

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

**INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS Y
GERMINALES AL INICIO DE LA DIFERENCIACIÓN
SEXUAL DE LA GÓNADA DEL RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

M. en I.B.B. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
MÉXICO, D.F.

270568
1999



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.

PAGINACION

▷ DISCONTINUA.

A mis padres Jorge y María Elena, por ser también mis maestros y amigos.

A mis hermanos: Francisco Javier, Jorge, Victor Manuel y Ponchito.

Y con cariño especial para Angelita, Kary, Betty, Tere, Vicky y Kenia

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios.

**Revisores: Dra. Gabriela Morali de la Brena
Dra. Irma Villalpando Fierro
Dra. Marta Romano Pardo
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dra. Susana Kofman Alfaro
Dr. Miguel Angel Morales Mendoza**

La presente tesis fue apoyada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, No. IN204598).

Mi agradecimiento especial al Dr. Horacio Merchant Larios por su excelente asesoramiento, apoyo y facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo. Dr. Merchant gracias por los conocimientos, estímulos, críticas y orientación que durante todos estos años, desde mis etapas de estudiante de licenciatura me ha transmitido.

Agradezco al Dr. Joaquín Herrera por la realización de los análisis de Biotransformación. Asimismo, hago partícipe de los agradecimientos al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia y al Sr. José Guadalupe Baltazar García por el apoyo técnico brindado.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCION.....	3
1.1 Origen de las Células Germinales Primordiales.....	4
1.1.2 Migración de las Células Germinales Primordiales.....	6
1.1.3 Bases moleculares de las Células Germinales Primordiales.....	7
1.2 Establecimiento de la gónada indiferenciada.....	8
1.2.1 Origen de las células somáticas.....	8
1.2.2 La gónada indiferenciada.....	9
1.2.3 Genes involucrados en el desarrollo de la gónada.....	10
1.3 Morfogénesis gonadal.....	16
1.3.1 Diferenciación del testículo.....	16
1.3.2 Diferenciación del ovario.....	17
1.4 Interacción entre las Células Germinales Primordiales y somáticas en el desarrollo gonadal: Control del inicio de la meiosis.....	18
1.4.1 Interacciones y asociaciones celulares en la morfogénesis embrionaria.....	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
3. HIPOTESIS.....	28
4. OBJETIVOS.....	29
5. MATERIAL Y METODOS.....	30
5.1 Animales.....	30

5.2 Disgregados-reagregados.....	31
5.3 Cultivo de órganos.....	31
5.4 Detección histoenzimática de la $\Delta 5-3\beta$ -HSD.....	32
5.5 Inmunohistoquímica de Laminina.....	32
5.6 Detección inmunohistoquímica de MIS y SOX9.....	33
5.7 Microscopía de luz y electrónica.....	34
5.8 Radioinmunoanálisis de Testosterona.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Disgregación celular.....	35
6.2 Disgregados-reagregados.....	35
6.2.1 Células de gónadas de machos más mesonefros	35
6.2.2 Células de gónadas aisladas de machos	36
6.2.3 Células de gónadas aisladas de hembra sin y con mesonefros.....	37
6.3 Inicio de la meiosis en regregados homotípicos y heterotípicos.....	38
6.4 Radioinmunoanálisis de Testosterona.....	39
FIGURAS.....	41
7. DISCUSION.....	50
8. CONCLUSIONES.....	59
9. REFERENCIAS.....	60

I. RESUMEN

La diferenciación del sexo gonadal representa la primera manifestación fenotípica de la diferenciación sexual durante el desarrollo. La diferenciación de un ovario o de un testículo, depende de una serie de interacciones entre las células precursoras de los diversos linajes celulares que forman la cresta genital. La identificación del *Sry* como el factor determinante del testículo, ofrece nuevas oportunidades para entender los mecanismos celulares y moleculares que llevan a la diferenciación histológica de la gónada. En el presente trabajo, diseñamos un método de disociación-reagregación celular a partir de gónadas indiferenciadas, las cuales son mantenidas en cultivo de órganos y en donde se lleva a cabo una reconstrucción histotípica de la gónada y una diferenciación de los diferentes tipos celulares de manera isocrónica con respecto a la gónada *in situ*. Para identificar a los diferentes tipos celulares que se diferencian en nuestras condiciones experimentales, se emplearon los siguientes métodos: ultraestructural, detección inmunohistoquímica de laminina, localización de la expresión de la Sustancia Inhibidora de los conductos Müllermanos como del gene *Sox9*, determinación de la actividad de la 3β HSD y radioinmunoanálisis de testosterona. Después de 96 horas de cultivo, en reagregados de gónadas de machos se recapitulan los eventos que llevan a la diferenciación histológica del testículo. Las células germinales (CG) en reposo mitótico junto con las células de Sertoli forman los cordones seminíferos. Las células mioideas, mesenquimáticas, endoteliales y de Leydig forman el compartimento estromático. En reagregados de gónadas de hembras, las células somáticas muestran pocos cambios, sin embargo, las CG inician la profase de la primera división meiótica. Se ha reportado que CG localizadas fuera de la gónada son capaces de diferenciarse como ovocitos tanto en machos como en hembras genéticas. Esto sugiere que CG XY localizadas fuera de los cordones seminíferos, adquieren el fenotipo de las células XX e inician la meiosis, pero son prevenidas de hacerlo por un factor inhibidor de la meiosis (FIM) probablemente secretado por las células de Sertoli. En el presente estudio nos preguntamos si las células de Sertoli inhiben el inicio de la meiosis en CG XX y XY disgregadas de gónadas indiferenciadas. A diferencia de los reagregados de macho o hembra donde las CG entraron en reposo mitótico o en meiosis respectivamente, en reagregados de los dos sexos, encontramos CG en meiosis dentro de los cordones seminíferos. La proporción de CG que inician la meiosis es cercana al 50%. Estos resultados sugieren que las CG XX se encuentran determinadas para iniciar la meiosis desde la etapa de gónada indiferenciada, y que las células de Sertoli o el FIM secretado por éstas sólo tiene efecto inhibitor sobre las CG XY.

II. ABSTRACT

Gonadal differentiation is the first morphological feature of sexual differentiation in eutherian mammals. With the identification of the *SRY* gene in humans (*Sry* in mice) as the master switch for the differentiation of the mammalian testis, new opportunities opened for the design of experiments that would enlighten the complex cell interactions leading to the histological differentiation of the gonad. In this study, we designed a method that allows dissociated cells from undifferentiated genital ridges to recapitulate gonad development *in vitro*. Several criteria for gonadal differentiation were employed, including ultrastructure, immunostaining of laminin, Mullerian inhibiting substance (MIS) and *SOX9*, activity of 3β HSD and radioimmunoassay of testosterone. In our reagggregates, cell proliferation, cell migration, and deposit of an extracellular matrix occur in the reagggregates of the two sexes. The transformation from an undifferentiated gonad to an histologically distinguishable testis takes place after 96 h of culture. Here, germ cells (GC) and Sertoli cells form the seminiferous cords. Leydig, mesenchymal, endothelial and myoid cells form the stromatic region. On the other hand, in reagggregates from female gonads, the GC appear associated to epithelial-like somatic cells with stromal tissue between them. *It has been reported that ectopic GC are capable of differentiate as oocytes regardless of the genetic sex of the embryo.* It is assumed that a short-range diffusible factor produced by the Sertoli cells prevents GC from entering meiosis. In the present study, we wondered if the fetal Sertoli cells were able to inhibit the onset of meiosis in both male and female GC. It was found that in homotypic reagggregates of male gonads most germ cells were in resting stage and in female reagggregates GC enter meiosis. On the other hand, in heterotypic reagggregates of female and male cells, around 50% of GC entered meiosis. These results suggest that XX GC are determined for enter meiosis at the stage of morphologically undifferentiated gonad, and that a short-range diffusible factor produced by the Sertoli cells prevents only XY GC from entering meiosis.

INTERACCION ENTRE LAS CELULAS SOMATICAS Y GERMINALES AL INICIO DE LA DIFERENCIACION SEXUAL DE LA GONADA DEL RATON

1. INTRODUCCION

Los estudios sobre diferenciación sexual realizados en mamíferos han llevado al reconocimiento de tres procesos secuenciales: el establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fertilización, el desarrollo de la gónada indiferenciada hacia un ovario o un testículo, y la subsecuente diferenciación de los genitales internos y externos como resultado de la función endócrina asociada con el tipo de gónada presente. El desarrollo del fenotipo sexual es el resultado de una serie de interacciones entre señales genéticas, celulares y hormonales, las cuales participan en la cascada de eventos necesarios para generar el fenotipo macho o hembra. Las diferencias fenotípicas entre machos y hembras son el resultado de la correcta manifestación de todos los procesos involucrados durante la diferenciación sexual gonadal.

La diferenciación gonadal hacia un ovario o un testículo es el punto de inicio en la determinación sexual de los mamíferos. Las hembras poseen dos cromosomas X y los machos un cromosoma X y un cromosoma Y. Un sólo gene ligado al cromosoma Y, conocido como el factor determinante del testículo (FDT) es necesario para comprometer a la gónada bipotencial a desarrollarse en un testículo: Se ha logrado la identificación de un gene presente en el brazo corto del cromosoma Y, el cual reúne todas las características esperadas del FDT. A este gene se le denominó *SRY* en humanos (Berta *et al.*, 1990) y *Sry* en ratón (Koopman *et al.*, 1990). En ausencia del cromosoma Y, el sexo gonadal es dirigido hacia ovario, el fenotipo de hembra se lleva a cabo sin un requerimiento de señales gonadales y por lo tanto, en mamíferos, la determinación testicular es equivalente a la determinación sexual.

Durante el desarrollo de las gónadas, existe desde el inicio una interacción entre dos líneas celulares: las células germinales (de origen extragonadal) precursoras de los ovocitos y los espermatozoides en hembras y machos respectivamente y las células somáticas. De esta manera las gónadas presentan un modelo de morfogénesis con un componente celular externo que interacciona con el componente local somático. Así, los embriones machos y hembras inician su desarrollo en forma similar, de manera que en

ambos sexos se establecen estructuras idénticas a partir de las cuales se formarán los órganos reproductores correspondientes a cada sexo.

Para entender el papel del *Sry*, así como las interacciones celulares que se llevan a cabo durante la diferenciación gonadal, es necesario considerar las etapas por las cuales pasan las gónadas durante su morfogénesis: i) Migración y colonización del primordio gonadal por parte de las células germinales primordiales (CGP), ii) Organización del primordio gonadal como gónada indiferenciada y iii) Diferenciación de la gónada en un ovario o en un testículo.

1.1 Origen de las células germinales primordiales (CGP)

Aunque el sexo del individuo y con esto el sexo de las gametas se establece en el momento de la fertilización, existe un período inicial en el desarrollo embrionario en el cual no es posible detectar diferencias entre las células precursoras de los ovocitos y de los espermatozoides. Este período es el que corresponde al de las células germinales primordiales (CGP).

El establecimiento de las distintas líneas celulares durante el desarrollo se lleva a cabo a diferentes tiempos. En el caso de las CGP su determinación parece ser uno de los más tempranos, lo cual ha sido motivo de profundas reflexiones desde el siglo pasado. August Weismann (1892) postuló el concepto sobre "La continuidad del plasma germinal", dividiendo en dos tipos a las células de un organismo: las células somáticas y las células germinales. Asume que ambos tipos se segregan desde las primeras divisiones del cigoto, de manera que las células germinales que conservan el "plasma germinal" son inmortales, en tanto que las somáticas, poseen los determinantes para los diferentes tipos celulares que forman al organismo y cuya existencia no va más allá de su período de vida.

En contraste con los postulados de Weismann, encontramos el concepto de "pangénesis" de Darwin, quien propuso que las células germinales se forman por la agregación de subunidades autoreplicables llamadas "gémulas", provenientes de todos los tejidos del organismo. Así, después de la fertilización, las células germinales pasarían a la siguiente generación, dando origen a los diferentes tipos celulares por un proceso de "desagregación de las gémulas", que a su vez repetirían el ciclo.

Estos dos conceptos a la luz de la Biología moderna suenan discordantes en su concepción original, sin embargo, la idea de "continuidad" y "autoreplicación" de Weisman y Darwin respectivamente, son aplicables al ADN y a varios organelos celulares.

