. Gen. Comp. Endocrinol. 33:122-132.
- Moon, Y. S y Reaside, J. T. 1972. Histochemical studies on hydroxysteroid dehydrogenase activity of fetal pig testes. Biol. Reprod. 7:278-287.
- Moore, K.L., Graham, M.A y Barr, M.L. 1957. The sex chromatin in the bovine free martin. J. Exptl. Zool. 135: 101-126.
- Nakamura, T y Tanabe, Y. 1972. Pathways for androgen synthesis in vitro by the testis of quail (Coturnix coturnix japonica). J. Endocr. 55: 499-506.
- Nandi, J. 1967. Comparative endocrinology of steroid hormones in vertebrates. Am Zoologist. 7: 115-133.
- Narbaitz, R y Kolony, L. 1964. 3 β hydroxysteroid dehydrogenase in differentiating chick gonads. Z. Zellforsch. 63: 612-617.
- New, D. A. T. 1966. The culture of vertebrate embryos. Academic Press London.
- Nieuwkoop, P. D y Faber. 1956. Normal table of Xenopus laevis (Daudin). A systematic and chronological survey of the development from the fertilized egg, till the end the metamorphosis. North Holland Publishing Company Amsterdam.
- Ohno, S., Nagai, Y y Ciccarese, S. 1978. Testicular cells

lysostripped of H-Y antigen organize ovarian follicle-like aggregation. *Cytogenetic.Cell.Genet.* 20:351-364.

Ozon, R., Breuer, H y Lisbou, B.P. 1964. Etude du metabolisme des hormones steroïdes chez les vertebres .III. metabolisme in vitro de la testosterone par l'ovaire et le testicule de la grenouille Rana temporaria .*Gen.Comp.Endocrinol.* 4:577-583.

_____. 1969. Steroid biosynthesis in larval and embryonic gonads of lower vertebrates. *Gen.Comp.Endocrinol.Sup.* 2:135-140.

_____. y Stocker, C. 1974. Formation in vitro de 5 α dihydrotestosterone par le testicule de Discoglossus pictus. *Gen. Comp. Endocrinol.* 23:224-236.

_____. 1967. Synthèse in vitro des hormones steroïdes dans le testicule et l'ovaire de l'amphibien urodele Pleurodeles waltlii Michah. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100:187-196.

Ozon, R y Belle, R. 1973. receptors de l'oestradiol 17 β dans la foie de poulet et de l'amphibien Discoglossus pictus. *Bioch.Biophys.Acta.* 297:155-163.

Padoa, E. 1936. Effetto paradossale mascolinizzazione sulla differenziazione sessuale di giniri di Rana esculenta tratata con ormone follicolare. *Monit. Zool. Ital.* 47: 255.

Palshof, H. M. T., Patterson, J., Battersby, L. 1978. Tamoxifen in advanced breast cancer. *Cancer. Review.* 5:131-141.

Pasqualini, J. R., Nguyen, B. L., Mayrand, C y Lecerff, C. 1986. Oestrogen agonistic effects of tamoxifen in the uterus of new born guinea pigs after short and long treatment. Biological and Histological studies. *Acta. Endocrinol.* 111:378-386.

Pelliniemi, L.J. 1976. Ultrastructure of the indifferent gonad in male and female pig embryos. *Tissue and Cell.* 8:163-174.

Pechan, P., Watchel, S. S y Reinboth, R. 1979. H-Y antigen in the teleosts. *Differentiation.* 14:189-192.

Pesonen, S y Rapola, J. 1962. Observations on the metabolism of adrenal and gonadal steroids Xenopus laevis and bufo bufo *Gen. Comp. Endocrinol.* 2:425-432.

Pieau, C. 1970. Effects de l'oestradiol sur l'appareil genital de l'embryon de tortue mauresque (Testudo graeca L). *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 59(4), 295-318.

Pietras, R.J y Szego, C.M. 1975. Surface modifications evoked by estradiol and diethylstilbestrol in isolated endometrial cells:

Evidence from lectin probes and extracellular release of lysosomal protease. *Endocrinology*. 97 (6), 1445-1454.

_____. 1977. Specific binding sites for estrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*. London. 265:69-72.

_____. 1980. Partial purification and characterization of estrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Bioch. J.* 191:743-760.

Polani, P. E. y Adinolfi, M. 1983. HY Antigen and its functions: A review and a hypothesis. *J. Immunogenetic.* 10 : 85-102.