Actualmente podemos plantear el problema de las CGP en términos de su "determinación", es decir, si el ADN se replica en copias idénticas, ¿cómo aparece la diversidad celular? En el caso de las células germinales, encontramos al menos dos respuestas posibles: una "preformista", la cual implica la existencia de factores determinantes del establecimiento de la línea germinal localizados en ciertas áreas del citoplasma del cigoto. Estos factores serían responsables de la regulación del genoma para que este exprese el gen o los genes correspondientes a las CGP. Otra respuesta podría ser "epigenética", donde hay una determinación relativamente tardía de la línea germinal, de manera que las CGP se establecen en el embrión multicelular según la posición que ocupan en el conglomerado.

En algunas especies de invertebrados, la formación de las células germinales es dependiente de la acción de factores citoplásmicos, presentes desde el momento de la fertilización. En dichas especies, la manipulación del "plasma germinal" identificado en huevos de *Drosophila* (Ilmensee *et al.*, 1976), demostró que lo que está "preformado" y "localizado" en el huevo no son las CGP, sino los factores que regulan su diferenciación. Sin embargo, existen organismos en los que la determinación de la línea germinal ocurre después de la gastrulación, por lo que su establecimiento depende más de un fenómeno de "posición".

Una serie de experimentos clásicos llevados a cabo en anfibios y aves demostraron que las CGP tienen un origen extraembrionario. La extirpación quirúrgica, la cauterización o irradiación con un haz de luz ultravioleta (U.V.), o de rayos X o *gamma* de la "creciente germinal", región extraembrionaria en la que se detectan las primeras CGP, conlleva al desarrollo de embriones estériles. Reynaud demostró el origen extraembrionario de las CGP. Inyectó por vía endovenosa, una suspensión de células del endodermo de la "creciente germinal" de guajolote a un embrión de pollo previamente esterilizado por irradiación U.V., y viceversa. Encontró que los animales así tratados, producen gametos correspondientes a las CGP de la especie inyectada. En mamíferos, Gardner (1977) transplantó células de la masa celular interna o del ectodermo embrionario de embriones de ratones negros a blastocistos de ratones blancos. Estos se desarrollaron en madres

nodrizas. Después de cruzarlos observó que algunas de las crías fueron de color negro, lo que demostró que las células transplantadas fueron capaces de dar origen a las CGP.

1.1.2 Migración de las CGP

Chiquoine en 1954 identificó por primera vez a las CGP en el embrión de ratón, por su gran actividad de la fosfatasa alcalina. Describió a las CGP en embriones de *8 días postcoitum (dpc)* en tres sitios: En el extremo caudal de la línea primitiva, en el mesodermo de la base de la alantoides y en el endodermo del saco vitelino. En base a estas observaciones, propuso que estas células podrían originarse en el saco vitelino. Por otro lado, Ozdzenski (1967) examinando embriones en etapas un poco más tempranas (*7 dpc*), encontró que prácticamente todas las CGP se localizan en el rudimento de la alantoides.

De la base del alantoides, las CGP migran o son acarreadas hasta la región urogenital del embrión donde se formarán las gónadas. El desplazamiento de estas células se da por dos tipos de movimientos: *pasivo* y *activo*. El primero tiene lugar por una translocación de las CGP, localizadas en el endodermo y el mesénquima vecino del saco vitelino y de la alantoides. Desde aquí, las CGP pasan al interior del embrión, junto con el endodermo y el mesénquima que formarán al intestino primitivo posterior y al primordio del mesenterio intestinal. Aquí se inicia la migración *activa* de las CGP, es decir que tienen que valerse de su propia capacidad de locomoción para salir del intestino y atravesar la lamina basal que lo recubre. Este movimiento se manifiesta por emisión de pseudópodos capaces de romper la lámina basal del intestino y continuar su camino hacia las futuras crestas genitales a través de células somáticas estáticas o que se mueven en direcciones diferentes.

A pesar de algunos estudios recientes en los que se observa el comportamiento de las CGP *in vitro*, poco se sabe sobre los mecanismos que las guían hasta su ubicación final en las crestas genitales. Se ha observado que las CGP son incapaces de desplazarse sobre vidrio, plástico, gelatina y colágena. En cambio se desplazan sobre una monocapa de células mesenquimáticas y sobre colágena a la que se le agrega fibronectina (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986). Se observó que la fibronectina se encuentra concentrada a lo largo del camino que siguen las CGP hacia las crestas genitales. Aunque la fibronectina se ha asociado con el desplazamiento celular, el proceso que guía a las CGP hacia las crestas genitales todavía se desconoce.

1.1.3 Bases moleculares de las CGP

Hasta la fecha se conocen algunas moléculas que se expresan durante la migración de las CGP hacia las crestas genitales que pudieran jugar un papel importante en la diferenciación de este tipo celular. La fosfatasa alcalina es una enzima que se ha utilizado como marcador de las CGP para determinar su origen y ruta de migración. Esto ha llevado a pensar que la expresión de la fosfatasa alcalina durante la migración de las CGP juega un papel importante en la biología de este tipo celular. Sin embargo, mediante la mutación dirigida del gen que codifica para esta enzima en las CGP, se ha demostrado que su ausencia no modifica la conducta migratoria de estas células (MacGregor *et al.* 1995).

Oct-4, un factor de transcripción que se une a motivos octaméricos, es otra de las proteínas que se expresa en este tipo celular. El papel que juega este factor en las CGP aún no se ha determinado, sin embargo, en embriones de ratón, se ha observado que se expresa entre los 8.5 y 12 *dpc* en CGP de ambos sexos, en ovocitos no fertilizados y en células pluripotenciales embrionarias. (Schöler *et al.*, 1989). Recientemente, Pesce *et al.* (1998) analizando la expresión de *Oct-4* en células germinales (CG) partiendo de los 11.5 *dpc*, encontraron que este gene se expresa en los dos sexos hasta los 13.5 *dpc*. A partir de los 14.5 *dpc* la expresión de *Oct-4* se mantiene sólo en las CG de los machos, lo que coincide con la entrada en reposo mitótico, mientras que en las CG de las hembras, las cuales inician la meiosis, este gene es reprimido. Posteriormente, *Oct-4* se detecta nuevamente en ovocitos en crecimiento y dentro de folículos primarios, mientras que en los machos, este gene es reprimido durante la proliferación y maduración de las espermatogonias. De esta manera, se propone que el gene *Oct-4* pudiera jugar un papel importante en el inicio de la meiosis de ambos sexos y en el crecimiento y detención de la meiosis en los ovocitos.

Durante la vida embrionaria las CGP expresan en su superficie una gran variedad de determinantes antigénicos con una distribución temporal muy específica. A este tipo de moléculas se les ha asociado en el proceso de migración de estas células, como es el caso del antígeno embrionario estado específico-1 (SSEA-1), por ser muy abundante en este tipo celular durante su período migratorio y desaparece gradualmente una vez que las CGP han colonizado la gónada (Gomperts *et al.*, 1994). Sin embargo, aún no se ha establecido si ésta y otras moléculas relacionadas, realmente tienen un papel funcional en la migración de las CGP.

El receptor tirosina cinasa *c-kit*, es otra de las moléculas que expresan las CGP. Se ha demostrado este receptor tiene un papel muy importante en la sobrevivencia de las CGP. En observaciones realizadas en ratones mutantes en el locus *white-spotting* (W), carentes de CGP o con un número muy reducido de ellas, reveló que el proto-oncogen *c-kit* era el responsable de la esterilidad. Paralelamente, otra mutación, la del locus *Steel* (Sl), que codifica para el factor de crecimiento Steel, presentaba un fenotipo en las CGP similar al de la mutación del *c-kit* (McCoshen y Mc Callion, 1975). Al establecerse que *Steel* es el ligando del *c-kit*, se comprendió la similitud de ambos fenotipos ya que al no producirse el factor de crecimiento, o al estar mutado su receptor, las CGP no pueden transducir la señal y por lo tanto no proliferan y/o son incapaces de migrar.

Además del *Steel*, existen otros factores que promueven la sobrevivencia y/o proliferación de las CGP *in vitro*. En experimentos realizados con el factor transformante beta-1 (TGFβ-1), se ha observado que éste tiene un efecto negativo sobre la proliferación de las CGP (Godin y Wilye, 1991), sin embargo, se desconoce si este factor tiene el mismo efecto *in vivo*. Otra actividad que se ha postulado al TGFβ-1 es la de ser un agente quimioatrayente que pudiera dirigir la migración de las CGP hacia la gónada.

La llegada de las CGP a la gónada y la pérdida de sus características migratorias marca el inicio de otra fase de su desarrollo. Las CGP junto con varios tipos de células somáticas presentes en la cresta genital inician la formación de la gónada indiferenciada.

1.2 Establecimiento de la gónada indiferenciada

1.2.1 Origen de las células somáticas

Cuando las CGP empiezan a llegar a la región urogenital, en ésta ya se encuentran diferentes tipos de células somáticas, todas ellas derivadas del mesodermo. Entre ellas se encuentran las mesoteliales, mesenquimáticas, mesonéfricas y endoteliales. El origen de los componentes somáticos que forman la gónada indiferenciada ha sido motivo de gran controversia. Brambell y Parkes en 1927, propusieron que las células somáticas se originan por proliferación del epitelio celómico. En estudios realizados en diversas especies de mamíferos, Zamboni, *et al* (1979), Upadhyay y Zamboni (1981), y Wartenberg (1981), sugieren que las células epiteliales de los cordones sexuales, son derivadas del epitelio de túbulos mesonéfricos.

Las diferencias en los patrones y mecanismos del desarrollo gonadal han sido atribuidas a diferencias específicas en la complejidad estructural, funcionalidad y estado de diferenciación-involución del mesonefros en los diferentes grupos estudiados. En embriones de pollo, Merchant-Larios, *et al* (1984) provocaron agénesis unilateral del mesonefros y observaron que no hay participación de las células epiteliales de este órgano para el establecimiento de los cordones sexuales de la gónada. Sin embargo, encontraron que células mesenquimáticas y vasos sanguíneos de la región mesonéfrica invaden la gónada.

Las observaciones realizadas durante el inicio de la formación de la cresta genital en mamíferos con períodos cortos de gestación, revelan una condensación de células mesenquimáticas, que lleva a la organización de los túbulos mesonéfricos. La lámina basal del mesotelio es interrumpida en la región de la futura cresta genital, la cual es más densa debido a la estratificación de células mesoteliales. Debido a la gran invasión de vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica, junto con la migración de las CGP hacia la cresta genital, da la impresión de que el crecimiento de las crestas genitales se lleva a cabo por la migración de células provenientes del mesonefros.

Merchant-Larios (1979), en un estudio de autoradiografía de la región urogenital de embriones de rata, propuso que la morfogénesis de la región urogenital en mamíferos con períodos cortos de gestación, como el ratón y la rata, se lleva a cabo de la siguiente manera: el canal mesonéfrico induce la organización de los túbulos mesonéfricos. Al mismo tiempo se da una condensación de células epiteliales y mesenquimáticas en el epitelio celómico para formar el "blastema gonadal", precursor de la gónada indiferenciada.

Como se verá más adelante, estudios recientes en el ratón han demostrado que las células del estroma mesonéfrico participan sustancialmente en la diferenciación gonadal, particularmente en la diferenciación del testículo.

1.2.2 La gónada indiferenciada

En el primordio gonadal se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual gonadal. Dicha diferenciación tisular inicial es muy importante, ya que de su correcta comprensión dependerá el entendimiento de los eventos tanto estructurales como moleculares, que conducen a la diferenciación sexual de la gónada. Las

células somáticas son de tres tipos: mesenquimáticas (laxamente distribuidas), mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (provenientes de los vasos que invaden la zona).

Las células mesenquimáticas y mesoteliales inician una gran actividad al llegar las CGP. Después de administrar [³H]-Timidina, se detecta una proliferación activa de todas las células somáticas en la región de la cresta genital. Se observa entonces una condensación de células de origen mesotelial y mesenquimático fundamentalmente, de manera que forman un agregado compacto que se denomina "blastema gonadal". A partir de este primordio embrionario, se diferencian dos tejidos gonadales importantes: los cordones sexuales y el estroma. Los cordones sexuales son arreglos epiteliales que se encuentran delimitados por una lámina basal y dentro de ellos encontramos a las CGP. Por otro lado, en el estroma se encuentran células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos que irrigan a la gónada indiferenciada. Cabe mencionar la presencia de algunos túbulos del mesonefros vecino, que desde esta etapa inicial mantienen estrecha relación con la gónada.

Por lo tanto, el estado indiferenciado de la gónada corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las CGP y a la proliferación de células somáticas de la región urogenital, que darán origen tanto al tejido epitelial, como al tejido estromático, que constituyen a su vez los elementos histológicos precursores del ovario o del testículo en hembras o machos respectivamente.

1.2.3 Genes involucrados en el desarrollo de la gónada (Tabla 1)

Sry

En el ratón de 11 *dpc*, las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas, pero en el caso de los machos genéticos ya existe una diferenciación de la gónada a nivel molecular. Es decir, a partir de los 10.5 *dpc* se inicia la expresión del gen determinante del testículo, denominado *Sry* en ratón (Koopman *et al.*, 1990) y *SRY* en humanos (Berta *et al.*, 1990) y se continúa hasta los 12.5 *dpc*, momento en el cual se inicia la diferenciación histológica del testículo.

Este gen reúne todas las propiedades biológicas y genéticas esperadas del factor determinante de la diferenciación testicular. En el caso del ratón su identidad se confirmó plenamente al generar ratones transgénicos a los que se les introdujo un fragmento de ADN con el gen *Sry*. Aunque el *SRY* consiste de una secuencia de 35 kb en humanos, un

fragmento de sólo 14 kb del *Sry* del ratón, fue capaz de inducir la formación de testículos en hembras genéticas (Koopman *et al.*, 1991). Como se sabe que el gene *Sry* codifica para una proteína que se asocia al ADN, se asume que su acción es intracelular y no se difunde. Por lo tanto, es probable que controle la expresión de otros genes en la misma célula, modificando así su comportamiento fisiológico. Dicha modificación pudiera ser la producción de un factor o factores responsables de los diversos cambios morfogénéticos necesarios para la diferenciación del testículo a partir de la gónada indiferenciada.

Sox9

Los estudios en humanos que muestran diferentes tipos de reversión sexual han sido uno de los caminos más exitosos para el hallazgo de genes importantes para el desarrollo sexual. El análisis de mutaciones de pacientes que presentan displasia campomélica, un síndrome de malformación de los huesos y reversión sexual, indicó que un gene relacionado con el *SRY*, el *SOX9* se encuentra involucrado con el desarrollo de los huesos y la determinación del sexo (Foster *et al.*, 1994).

Para establecer el papel del *SOX9* en la determinación del sexo en los vertebrados, Kent *et al.* (1996) analizaron su patrón de expresión durante el desarrollo de las gónadas en el ratón. El RNAm de *Sox9* se encontró en las crestas genitales de ambos sexos (10.5 *dpc*). Sin embargo, a los 11.5 *dpc*, la expresión de *Sox9* difiere entre los dos sexos observándose sólo en los machos. Su distribución se observa en los cordones sexuales de los testículos en desarrollo.

CGP purificadas no expresan *Sox9*, por lo que su expresión se restringe a las células de Sertoli. El patrón de expresión se mantiene en el testículo durante la vida fetal y adulta y también se detecta en células que rodean a los conductos Mülllerianos y en el epidídimo. El tiempo y especificidad del tipo celular en que se expresa *Sox9* sugiere que puede ser regulado por el *Sry*. Al ser *Sox9* un factor de transcripción con un motivo de unión al ADN es probable que active genes involucrados en el desarrollo testicular.

Wt-1

El gen *Wt-1*, codifica para un factor de transcripción por sus dominios de dedos de Zinc y regiones ricas en prolinas y glutaminas. Las evidencias de que *Wt-1* es importante para el desarrollo gonadal se desprenden de estudios realizados en humanos. Individuos

heterocigotos con malformaciones genitales presentan mutaciones en el gen *Wt-1* (Hastie, 1992). En estudios realizados por Armstrong *et al.* (1992) en el ratón, se demostró que el sitio predominante de expresión de este gen en el embrión está confinado al riñón y la gónada. Su expresión se detecta primero a los 9 *dpc* y es más evidente a los 12 *dpc*, en esta etapa, en individuos homocigotos a la mutación de *Wt-1*, el desarrollo gonadal es inhibido. A los 12.5 *dpc* no se detecta expresión de *Wt-1* en el tejido gonadal (Kreidberg *et al.*, 1993), lo cual sugiere, que el *Wt-1* está involucrado en algunas vías que llevan a la transformación de las células somáticas del blastema gonadal en células epiteliales, las cuales más tarde darán origen a las células precursoras de Sertoli o foliculares en machos o hembras respectivamente.

Existe la posibilidad de que *Wt-1* actúe como un factor de transcripción regulando la expresión del *Sry*. No obstante, la expresión temprana de *Wt-1* a los 9 *dpc* y su distribución en el complejo urogenital, sugiere que otros genes pudieran estar involucrados durante el establecimiento y diferenciación de la gónada.

SF-1

El factor esteroidogénico 1 (SF-1), inicialmente se aisló como un regulador de la expresión de hidroxilasa en células corticales de la adrenal y células de Leydig (Luo *et al.*, 1994). Sin embargo, en otros estudios la expresión de este factor se detectó entre los 9.5 y 12.5 *dpc* en las gónadas tanto de machos como de hembras. Entre los 13.5 y 16.5 *dpc*, los niveles de expresión de SF-1 se detectan en el intersticio y en los cordones seminíferos de los machos. En contraste, en el caso de las hembras no se detecta ninguna señal de expresión (Ikeda *et al.*, 1993). Estos resultados demuestran que SF-1 se expresa en la gónada bipotencial, lo cual sugiere que este gen puede jugar un papel importante durante las etapas tempranas del desarrollo gonadal.

En estos mismos estudios se realizó mutación dirigida del gen *Ftz-F1*, el cual codifica para SF-1, y se observó que todos los ratones deficientes de SF-1 muestran genitales internos y externos de hembra y no hay presencia de tejido gonadal o glándulas adrenales independientemente de la presencia del cromosoma Y. A los 10.5 *dpc*, la cresta genital se observa con apariencia normal, aunque la región de la gónada es más pequeña comparada con los animales normales. A los 12.5 *dpc* el tejido gonadal es escaso y las pocas células que permanecen muestran características de células apoptóticas. Estas características sugieren que el SF-1 actúa de una manera similar a *Wt-1* (Kreidberg *et al.*, 1993). En base

a esto, es probable que SF-1 active la expresión de otros genes durante el desarrollo gonadal temprano.

Zfy-1

El gene *ZFY* (zinc-finger gene on the Y chromosome), inicialmente se identificó como el factor determinante del testículo (TDF) por presentar un dominio similar a los reportados en factores de transcripción, sugiriendo que la proteína interactuaba específicamente con el DNA regulando la transcripción de otro gene en la vía que controla la diferenciación de la gónada masculina (Page *et al.*, 1987). Sin embargo, en años subsiguientes se acumularon evidencias que excluyeron a *ZFY* como TDF (Bull *et al.*, 1988; Sinclair *et al.*, 1988).

Posteriormente, se descubrieron cuatro genes homólogos a *ZFY* en el ratón: *Zfy-1* y *Zfy-2* localizados en el cromosoma Y, *Zfx* en el cromosoma X y *Zfa* en el cromosoma 10 (Koopman *et al.*, 1990). El patrón de expresión de estos genes ha sido parcialmente establecido. *Zfx* es expresado en todos los órganos examinados (Mardon *et al.*, 1990), mientras que los otros miembros de esta familia presentan un patrón de expresión más restringido. *Zfa* sólo se expresa en el testículo adulto (Ashworth *et al.*, 1989). *Zfy-1* y *Zfy-2* se expresan en células germinales del testículo adulto (Zwingman *et al.*, 1993).

En estudios realizados por Zambrowicz *et al.* (1994) observaron que *Zfy-1* se expresa en la cresta genital tanto de machos como de hembras iniciando entre los 10 y 11 *dpc*, aumentando entre los 12 y 13 *dpc* y disminuyendo hacia los 15 *dpc*. Su expresión en la cresta genital se restringe a las células somáticas, probablemente en las mismas células donde se expresa el *Sry*, células precursoras de las células de Sertoli del testículo adulto y células de la granulosa del ovario adulto.

Hox 5.2

Los genes *Hox*, presentan secuencias conservadas de ADN y se han relacionado con mutaciones homeóticas y de segmentación en *Drosophila*, pero también se han detectado en el genoma de los vertebrados. En el ratón se han agrupado en cuatro complejos: HOX-1, HOX-2, HOX-3 y HOX-5, localizados en los cromosomas 6, 11, 15 y 2 respectivamente. El patrón de expresión de estos genes se ha estudiado por hibridación *in*

situ (Dollé y Duboule, 1989) y la observación general es que la transcripción de los genes *Hox* se inicia muy temprano en el desarrollo desde los 7.5 *dpc*.

Featherstone *et al.*, (1988) clonaron cuatro genes pertenecientes al complejo HOX-5 y mostraron que éste contiene tres homeógenos: *Hox-5.1*, *Hox-5.2* y *Hox-5.3*. Estudiando los dominios de expresión tanto de *Hox-5.2* y *Hox-5.3* se encontró que ambos se encuentran en el sistema nervioso central y en células mesenquimáticas del esbozo de las extremidades en etapas tempranas del desarrollo (9 *dpc*). Sin embargo, *Hox-5.2* es expresado específicamente en gónadas de machos y hembras desde los 10 *dpc* en las células somáticas. A los 12 *dpc* en el caso de los machos, la marca se detecta en la corteza, mientras que en los cordones seminíferos es negativa. En el caso del ovario, el patrón de hibridación se encuentra distribuido completamente en la corteza ovárica. La expresión de *Hox-5.2* permanece en las células somáticas de machos y hembras en la edad adulta, y en el caso de los machos es restringida a las células de Leydig (Dollé y Duboule, 1989). Estas observaciones sugieren que la proteína *Hox-5.2*, además de su probable papel posicional en el eje rostro-caudal, pudiera estar involucrada en otros procesos tales como la regionalización de la especificación del tipo celular durante la diferenciación gonadal, así como durante procesos inductivos o de determinación del linaje celular.

Dax1

El cromosoma X también se ha implicado en la determinación del sexo con la identificación de individuos con reversión sexual de macho a hembra, los cuales acarrean duplicaciones del brazo corto del cromosoma X (Xp) (Bardoni *et al.*, 1994). Los genes que se localizan en esta región duplicada escapan a la inactivación de uno de los cromosomas X y por lo tanto, están presentes en una dosis doble y funcional. La región duplicada de Xp parece contener un gen (o genes) que interfieren con la formación del testículo cuando su producto está presente al doble del nivel normal -el locus se denominó DSS (reversión sexual sensible a la compensación génica)-. DSS se ha mapeado para una región de 160 kb del cromosoma humano Xp21, el cual incluye el locus de la hipoplasia congénita adrenal (AHC). Aunque éste puede interferir con la determinación testicular cuando está duplicado, no es esencial para la diferenciación del testículo. Sin embargo, puede ser requerido para el desarrollo del ovario y para promover tanto la diferenciación de células ováricas como para reprimir la diferenciación de tipos celulares testiculares.

Un gene aislado del locus DSS (DAX-1) se encontró que codifica para un nuevo miembro de la familia de receptores de hormonas nucleares (Muscatelli *et al.*, 1994). La expresión de Dax1 se detectó primero en las células somáticas de la cresta genital a los 11.5 *dpc* tanto en machos como en hembras. Los niveles de expresión decrecen conforme se forman los cordones testiculares (12.5 *dpc*). En el caso de las hembras, Dax1 continúa expresándose en la gónada después de los 12.5 *dpc* y a los 14.5 *dpc* la señal es restringida a la región proximal del ovario con el mesonefros.

En el testículo, Dax1 se detecta en las células de Leydig. En el ovario, la señal se detecta en células del estroma, las cuales incluyen a células de la teca (Swain, 1996). La expresión de Dax1 a los 11.5 *dpc* en ambos sexos, sugiere que no está directamente reprimido por el *Sry*. Sin embargo, el *Sry* pudiera estar interfiriendo con la actividad de Dax1 más que con su expresión. Las células positivas para Dax1 muestran una distribución dentro de las gónadas que se puede interpretar como un marcador de células indiferenciadas. Estas células desaparecen rápidamente en el testículo, y permanecen por más tiempo en el ovario especialmente en una región adyacente al mesonefros (Swain *et al.*, 1996). Esta interpretación es consistente con la propuesta de que el *Sry* inicia la diferenciación de la cresta genital hacia testículo, reprimiendo la expresión de Dax1.

TABLA 1

Genes que se expresan al inicio del desarrollo gonadal del ratón.