Puca, G.A., Nola, E., Sica, V y Bresciani, F. 1971. Estrogen binding proteins of calf uterus. Partial purification and preliminary characterization of two cytoplasmic proteins. *Biochemistry*. 10: 3769-3779.

Puckett, O. W. 1939. Some reactions of the gonads of Rana catesbiana tadpoles to injection of mammalian hormonal substances. *J. Exp. Zool.* 52:235-263.

Puckett, O. W. 1939. Some effects of crystalline sex hormones on the differentiation of the gonads of an indifferentiated race of Rana catesbiana tadpoles. *J. Exp. Zool.* 84:39-51.

Rapola, J. 1963. The adrenal cortex and metamorphosis of Xenopus laevis Daudin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3:412-421.

Rao, S. G., Breuer, H y Witschi, E. 1968. Metabolism of estradiol 17 by male and female larvae of Xenopus laevis. *Experientia*. 24:1258.

_____. 1969. In vitro conversion of 17 hydroxyprogesterone to androstendione by mashed gonads from metamorphic stages of Xenopus laevis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 12: 119-123.

Reinboth, R., Mayerová, A., Ebensperger, C y Wolf, U. 1987. The occurrence of serological H-Y antigen (Sxs antigen) in the diandric protogynous wrosse Cores julius L. Labridae. *Teleostei*. *Differentiation*. 34: 13-17.

Resdhaw, M. R y Nicholls, T. J. 1971. Oestrogens biosynthesis by ovarian tissue of the south african clawed toad Xenopus laevis Daudin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 16:85-96.

Reynaud. 1942. Modification experimentale de la differentiation sexuelle des embryons de souris par la action de hormones androgenes et estrogenes. *Actual. Scient et Indus. Nos.* 925-926.

Keynolds, T. S. The use of lead citrate and high ph as an

- electron opaque stain for electron microscopy. J. Cell. Biol. 17: 208- 217.
- Richards, M. C y Nace, W. G. 1978. Gynogenetic and hormonal sex reversal used in testis of the XX-XY hypothesis of sex determination in Rana pipiens. Growth. 42:319-331.
- Risley, P. L. 1940. Intersexual gonads of turtle embryos following injection of male sex hormone. J. Morphol. 67: 439-453.
- Roberts, J.D y Warren, J.C. 1964. Steroid biosynthesis in the fetal ovary. Endocrinology. 74:846-852.
- Ruh, S. T. 1976. Simultaneous separation of estrogen and androgens using thin layer chromatography. J. Chromatography. 121:82-84.
- Rubin, B. L., Deane, H. W y Hamilton, J. A. 1963. Biochemical and Histochemical studies on 3 β - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal glands and ovaries of diverse mammals. Endocrinology. 73: 748-763.
- Salzgeber, B., Reiss-Brion, M y Baulieu, E. E. 1976. Modifications des gonades femelles de l'embryon de poulet apres l'action du tamoxifene. C. R. Acad. Sci. Paris. 293:133-138.
- Shwarzel, W. C., Kruggel, W. G., Scheib, D y Baulieu, E. E. 1981. Action antagoniste du tamoxifene sur la differentiation normale des gonades femelles de l'embryon de caille. C. R. Acad. Sci. Paris. 293:513-518.
- Scheib, D y Lombard, N. M. 1971. Etude histoenzimologique de la activite de la 3 hydroxysteroid dehydrogenase du testicule de souris blanche. Arch. Anat. Microsc. 60(2):205-218.
- _____ y Baulieu, E.E. 1981. Action antagoniste du tamoxifene sur la differentiation normale des gonades femelles de l'embryon de caille. C.R.Acad. Sc. Paris. 293; 513-518.
- Sumida, C., Lecerf, F y Pasqualini, J. R. 1988. Control of progesterone receptors in fetal uterine cells in culture. Effects of estradiol, progestins, antiestrogens and growth factors. Endocrinology. 122:3-11
- Turner, C.D. 1940. The influence of testosterone propionate upon sexual differentiation in genetic female mice. J. Exper. Zool. 83: 1-31.
- Upadhyay, S. Luciani, J. M y Zamboni, L. 1979. The role in the mesonefros in the development og indifferent gonads and ovaries of the mouse. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.

19(48):1179-1196.