	9.5 dpc		10.5 dpc		11.5 dpc		12.5 dpc		13.5 dpc		14.5 dpc	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Oct-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Wt-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hox-5.2	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Zfy-1	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Sry</i>												
SF-1	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Sox-9	?	?	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
Dax 1	?	?	?	?	+	+	-	+	-	+	-	+
MIS	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
3BHSD	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
	Gónada Indiferenciada						Diferenciación Sexual					

1.3 Morfogénesis gonadal

1.3.1 Diferenciación del testículo

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual, se detecta en la gónada de los machos. En el caso del ratón, los primeros indicios de diferenciación se observan alrededor del día 12.5 *postcoitum*.

La diferenciación del testículo se inicia cuando los cordones sexuales se separan del epitelio celómico como consecuencia de los arreglos producidos por una invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que provoca la compactación de los cordones, ahora denominados "cordones testiculares". El traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada es un movimiento morfogenético que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un activo depósito de las moléculas que forman la lámina basal (laminina y colágena principalmente). Las células que rodean a los cordones testiculares se aplanan en forma paralela a la lámina basal. Estas células al diferenciarse se les denomina células mioideas, que son las encargadas de la formación de las membranas basales. Ultraestructuralmente se caracterizan por tener un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado y en el espacio extracelular adyacente a éstas, se observa gran cantidad de material fibrilar como colágena y fibronectina (Paranko *et al.*, 1983).

Las células del epitelio interno, es decir, las células de Sertoli, tienen dos funciones principales: el empaquetamiento de las CGP y la síntesis de la hormona anti-Mulleriana (Josso *et al.*, 1977), responsable de la regresión de los conductos Mullerianos. Las células de Sertoli forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplásmicas que rodean a las CGP. Estas células sólo proliferan durante la etapa fetal y por un corto tiempo en el período postnatal.

La síntesis de la hormona inhibidora de los conductos Mullerianos o sustancia inhibidora de los conductos Mullerianos (MIS), es secretada específicamente por las células de Sertoli en testículos fetales y adultos (Cate *et al.*, 1990). MIS es un miembro de la familia de los factores de crecimiento transformante- β (TGF- β) y es la primera sustancia secretada por las células de Sertoli durante su diferenciación. En el ratón, MIS es primero detectado por hibridación *in situ* en testículos fetales a los 12.5 *dpc* y su expresión es independiente de la presencia de CGP (Münsteberg y Lovell-Badge, 1991).

El tiempo y localización de la expresión de MIS correlacionado con la expresión del *Sry*, sugiere que el *Sry* podría expresarse en las células de Sertoli para llevar a cabo su diferenciación y, posteriormente, todos los demás eventos del desarrollo del testículo. En base a esto, el *Sry* podría estar regulando el inicio de la expresión de MIS. En gónadas fetales de rata, se ha encontrado que el producto del *Sry* interactúa con los promotores de MIS y de aromatasa P450 y se ha propuesto que la regulación de estos dos genes directamente controla la diferenciación de la gónada hacia testículo.

Las células del estroma que rodean a los cordones testiculares se diferencian para formar varios tipos celulares: células miodes, fibroblastos, endotelios y células de Leydig, estas últimas son importantes por su actividad endócrina.

Las células de Leydig se diferencian a partir del tejido intersticial y son las que realizan la síntesis de andrógenos en el testículo. Su diferenciación ocurre poco tiempo después de la formación de los cordones testiculares. En el ratón la diferenciación de las células de Leydig se hace evidente a partir de los 14 *dpc*. Se caracterizan por presentar gran cantidad de mitocondrias con crestas tubulares, característicos de células productoras de esteroides. También poseen un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso, gotas lipídicas e inclusiones de glucógeno en su citoplasma (Russo y De Rosas, 1971).

El origen de las células de Leydig es muy controvertido, algunos autores proponen que su diferenciación es a partir del tejido mesenquimático, pero otros sustentan que tienen el mismo origen que las células del epitelio interno e inclusive se ha llegado a postular un doble origen.

1.3.2 Diferenciación del ovario

En etapas tempranas de la diferenciación gonadal del ratón, el ovario no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada, sólo se puede observar un cierto crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y germinales a los 12.5 *dpc*. El ratón presenta lo que se denomina meiosis inmediata, es decir, que se inicia un poco después de la diferenciación sexual de la gónada. Entre los 13 y 14 *dpc* se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. Entre los 15 y 16 *dpc*, la mayoría de los ovocitos se encuentran en etapas de cigoteno y paquiteno, esta

última representada por la presencia de complejos sinaptinémicos. Es durante estas dos etapas que ocurre un proceso de degeneración de algunos ovocitos.

Iniciada la meiosis, principia a su vez el proceso de foliculogénesis, que se define como la formación de folículos primordiales en el ovario de los mamíferos. Los ovocitos se individualizan al ser rodeados por células foliculares y una lámina basal. Dicha individualización se realiza a partir de los cordones sexuales u ovíferos, cuando los ovocitos empiezan a ser separados por células epiteliales precursoras de las foliculares (Merchant, 1984).

El proceso de foliculogénesis se divide en tres etapas (Merchant y Chimal, 1989): i) Los ovocitos se encuentran agrupados, haciendo contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales. ii) Los ovocitos son separados dentro de los cordones por las células epiteliales. iii) Los ovocitos y las células prefoliculares rodeadas por una lámina basal son separados por células del estroma.

La formación de folículos primordiales es dependiente de la presencia de ovocitos. Su ausencia impide que se formen los folículos (Merchant, 1976). Conforme crecen los folículos primordiales, se diferencian varios tipos celulares. Primero aparece la teca interna, formada por células mioideas, fibroblastos y células esteroidogénicas. Por fuera de la teca interna se forma la teca externa formada por tejido conectivo fibroso. Estos tipos celulares hacen del folículo una unidad funcional.

La mayoría de los folículos sufren el proceso de atresia folicular, que parece jugar un papel importante en la diferenciación del tejido intersticial esteroidogénico del ovario conocido con el nombre de glándula intersticial. La atresia folicular ocurre en cualquier momento de la vida del organismo y parece ser que algunas células de la teca interna que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman pequeños acúmulos de células esteroidogénicas localizadas en el estroma (Merchant y Centeno, 1981).

1.4 Interacción entre las CGP y somáticas en el desarrollo gonadal: control del inicio de la meiosis.

Si las CGP son eliminadas durante las etapas iniciales del desarrollo de la gónada por cualquier causa (genética, farmacológica, física, etc.), se ha observado que la gónada indiferenciada se establece normalmente. Asimismo, el proceso de diferenciación sexual

también tiene lugar en las gónadas estériles. Desde el punto de vista funcional, los testículos secretan normalmente los factores necesarios para la diferenciación sexual del tracto y de los genitales externos. En las hembras, sin embargo, la ausencia de las CGP provoca alteraciones en la diferenciación funcional del ovario, lo que a su vez se refleja en una alteración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Merchant-Larios, 1975; Merchant-Larios, 1978).

Probablemente, la diferencia importante que tienen las CGP en los machos y en las hembras se deba a que los procesos de morfogénesis que siguen los testículos y ovarios a partir de la gónada indiferenciada son distintos. Como se describió anteriormente, el testículo se diferencia precozmente, de manera que, tanto las células de Sertoli como de Leydig, inician su actividad secretora cuando las "proespermatogonias", descendientes de las CGP, entran en un período de reposo mitótico. En los ovarios, en cambio, las primeras células que se diferencian son las ovogonias que se transforman en ovocitos al iniciar la meiosis.

El control del inicio de la meiosis embrionaria es uno de los fenómenos biológicos más importantes que ocurren durante el desarrollo gonadal. En el ratón, como en la mayoría de los vertebrados, las células germinales llevan a cabo la meiosis, esta consiste de dos divisiones celulares cada una compuesta por cuatro fases (profase, metafase, anafase y telofase). La primera división es complicada, ya que presenta un período de profase extensa dividida en cuatro estadios (leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno). Aunque la meiosis es fundamentalmente la misma tanto en machos como en hembras, existen diferencias significativas entre las meiosis de ambos sexos.

1) La meiosis en los machos se inicia hasta la pubertad, mientras que en las hembras la meiosis se inicia durante la vida fetal o justo después del nacimiento según la especie.

2) En los machos la meiosis es un proceso constante que se lleva a cabo durante toda la vida posterior a la pubertad. En las hembras, la meiosis se detiene en la fase de diploteno de la primera división y no se continúa sino hasta un poco antes de la ovulación. Además la meiosis en las hembras se detiene por segunda vez en la metafase II y sólo se completa si el ovocito es fertilizado.

3) Las divisiones citoplasmáticas durante la meiosis en los machos son iguales, mientras que en las hembras son desiguales.

Las células germinales primordiales en las hembras genéticas XX del ratón, inician la meiosis poco tiempo después de la diferenciación sexual de la gónada (Byskov, 1979). De acuerdo con Brambell (1927), a los 13.5 *dpc* se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. En estos se observan en el núcleo hebras finas de cromatina unidas a la membrana nuclear (Zamboni, 1972). Entre los 15 y 16 *dpc* la mayoría de los ovocitos se encuentran en etapas de zigoteno y paquíteno, esta última representada por la presencia de complejos sinaptinémicos, formados por el acoplamiento de los cromosomas homólogos.

En el caso de los machos, las células germinales en el testículo temprano reciben el nombre de proespermatogonias (Hillscher y Hillscher, 1978). Estas presentan características que indican que entraron a un período de proliferación activa, seguida por un período de reposo mitótico que se mantiene hasta poco antes de la pubertad. El inicio del reposo mitótico en las células germinales de los machos coincide con el inicio de la meiosis embrionaria en las hembras (Fig. 1).

Algunos autores proponen que este dimorfismo sexual en la conducta de las CGP es el resultado de la predominancia de una de dos sustancias presentes en las gónadas de ambos sexos: una sustancia inductora de meiosis, y una sustancia que previene la meiosis. Sobre las bases de estudios experimentales, Byskov y Saxen (1976), Fajer *et al.* (1979), Grinstead *et al.* (1979), sugieren que la sustancia inductora es producida por elementos derivados del mesonefros (órgano excretor fetal), de acuerdo con estos autores, serían las células somáticas de los cordones ovígeros en el ovario fetal. La sustancia que previene la meiosis sería producida predominantemente por las células somáticas de los cordones seminíferos del testículo fetal.

Observaciones realizadas por Upadhyay y Zamboni (1982), demostraron que CGP XY que no llegaron a la cresta genital y que sobreviven ectópicamente, se diferencian como células germinales XX. Las CGP ectópicas inician la meiosis e incluso llegan a presentar características similares a ovocitos primarios. En base a estas observaciones se propone que todas las CGP tienen un potencial de diferenciación hacia hembra, independientemente de su sexo genético, a menos que llegaran a la gónada masculina, donde su comportamiento sería dirigido hacia un estado de reposo mitótico (Francavilla y Zamboni, 1985).

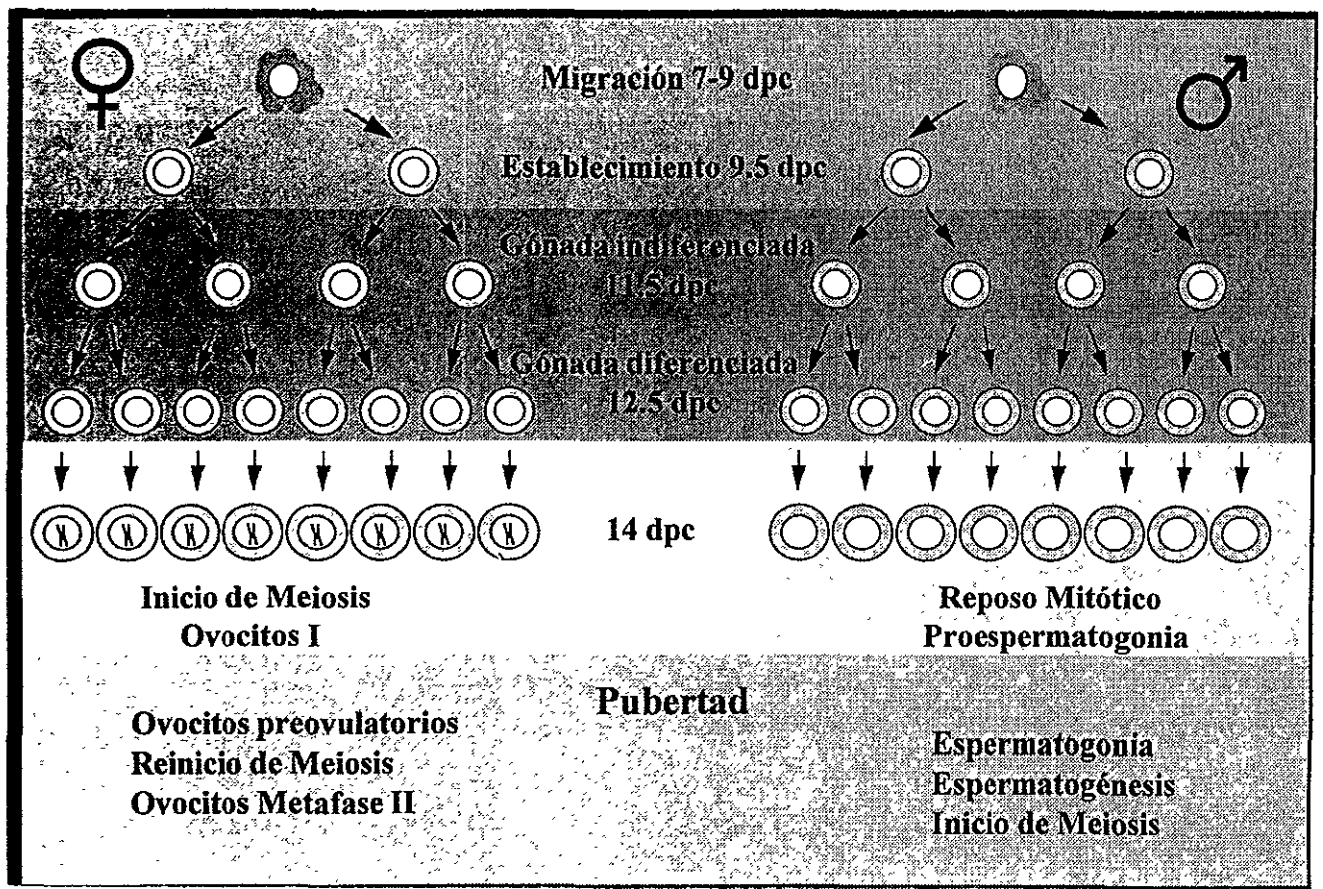


Figura 1.

Representación esquemática de la diferenciación de las células germinales primordiales (CGP) en el ratón. Las CGP migran desde su sitio de origen hacia las crestas genitales entre los 7 y 9 *dpc*, estableciéndose a los 9.5 *dpc*. Durante el período de gónada indiferenciada (11 *dpc*) y las etapas tempranas de diferenciación (12.5 *dpc*) las CGP proliferan activamente por mitosis. En el caso de las hembras genéticas XX, las CGP inician la meiosis poco tiempo después de la diferenciación sexual de la gónada (14 *dpc*). En el caso de los machos, las CGP, ahora denominadas proespermatogonias entran en un estado de reposo mitótico que mantienen hasta la pubertad. La meiosis en las hembras, se detiene en la fase de diploteno de la primera división meiótica y no se continúa hasta un poco antes de la ovulación. El proceso meiótico se detiene por segunda vez en la metafase II, y sólo se completa si el ovocito es fertilizado.

Sin embargo, las CGP ectópicas sólo presentan cierto grado de diferenciación, ya que degeneran y desaparecen posiblemente por la ausencia de células foliculares. Se propone entonces que la diferenciación de las CGP es un proceso autónomo. En efecto, la ausencia de alguna señal de dimorfismo sexual en células germinales extragonadales corresponde con el punto de vista de Tarkowsky (1969), quien sugirió que las células germinales XY son capaces de iniciar la meiosis durante la vida fetal, pero son prevenidas de hacerlo por el tejido somático del testículo.

Estudios realizados posteriormente por McLaren (1984), mostraron que CGP que quedan atrapadas en la región del mesonefros de embriones machos pueden o no iniciar el proceso de meiosis. De aquí se postula que un factor inhibidor de la meiosis (FIM) que actúa a corta distancia es producido en las gónadas de los machos.

Debido a la interacción entre las CGP y las células de Sertoli dentro de los cordones seminíferos, se ha postulado que las células de Sertoli probablemente secretan el FIM (Dolci y DeFelici, 1990). Burgoyne *et al.* (1988), en estudios con quimeras XX-XY, encontraron que las células XX forman parte de la población de células de Leydig, células peritubulares y células del tejido conectivo vascularizado. Sin embargo, la mayoría de las células de Sertoli son exclusivamente XY. En base a estos resultados, propusieron que el *Sry* se expresa en las células de Sertoli para llevar a cabo su propia diferenciación, y que todos los demás eventos del desarrollo del testículo son dirigidos por las células de Sertoli. Se asume entonces que en las células precursoras de Sertoli, el gene *Sry* podría regular la expresión del FIM independientemente del sexo genético de las CGP.

1.4.1 Interacciones y asociaciones celulares en la morfogénesis embrionaria

En la secuencia de acontecimientos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario (morfogénesis, proliferación y diferenciación celular), la superficie celular juega un papel importante. Es la estructura mediante la cual las células reconocen su ambiente, se comunican, reconocen a otras células y se unen para formar tejidos. Estos eventos entre el interior y el exterior de las células, mediados por la superficie celular, dirigen a las células embrionarias en los procesos de morfogénesis y diferenciación celular.

El arreglo espacial, el cambio de sitio de las células migratorias, el ensamblaje y la agregación celular selectiva, son fenómenos muy importante en los procesos

morfogénéticos. Las células embrionarias son capaces de identificar a otras por medio del contacto y de asociarse selectivamente para formar tejidos y órganos. Los experimentos de reagregación de suspensiones celulares han demostrado que las células embrionarias poseen la capacidad propia de autoensamblarse en tejidos. La mayoría de las evidencias que apoyan lo anterior provienen de estudios de reagregación de suspensiones celulares de embriones de ratón y pollo. Sin embargo, este enfoque experimental se remonta hasta estudios realizados con esponjas y embriones de equinodermos a principios de este siglo (Faure-Fremient, 1932; Brien, 1937).

Este modelo experimental se ha utilizado para tratar de entender los mecanismos de regulación que participan en la diferenciación sexual de las gónadas de aves y mamíferos (Muller, *et al.* 1982; Zenzes y Engel, 1981; Grund, *et al.* 1986), en función de que los fenómenos que ocurren durante la reagregación de suspensiones celulares recapitulan los que ocurren durante la morfogénesis normal de la gónada. Con este modelo de disgregación-reagregación es posible analizar varios tipos de interacciones celulares durante el desarrollo gonadal temprano, partiendo de etapas indiferenciadas de la gónada, cuando el *Sry* se está expresando (10.5-12.5 *dpc*), hasta etapas de diferenciación gonadal.

Escalante y Merchant (1992), realizaron un estudio de los patrones de agregación histotípica de testículos fetales a partir del 12.5 *dpc*. Utilizando el método de agregación en cultivo de órganos, observaron que las células somáticas forman patrones histotípicos semejantes a los de gónadas intactas, es decir, la estructuración de cordones seminíferos segregados del compartimento estromático. Sin embargo, la distribución de las células germinales dentro de los agregados se modificó según la edad de los testículos. En estos experimentos de reagregación, se observó que aquellas proespermatogonias que quedan en el estroma, fuera de la influencia directa de las células de Sertoli, sólo en raras ocasiones iniciaron la meiosis.

Dolci y De Felici (1990), trabajando con células disociadas de gónadas fetales de ratón de 12.5 *dpc*, encontraron que muy pocas células germinales iniciaban la meiosis en reagregados de testículos u ovarios. También encontraron que un alto porcentaje de células germinales provenientes de hembras fueron incapaces de iniciar la meiosis cuando células somáticas de machos se añadieron a los reagregados. Sin embargo, en sus condiciones de cultivo, las células germinales de macho no fueron capaces de sobrevivir. Recientemente, McLaren and Southee (1997) estudiando reagregados de gónadas a los 10.5 y 11.5 *dpc* con o sin células de pulmón, encontraron que células germinales de

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diferenciación del sexo en los mamíferos se inicia en la gónada con una serie de interacciones celulares que son el resultado de la cascada de eventos genómicos que conducen a la formación de un ovario o un testículo. Estos procesos se inician muy temprano en el desarrollo y conducen a la diferenciación fenotípica de los genitales internos y externos, así como, del sistema nervioso central.

Desde los estudios clásicos de Alfred Jost (1947) en fetos de conejo, se acepta que la gónada de los machos es la primera en diferenciarse tanto morfológica como fisiológicamente. Al ocurrir esto, las células de Leydig y de Sertoli secretan testosterona y la sustancia inhibidora de Müller respectivamente. Ambos factores son los responsables de la diferenciación sexual de los genitales internos y externos. En ausencia del cromosoma Y, el sexo gonadal es dirigido hacia ovario, el fenotipo de la hembra se lleva a cabo sin un requerimiento de señales gonadales y por lo tanto, en mamíferos, la determinación testicular es equivalente a la determinación sexual. En base a esto, se postuló que un sólo gen ligado al cromosoma Y, conocido como el factor determinante del testículo (TDF), es necesario para comprometer a la gónada bipotencial a desarrollarse en un testículo. Recientemente se ha caracterizado un gen presente en el cromosoma Y denominado *SRY* (humanos) o *Sry* (ratón). Evidencias genéticas y embriológicas demostraron que se trata del TDF responsable de la diferenciación sexual en los mamíferos. Aunque con este hallazgo se dió un gran avance sobre el problema de la diferenciación sexual, quedan aún muchas preguntas por contestar respecto a los mecanismos celulares desencadenados por el gene *Sry* y de su efecto en la morfogénesis y diferenciación de la gónada.

Al conocerse que la proteína del gene *Sry* actúa como un factor de transcripción, se propone que este gene se expresa en las células precursoras de Sertoli y controla la expresión de otros genes en la misma célula, modificando así su comportamiento fisiológico. Dicha modificación pudiera ser la producción de un factor o factores responsables de los diversos cambios morfogenéticos necesarios para la diferenciación del testículo a partir de la gónada indiferenciada. En base a esto, se puede proponer que uno de estos factores pudiera estar controlando el comportamiento de las CGP (Fig. 2).

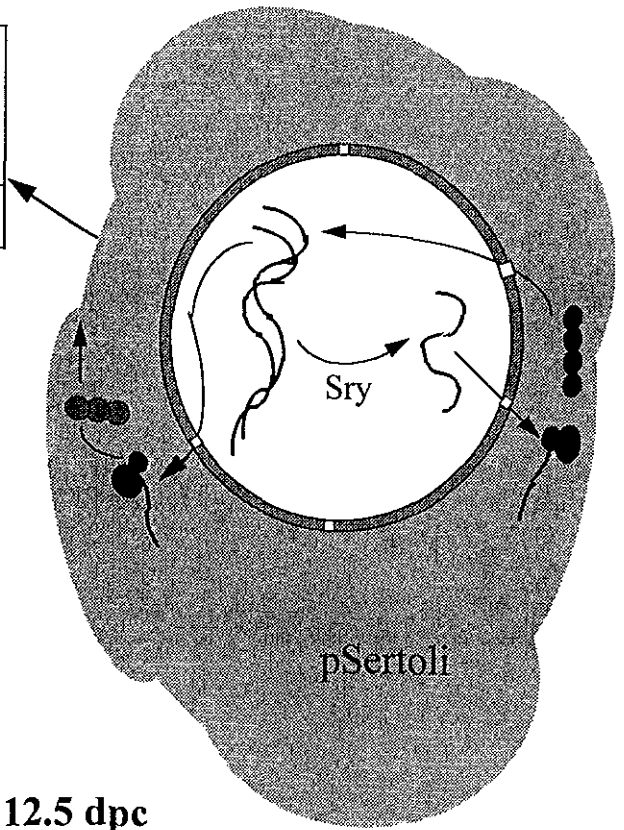
Las CGP en el testículo proliferan mitóticamente y permanecen en un estado de reposo mitótico como proespermatogonias; en el caso de las hembras genéticas, las CGP inician

un período de proliferación activa que culmina con el inicio de la meiosis. El inicio de la meiosis en las hembras coincide con el inicio del reposo mitótico en los machos.

Se propone que este dimorfismo sexual en la conducta de las CGP se debe a algún factor putativo secretado por las células somáticas del testículo. Se ha propuesto que el factor inhibidor de la meiosis (FIM) tendría que ser producido por las células de Sertoli y presentar características de un factor difusible de corto rango. Sin embargo, no se sabe si el hipotético FIM sería capaz de inhibir el inicio de la meiosis embrionaria en las CGP XX tal como lo hace en condiciones normales con las CGP XY. Si las CGP XX responden, se confirmaría la hipótesis de que las CGP no están determinadas antes de la diferenciación histológica de la gónada.