_____ y Zamboni, L. 1981. The role of the mesonefros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. En. Development and function of reproductive organs. Eds Byscov, A.G y Peters, H. Excerpta Medica Amsterdam. pag 18-27.

Vanini, E. 1951. Organogenese des gonades et determinisme du sexe chez les amphibiens et les amniotes. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exp. 39:295-313.

Watchel, S.S., Koo, G.C y Boyse, E.A. 1975. Evolutionary conservation of H-Y in the primary sex determination of sex. Nature 254: 270- 272.

_____ y Bresler, A. P. 1980. Does antigen induce the heterogametic ovary?. Cell.20: 869-864.

Westley, B., y Knowland, J. 1978. An estrogen receptor from Xenopus laevis possibly connected with vitellogenin synthesis. Cell. 15:367-374.

Wilson, J.D y George, F.W. 1978. Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. J. Clin. Endocrinol. Metab. 47(3), 550-555.

_____. 1979. The regulation of androgen and estrogen formation in fetal gonads. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19(4); 1297-1406.

Willier, H. 1921. Structures and homologies of Free Martin gonads. J. Exp. Zool. 33: 63-127.

Witschi, E. y Mc. Curdy, H. M. 1929. The free martin effect in experimental parabiotic twins of Triturus torosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26: 655-657.

_____. 1929. Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. J. Exp. Zool. 52:235-263.

_____. 1937. Studies on sex determination in amphibians IX. Quantitative relationships in the induction of sex differentiation and the problem of sex reversal in parabiotic salamanders. J. Exptl. Zool. 75:313:373.

_____ y Crown, E.N. 1937. Hormones and sex determination in fishes and in frogs. Anat. Rec. 70: 121-122.

_____. 1931. Studies in sex differentiation and sex determination in amphibians VI. The nature of bidder's organ in the toad. Am.J. Anat. 52: 461-515.

_____. 1953. The experimental adrenogenital syndrome

in the frog. J. Clin. Endocrinol. 13: 316-329.

_____. 1956. Development of the Vertebrates. Saunders and Company.

_____, Foote, L. C y Chang, C. Y. 1958. Modification of sex differentiation by steroidal hormones in water frog Pseudacris nigrita triseriata. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97: 196-197.

_____. 1963. Embryology of the ovary. En. The ovary (Eds. Grady, J. H. and Smith. William and Wilkins C. Baltimore pag 1-10.

_____. 1967. The Biochemistry of sex differentiation in vertebrate embryos. En. The Biochemistry of Animal Development. Ed. R. Weber. Academic Press, New York. pag 57-81.

Woff, E y Giglinger, A. 1935. Sur la transformation des poulets males en intersexués par injection de hormone femelle (folliculine) aux embryos. Arch. Anat. Hist. Emb. 20: 219-278.

Xavier, F., Vigeli, Z y Trong, L. 1970. Recherches sur la activité endocrine du ovaire de Nectophyroides occidentalis Angel (amphibien anoure vivipare). Gen. Comp. Endocrinol. 15:423-431.

Zamboni, L., Mauleón, P y Bezar, J. 1979. The role of the mesonephros in the development of the sheep fetal ovary. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19(4B), 1153-1178

Zamoska, L., Niewleski, J y Durek, G. S. 1972. Substrate dependent 3β hydroxy steroid dehydrogenase activity in the gonads of the clawed toad Xenopus laevis Daudin. Folia. Histochem. Cytochem. 10(1):89-91.

Zarboski, P., Dorizzi, M and Pieau, C. 1979. Sur la utilization de serum anti H-Y de souris pour la determination du sexe genetique chez Emys orbicularis (L. testudine emididae). Compt. Rend. Acad. Sc. Paris. 288 D : 351- 354.

_____. 1979. Sur la constance de la expression de l'antigen H-Y chez le sexe hétérogamétique de quelques amphibiens et sur la mise en évidence d'un dimorphisme sexuel de l'expression de cet antigen chez le amphibien Anoure Pelodytes punctatus D. C.R. Acad.Sci. Paris.289: 1153-1156.

_____, Guichard, A y Reiss-Brion, M. 1980. H-Y antigen in ovariectomized chicks: Disappearance of its expression during the transformation of the gonad into a testis. Biol. Cellulaire. 39:291-294.

Zenses, M. T., Wolff, U., Gunther, E y Engel, W. 1978. Studies on the function of H-Y antigen dissociation and reorganization experiments on rat gonadal tissue. Cell. Genet. 20: 365- 372.