Los estudios experimentales realizados hasta ahora no aportan evidencia clara sobre la interacción de las células germinales primordiales y las células somáticas. No se ha demostrado que en condiciones experimentales de disociación-reagregación, los principales tipos celulares que conforman al testículo en desarrollo (Sertoli y Leydig) se diferencien y sean capaces de secretar los factores requeridos para la diferenciación testicular (MIS, Sox9 y Testosterona).

- 1) Diferenciación de Sertoli
- 2) Cordones Seminíferos
- 3) Células de Leydig
- 4) **Factor inhibidor de Meiosis (?)**



10.5 - 12.5 dpc

Figura 2.

Posibles eventos desencadenados por el SRY. El factor determinante del testículo, Sry, se expresa en las células de preSertoli entre los 10.5 y 12.5 *dpc*. Al ser la proteína del gene Sry un factor de transcripción con un motivo de unión al ADN, se asume que su acción es intracelular y no se difunde. Por lo tanto, este gene controla la expresión de otros genes en la misma célula, lo que puede llevar a la producción de factores responsables de los diversos cambios morfogénéticos necesarios para la diferenciación del testículo. De esta manera, las células de preSertoli dirigirían su propia diferenciación así como, la formación de los cordones seminíferos y la diferenciación de las células de Leydig. Otro de los factores controlados por el Sry pudiera estar inhibiendo el inicio de la meiosis embrionaria en las CGP XY.

3. HIPOTESIS ESTABLECIDAS

(Upadhyay and Zamboni, 1982; Burgoyne, 1988; McLaren, 1995)

Estudios descriptivos realizados en embriones de ratón han sugerido que las Células Germinales Primordiales (CGP) inician la meiosis independientemente del sexo genético. En base a esto, se propone que tanto las CGP XY como las XX están constitutivamente programadas a iniciar la meiosis y formar ovocitos. Sin embargo, se propone que en los machos las células de preSertoli previenen el inicio de la meiosis, manteniendo a las CGP en reposo mitótico e inducen la diferenciación de proespermatogonias.

HIPOTESIS DE TRABAJO

Las CGP se determinan durante el establecimiento de la gónada indiferenciada. Por lo tanto, sólo las CGP XY responden al factor inhibidor de la meiosis proveniente de las células de preSertoli, mientras que las CGP XX probablemente carezcan de un receptor específico a dicho factor.

4. OBJETIVO GENERAL

Establecer si las células germinales primordiales XX y XY de la gónada indiferenciada (11.5 *dpc*) responden al factor putativo inhibidor de la meiosis secretado por las células de preSertoli.

Objetivos particulares:

- A) Diseñar una metodología que permita estudiar *in vitro* las interacciones entre las CGP y las células somáticas en gónadas indiferenciadas (11.5 *dpc*).**
- B) Analizar el papel del mesonefros en la recapitulación de los eventos que llevan a la formación de ovarios y testículos disgregando-reagregando.**
- C) Establecer criterios confiables para analizar en nuestras condiciones experimentales los siguientes procesos:**
 - Diferenciación de las células de Sertoli**
 - Diferenciación de las células de Leydig**
 - Formación de cordones testiculares**
 - Inicio de la meiosis**

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Animales

En este estudio se utilizaron ratones hembras de la cepa CD-I . Se colocaron tres hembras jóvenes con un macho semental durante toda la noche. A la mañana siguiente, se revisaron y separaron las hembras que presentaban un tapón vaginal (formado por las secreciones de las glándulas coagulantes del macho que obstruyen el orificio vaginal), señal de que hubo cópula. Se consideró como día cero de gestación, el día que se registró la presencia del tapón.

Las hembras gestantes se sacrificaron a los 11.5 *dpc* por dislocación cervical, se colocaron en un campo estéril y se les aplicó en el abdomen una solución antiséptica de benzal-álcohol al 70% en una proporción de 1:1. Se extrajo el útero conteniendo a los productos y se colocó en una caja de Petri. Posteriormente, los fetos se aislaron del útero en una campana de flujo laminar, se dejó expuesto el conjunto placenta-feto y se colocaron en medio de Leibovitz's L-15 suplementado con 200 U/ml de penicilina y 200 g/ml de estreptomina, ajustado a un pH de 7.4 y esterilizado por filtración, en un sistema Millipore (0.45 μ M). La edad de los embriones se determinó de acuerdo a la etapa de desarrollo del esbozo de la extremidad anterior, propuesta por McLaren y Buehr (1990) y sólo se emplearon los embriones en etapas 4 y 5 correspondientes a 11 y 11.5 *dpc* respectivamente.

El sexo de los embriones se determinó por presencia o ausencia de cromatina sexual en células amnióticas, de acuerdo a la técnica de Palmer y Burgoyne (1991). Brevemente, se aislaron los amnios y se colocaron en una solución de ácido acético-metanol 1:1 (fijador), se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Los tubos se invirtieron sobre una toalla de papel y se colocó el amnios a unos 2 cm de la base del tubo. Se aplicó una gota de ácido acético glacial al 60% en agua, directamente sobre el amnios, y con ayuda de una pipeta Pasteur sellada por calor, se disociaron las células. Se bloqueó al ácido acético agregando aproximadamente 1 ml de fijador, y se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, y se dejaron aproximadamente 0.5 ml de medio para resuspender el botón de núcleos, los cuales se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 1% en agua. Los núcleos así obtenidos pueden o no presentar el corpúsculo de Barr, el cual corresponde al cromosoma X

inactivo en las hembras. La presencia del 80% o más de núcleos con cromatina sexual en un campo corresponde a un embrión XX (hembra).

5.2 Disgregados-reagregados.

Los embriones ya sexados, se colocaron en una plancha de hule donde se les practicó un corte diagonal en la pared abdominal que abarcó la región media caudal del embrión y dejó expuesto el sistema urogenital. Ambas regiones urogenitales se disectaron y se dejaron con el mesonefros o se aisló la región de la gónada con ayuda de agujas de insulina. Los órganos se disgregaron de acuerdo a la técnica de Escalante y Merchant-Larios (1992). Tres complejos urogenitales o seis crestas genitales aisladas se colocaron en tripsina al 0.25% en solución de Rinaldini durante 10 minutos a 37°C. La enzima se inactivó con 10 % de suero bovino fetal en medio de cultivo McCoy 5a modificado. Las células gonadales se centrifugaron por 3 minutos a 1,500 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo McCoy. Las células disociadas se centrifugaron por 7 minutos en un tubo Eppendorf de 400 µl y el botón celular se obtuvo cortando el extremo posterior del tubo.

Se realizaron cuatro tipos de reagregados:

- 1) Células de gónadas de macho más mesonefros (CgM+Me).
- 2) Células de gónadas aisladas de machos (CgM).
- 3) Células de gónadas aisladas de hembras (CgH).
- 4) Células de gónadas aisladas de hembras más células de gónadas de macho más mesonefros (CgH+CgM+Me).

5.3 Cultivo de órganos

Cada botón de células disgregadas se colocó en cultivo de órganos sobre un filtro de policarbonatos flotando sobre 0.5 ml de medio de cultivo con los siguientes componentes: Medio McCoy 5a modificado, 10% de suero bovino fetal o 10% de suero de ratón obtenido de las madres gestantes (preparado en nuestro laboratorio), 200 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron por 24, 48, 72 y 96 h a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de bióxido de carbono.

5.4 Detección histoenzimática de la $\Delta 5$ -3 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa (3 β HSD)

Para la detección de la diferenciación de células esteroideogénicas (Leydig), se realizó la reacción histoenzimática para determinar la actividad de la 3 β HSD. Transcurrido el tiempo de cultivo, los reagregados se incluyeron en Tissue-Tek y se congelaron a -70°C en hexano dentro de una cámara con hielo seco. Con un crióstato, se obtuvieron cortes seriados de 10 μ m de espesor, los cuales se montaron en laminillas con Vectabond y se colocaron en una cámara de vacío para secar los cortes. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 1 hora con el medio de control compuesto de 20 mg de β -Nicotin Adenin Dinucleotido (β -NAD), 10 mg de Nitro Blue Tetrazolium (NBT) y 20 ml de buffer tris 0.2M a pH de 7.6, o con el medio de detección compuesto por los mismos reactivos del medio de control, pero agregando 2 mg de dehidroepiandrosterona (DHEA). Las laminillas se lavaron con agua destilada, se fijaron con formol neutro y se montaron en un medio acuoso (PBS-Glicerol 1:9).

5.5 Inmunohistoquímica de laminina

Para verificar la formación de cordones seminíferos, así como la localización de las células esteroideogénicas, se detectó la presencia del anticuerpo anti-laminina. La laminina es una glucoproteína sintetizada y secretada por las células epiteliales de las membranas basales, su detección permite estudiar el desarrollo de los epitelios antes de que las membranas basales sean visibles al microscopio de luz.

Brevemente, la técnica consistió en remover cuidadosamente los cubreobjetos después de de la reacción de la 3 β HSD sumergiendo las laminillas en Buffer de Fosfatos (PBS). Los cortes se incubaron en una solución de 1% de albúmina sérica bovina en PBS (Ab-PBS) durante 2 horas, para posteriormente ser incubados durante 2 horas con un anticuerpo policlonal anti-Laminina (Sigma) diluido 1:250 en Ab-PBS. Después de varios lavados con PBS, las muestras se incubaron con el reactivo avidina-biotina acoplada a peroxidasa (Vectastain, ABC kit) por una hora. Después se lavaron nuevamente en PBS, se incubaron los cortes en una solución 50 mM de Diaminobenzidina en Buffer tris-HCl a un pH de 7.4 más 0.3% de H₂O₂ aproximadamente por 10 min. Los cortes se montaron en bálsamo de Cánada-Xileno 1:9.

5.6 Detección inmunohistoquímica de MIS y SOX9

Para observar la diferenciación de las células de Sertoli en los reagregados, se emplearon dos anticuerpos que detectan específicamente la expresión de dos genes importantes en la diferenciación de estas células.

La sustancia inhibidora de los conductos Müllermanos (MIS) se detectó siguiendo la técnica descrita por Taketo *et al* (1991). Los reagregados se fijan en una solución de Zamboni (Zamboni y DeMartino, 1967) durante 3 horas. Después de lavar con PBS, se colocaron en sacarosa al 7% en PBS durante toda la noche. Posteriormente los órganos se deshidrataron en diferentes concentraciones de Polietilenglicol 450 (PEG 450) y se dejaron toda la noche en PEG 1000 a 50°C. Al día siguiente se incluyeron en PEG 1450.

Se obtuvieron cortes en un crióstato de 7 µm de grosor, se pasaron por agua para disolver el PEG y se colocaron en cápsulas. Se inactivó la peroxidasa endógena incubando los cortes en 0.3% de peróxido de hidrógeno disuelto en metanol absoluto por 30 min. Después de lavar con PBS, los cortes se trataron con 1% de Suero normal de Cabra (SNC) en PBS durante 2 horas a 4°C. Transcurrido el tiempo, se incubó el anticuerpo primario policlonal contra MIS (donado por la Dra. Patricia Donahue) 1:250 diluido en SNC-PBS, durante 2 horas. Posteriormente se lavaron en PBS para incubar el reactivo Avidina-Biotina acoplado a peroxidasa por una hora. Después de lavar nuevamente, se incubaron los cortes en una solución de Diaminobenzidina y buffer tris-HCL 50 mM a un pH de 7.4 más 0.3 % de H₂O₂.

Para la detección de la proteína del gene Sox9, los órganos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min, se lavaron en PBS y se dejaron a 4°C durante toda la noche en sacarosa al 30% en PBS. Los tejidos se embebieron en Tissue-Tek y se congelaron a -70°C. Se obtuvieron cortes de 10 µm de espesor y se trataron con 1% de Triton X-100 en agua por 10 min., se lavaron con PBS y se bloquearon con 1% de albúmina (Ab) en PBS durante 2 horas. Los cortes se incubaron con un anticuerpo policlonal contra SOX9 (donado por el Dr. Vincent Harley). Después de lavar con PBS, los cortes se trataron nuevamente con la solución bloqueadora (Ab-PBS) por 15 min. para posteriormente ser incubadas en el anticuerpo secundario anti-rabbit IgG conjugado con Rodamina, diluido 1:250 en Ab-PBS por 1 hora a temperatura ambiente (Da Silva, *et al* 1996). Los cortes se montaron en una solución acuosa (Vectashield, Vector).

5.7 Microscopia de luz y electrónica

Para el análisis de los reagregados a nivel de microscopía de alta resolución, los reagregados se fijaron en una solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) sin calcio (pH 7.4), se postfijaron con 1% de Tetroxido de Osmio (OsO₄) en buffer de Zatterqvist (Zetterqvist, 1956) e incluyeron en Epón 812. Para microscopía de luz, se obtuvieron cortes de 1 µm y se tiñeron con azul de toluidina. Secciones de 60-90 nm se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación al microscopio electrónico.

5.8 Radioinmunoanálisis de testosterona

Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Joaquín Herrera, en el laboratorio de Andrología del Hospital Luis Castelazo Ayala, IMSS.

Los niveles de testosterona secretada por cada reagregado se midieron por radioinmunoanálisis en 0.5 ml de medio de cultivo utilizando el método descrito previamente por Herrera *et al.* (1983). Brevemente, se agregan 1000 cpm de testosterona tritiada ([H³]-T) (trazador) a cada muestra y se extraen con 2X5 ml de éter dietílico. La fase orgánica se separa y evapora. La fase extraída se colocó en un cromoplato de silica gel y se separó con benzeno, benzeno-acetato de etilo, y benzeno-metanol. El extracto purificado fue analizado utilizando un anticuerpo específico. El porcentaje de radioactividad se interpoló en una curva estándar y se correlacionó con el trazador recobrado. Se utilizó la prueba de "t" de Student para el análisis estadístico.

6. RESULTADOS

6.1 Disgregación celular

En los botones celulares procesados después de su disgregación y antes de colocarlos en cultivo de órganos se observó que las células se encuentran separadas y distribuidas al azar. En ocasiones, se detectaron algunas células formando grupos, pero la mayoría se encuentran aisladas, lo que indica que la disociación de las células fue casi completa. Se observaron los principales tipos celulares que constituyen al órgano en esta etapa del desarrollo de la gónada como las células germinales y las células somáticas (Fig. 3A).

A nivel del microscopio electrónico, se observó que la superficie celular de las células somáticas presenta gran actividad. Las células presentan la formación de múltiples prolongaciones citoplasmáticas de tipo filopodio, es decir, filamentosas. También se observan pseudópodos gruesos de tipo lobopodio (Fig. 3B). Las células somáticas *in situ* sólo en raras ocasiones presentan estas prolongaciones citoplasmáticas, y la presencia de éstas en las células disociadas pudiera ser una respuesta al tratamiento.

6.2 Disgregados-Reagregados

6.2.1 Células de gónadas de macho más mesonefros (CgM+Me)

Al realizar el análisis histológico de los reagregados, se observó que después de 24 horas de cultivo en forma organotípica, las células disociadas empiezan a ser ubicadas en el lugar que ocupan durante las etapas de diferenciación del testículo. Los compartimentos epitelial y estromático empiezan a ser segregados. En este caso, donde la disociación celular de las gónadas se realizó junto con el mesonefros, se observó que las células epiteliales de la región mesonéfrica se reagregan formando los túbulos mesonéfricos (Fig. 4A)

Después de 96 horas de cultivo, se reconstituyeron las características principales que identifican a cada órgano en condiciones de desarrollo normal. De aquí se desprende que desde etapas iniciales de cultivo se lleva a cabo un desplazamiento celular que parece recapitular la morfogénesis del tejido gonadal. Las células de Sertoli y las células germinales se encuentran segregadas, formando los cordones seminíferos, los cuales están

delimitados por una evidente lámina basal que los separa del compartimento estromático. La diferenciación tanto de células mioides como de vasos sanguíneos se lleva cabo formando parte del tejido estromático (Fig. 4B)

La detección de la Sustancia inhibidora de los conductos Mülllerianos (MIS) y de la proteína del gene Sox9, hizo evidente que la diferenciación de las células de Sertoli se lleva a cabo en los reagregados. La distribución de la proteína de MIS se detecta en el citoplasma de las células, mientras que SOX9 se localiza en el núcleo. Estas células de Sertoli se encontraron formando los cordones seminíferos rodeando a las células germinales (Figs. 5A y B). La diferenciación de las células de Leydig también tuvo lugar, y éstas fueron visibles por la detección histoenzimática de la 3 β HSD. La reacción conjunta de la 3 β HSD y laminina mostró que las células de Leydig se localizan en el compartimento estromático rodeando a los cordones seminíferos (Fig. 6A).

A nivel del microscopio electrónico, se observó que los eventos de diferenciación testicular en nuestras condiciones experimentales, recapitulan los eventos tal y como se llevan a cabo en la diferenciación testicular *in situ*. Los cordones seminíferos se encontraron separados de las células estromáticas por la presencia de una membrana basal. Dentro de estos cordones, las células germinales se distinguen claramente por su mayor tamaño y núcleo redondo, así como por la presencia de vesículas con contenido denso ("dense cores") y mitocondrias grandes con algunas crestas tubulares. Las células de Sertoli se localizaron en contacto con las células germinales y presentan un núcleo irregular. Por fuera de los cordones, en el estroma, ocurrió la diferenciación de células mioides, fibroblastos y vasos sanguíneos (Fig. 6B).

6.2.2 Células de gónadas aisladas de machos (CgM)

En los reagregados de gónadas aisladas (CgM), no parece existir una diferenciación testicular tan evidente como en los reagregados con mesonefros (CgM+Me). Al microscopio de luz, las células se encuentran compactadas sin observarse una evidente segregación entre los tejidos epitelial y estromático (Fig. 7A). Sin embargo, al emplear mayor resolución se pudo detectar que las células germinales y epiteliales están formando estructuras semejantes a cordones seminíferos, rodeados por células mioides y vasos sanguíneos. Las células del compartimento estromático adquieren un arreglo compacto diferente al arreglo laxo de los CgM+Me (Fig. 7B).

La detección inmunohistoquímica de laminina claramente confirma que en reagregados de gónadas aisladas, las células epiteliales conjuntamente con células del estroma (mioides y fibroblastos) están secretando los componentes necesarios para la formación de una lamina basal. Sin embargo, su formación no es completa ya que el depósito de colágena es escaso o ausente. En el caso de los reagregados con células mesonéfricas la presencia de fibras de colágena es evidente (Fig. 8B).

Tanto la diferenciación de células de Sertoli como de Leydig se lleva a cabo en los reagregados de CgM, aunque estas últimas en menor cantidad. Las células de Sertoli se encuentran organizadas dentro de los cordones seminíferos (Fig. 8A). Las células de Leydig se detectaron en el compartimento estromático rodeando a los cordones seminíferos evidenciados por la detección de laminina (Fig. 8B).

6.2.3 Células de gónadas aisladas de hembras sin y con mesonefros (CgH / CgH+Me)

En reagregados de CgH cultivados 96 horas, también se pudo observar una recapitulación de las principales características histológicas del desarrollo del ovario. Todas las células somáticas se encontraron organizadas de una manera compacta y entre ellas se localizaron las células germinales. También se observó la reorganización de vasos sanguíneos. En los experimentos de CgH+Me, las células epiteliales de este órgano reconstituyeron los túbulos mesonéfricos. Sin embargo, no se detectaron diferencias estructurales del arreglo de las células gonadales con o sin células mesonéfricas (Fig. 9A).

Como se mencionó anteriormente, la primera manifestación morfológica de diferenciación del ovario la llevan a cabo las células germinales al iniciar la meiosis. En nuestras condiciones experimentales, todas las células germinales también iniciaron la profase de la primera división meiótica. Esto indica que el hecho de disgregar-reagregar no altera el comportamiento de las células gonadales de los dos sexos y siguen su programa normal de desarrollo dependiendo del sexo del embrión. Con ayuda del microscopio electrónico, se corroboró que tanto las células somáticas como las germinales mantienen una estructura compacta. A este nivel de resolución, se observaron los complejos sinaptinémicos en el núcleo de las células germinales. Estas estructuras son las encargadas de unir a las cromátidas de los cromosomas homólogos, características de la profase I de las células que inician la meiosis (Fig. 9B).

6.3 Inicio de la meiosis en reagregados homotípicos (CgM y CgH) y heterotípicos (CgH+CgM+Me)

En reagregados heterotípicos donde se mezclan gónadas XX y XY junto con el mesonefros (CgH+CgM+Me), se encontró que tanto las células de Sertoli como las germinales están formando los cordones seminíferos. Las células epiteliales provenientes de mesonefros de machos forman los túbulos mesonéfricos. En el compartimento estromático, se observa la presencia de vasos sanguíneos, así como, algunas células germinales que no alcanzaron a incorporarse dentro de los cordones seminíferos (Fig. 10A). La diferenciación de las células de Sertoli en estos reagregados heterotípicos se corroboró detectando la proteína del gene Sox9. La actividad de esta proteína se localiza en el núcleo de las células las cuales se encuentran distribuidas formando los cordones seminíferos (Fig. 10B).

Empleando mayor resolución en nuestros reagregados CgH+CgM+Me, se detecta claramente la membrana basal que separa el compartimento epitelial del compartimento estromático. A este nivel, la ubicación tanto de células germinales como de Sertoli es más clara, localizándose dentro de los cordones. De acuerdo a nuestras observaciones en reagregados homotípicos, algunas células germinales dentro de los cordones presentan características muy parecidas a células meióticas (Fig. 11A). A nivel de microscopía electrónica, realizando el análisis de las células ubicadas dentro de los cordones, se encontró que tanto células germinales meióticas, como células germinales en reposo mitótico se localizan dentro de los cordones seminíferos y en contacto con células de Sertoli bien diferenciadas (Fig 11B).

Se realizó un conteo para establecer si las CGP en nuestras condiciones experimentales presentan un comportamiento similar al que ocurre *in vivo*, es decir, si todas las CGP inician la meiosis en las hembras y si entran en reposo mitótico en el caso de los machos. Se utilizó como criterio para detectar a las células germinales meióticas la presencia de complejos sinaptinémicos identificados a nivel del microscopio electrónico.

En reagregados homotípicos de gónadas provenientes de hembras XX se encontró que el 100% de las células germinales llevan a cabo la meiosis (Fig. 9B). En contraste, en los reagregados homotípicos de gónadas provenientes de machos con o sin mesonefros, sólo el 5% de las células iniciaron el proceso de meiosis, mientras que el resto se encontraron en reposo mitótico (Tabla 2).

Realizando el análisis cuantitativo de los reagregados heterotípicos, se encontró que de 140 células germinales, 79 (56.4%) presentaban la formación de complejos sinaptinémico. El resto de las células germinales (61) se encontraban en arresto mitótico. El análisis cuantitativo comparando el porcentaje de células meióticas y en arresto mitótico en reagregados homotípicos y heterotípicos, muestra que la gran mayoría de las células germinales en meiosis se localizan dentro de los cordones seminíferos en los reagregados de CgH+CgM+Me (Tabla 2).

TABLA 2

Porcentaje de células germinales que iniciaron la meiosis en reagregados de gónadas fetales de 11 *dpc*

Tipo de reagregado	Meiosis ^a Prophase I	Estado de reposo	%Meiosis	N ^b
Machos	8	151	5	8
Hembras	185	0	100	6
Machos+Hembras	79	61	56.4	6

^aLas células germinales se consideraron en meiosis cuando se observaron los complejos sinaptinémicos en micrografías electrónicas.

^bNúmero de reagregados en los que se contaron las células germinales

6.4 Radioinmunoanálisis de testosterona

La presencia de las células de Leydig en los reagregados se detectó utilizando la reacción de 3 β HSD, sin embargo, con esta técnica sólo se puede establecer la diferenciación de células esteroideogénicas en general. En nuestras condiciones experimentales, al obtener gónadas en etapa indiferenciada (11-11.5 *dpc*), los precursores de las células de la glándula adrenal están formando parte del complejo urogenital. Como las células de la corteza suprarrenal producen corticoesteroides, utilizan también a la enzima 3 β HSD detectada histoquímicamente.

Para poder eliminar la sospecha de que las células detectadas en nuestros reagregados pudieran ser de la corteza suprarrenal y no de Leydig, se midieron los niveles de testosterona en el medio de cultivo de los reagregados, y de esta manera saber si la diferenciación de las células de Leydig se lleva a cabo en los reagregados.

Utilizando la técnica de radioinmunoanálisis, se encontró que la testosterona es producida en los reagregados con y sin mesonefros provenientes de gónadas de embriones machos. Los niveles de testosterona detectados en el medio fueron alrededor de 200 (CgM) a 230 (CgM+Me) pg/0.5ml. Realizando el análisis estadístico, se observó que las desviaciones estandar se sobrelapan, sin embargo, la prueba de "T" de Student muestra que la producción de testosterona fue estadísticamente diferente ($T=3.66$; d.f.=20; $P<0.05$). Se está produciendo más testosterona en los reagregados con mesonefros, que en las gónadas aisladas (figura 12).

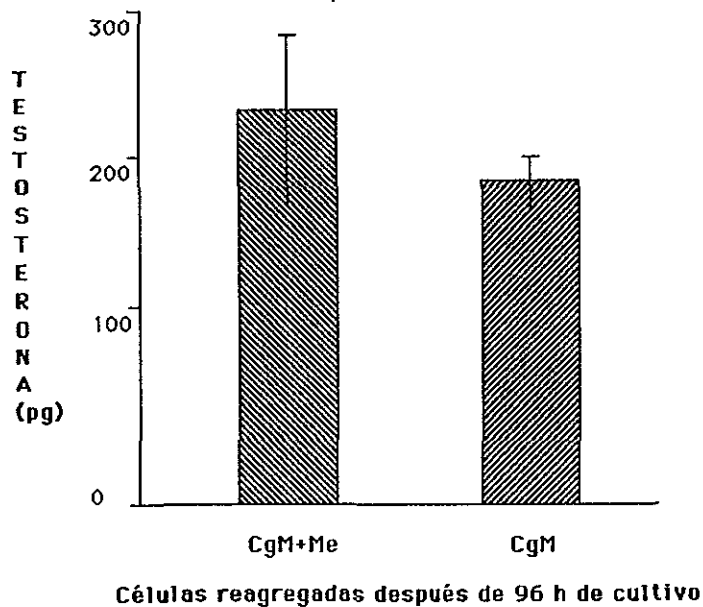


Figura 12

Radioinmunoanálisis de testosterona en el medio de cultivo de reagregados de células de gónadas de macho junto con su mesonefros (CgM+Me) y células de gónadas aisladas de macho (CgM). La presencia de células mesonéfricas incrementa la producción de testosterona. Se grafica el promedio \pm el e.e. La prueba estadística indica que existen diferencias significativas entre los dos tipos de reagregados. $T=3.66$; d.f.=20; $P<0.05$ (T =prueba de "t" para grupos independientes; d.f.=grados de libertad; e.e.=error estandar).

Fig. 3

A) Células disociadas de gónadas XX y XY a los 11.5 *dpc*. Las células germinales (cg), las cuales se distinguen por su gran tamaño y núcleo redondo y las células somáticas (sm) se encuentran separadas y distribuidas de una manera aleatoria. Algunas células forman grupos (flechas). Escala: 100 μ m.

B) Micrografía electrónica de la misma preparación mostrada en la fig. A. Se observan tanto pseudópodos delgados de tipo filopodio (f), como pseudópodos gruesos de tipo lobopodio (lb). Escala 5 μ m.

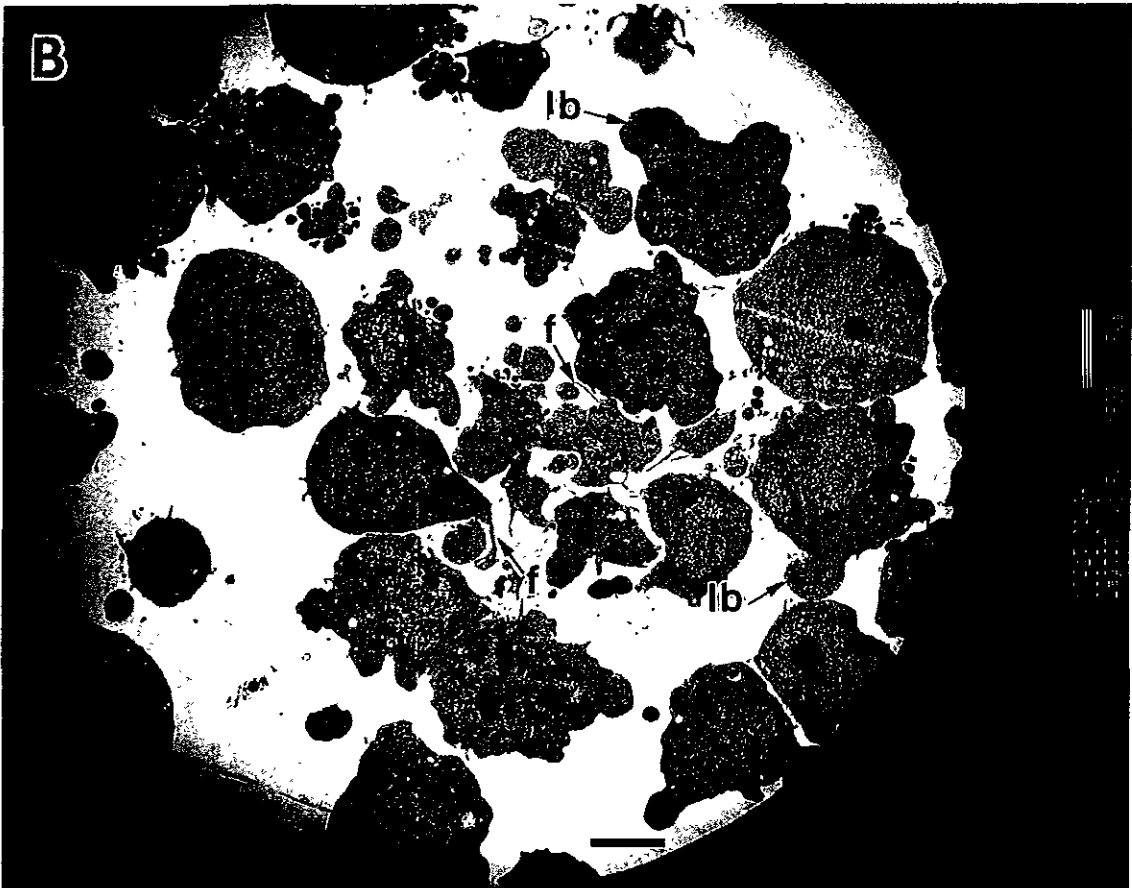
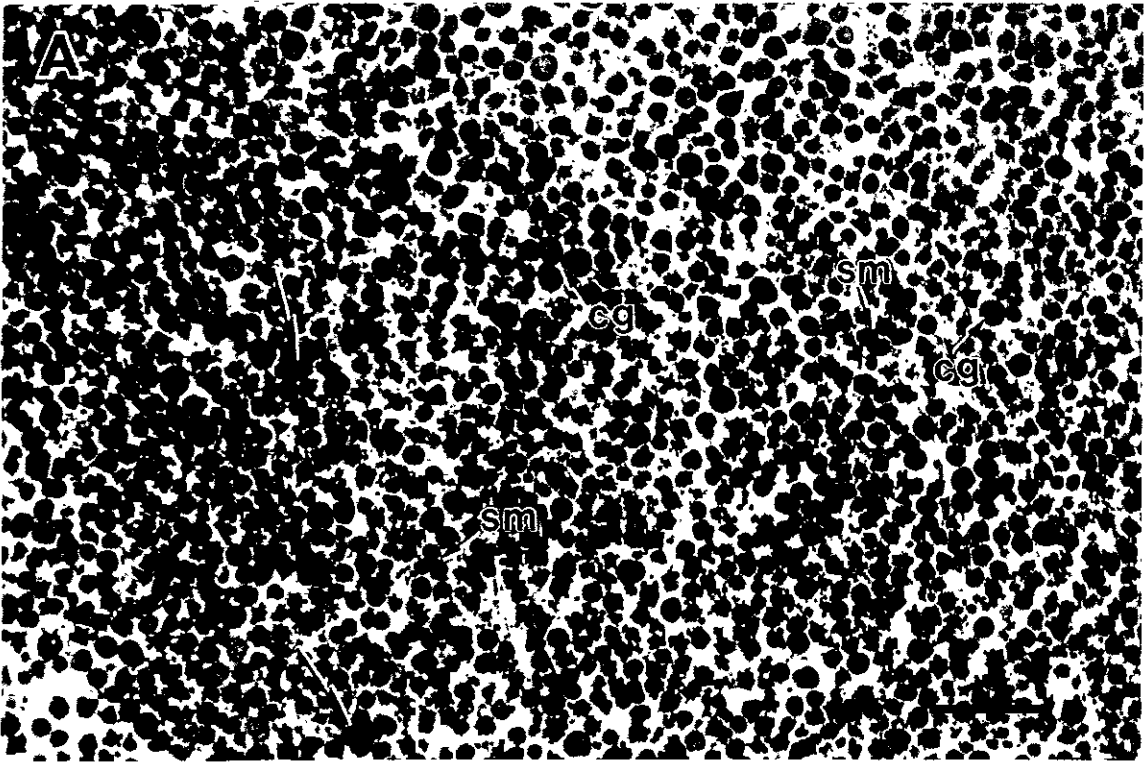


Fig. 4

A) Reagregado de gónadas de machos con mesonefros (CgM+Me) de 11.5 *dpc* cultivado durante 24h. Tanto las células germinales como las células epiteliales empiezan a segregarse formando estructuras semejantes a cordones seminíferos (cs). En el compartimento estromático (es), encontramos diversos tipos celulares de origen mesenquimático. Las células epiteliales mesonéfricas se reagregan formando los túbulos mesonéfricos (tm). Escala: 100 μ m.

B) Reagregado de CgM+Me. Después de 96 h de cultivo, las células germinales (cg) y las células de Sertoli (s) se incorporan dentro de los cordones seminíferos. La formación de una membrana basal (mb) separa el compartimento epitelial (ep) del compartimento estromático (es). Rodeando a los cordones seminíferos se encontraron células mioides (mi) y fibroblastos (f). Las células endoteliales reconstituyen a los vasos sanguíneos (vs) que se observan entre el tejido estromático, donde también algunas células germinales (cg) permanecen. Escala: 24 μ m.

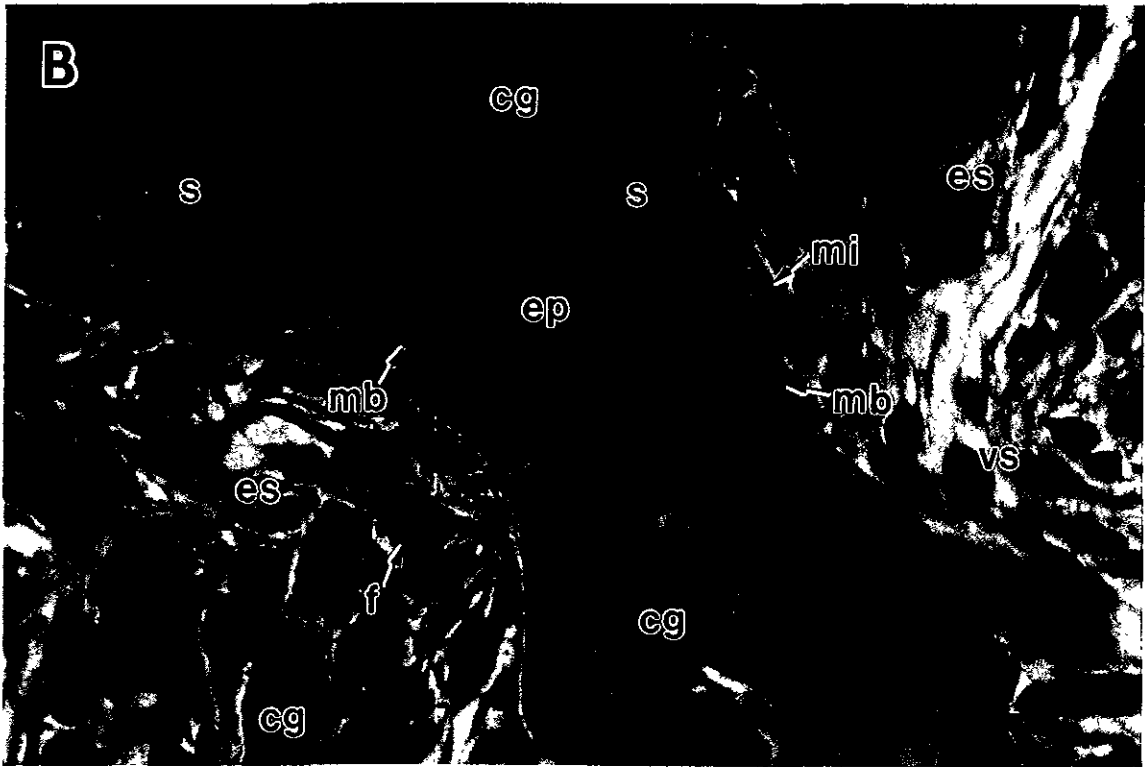
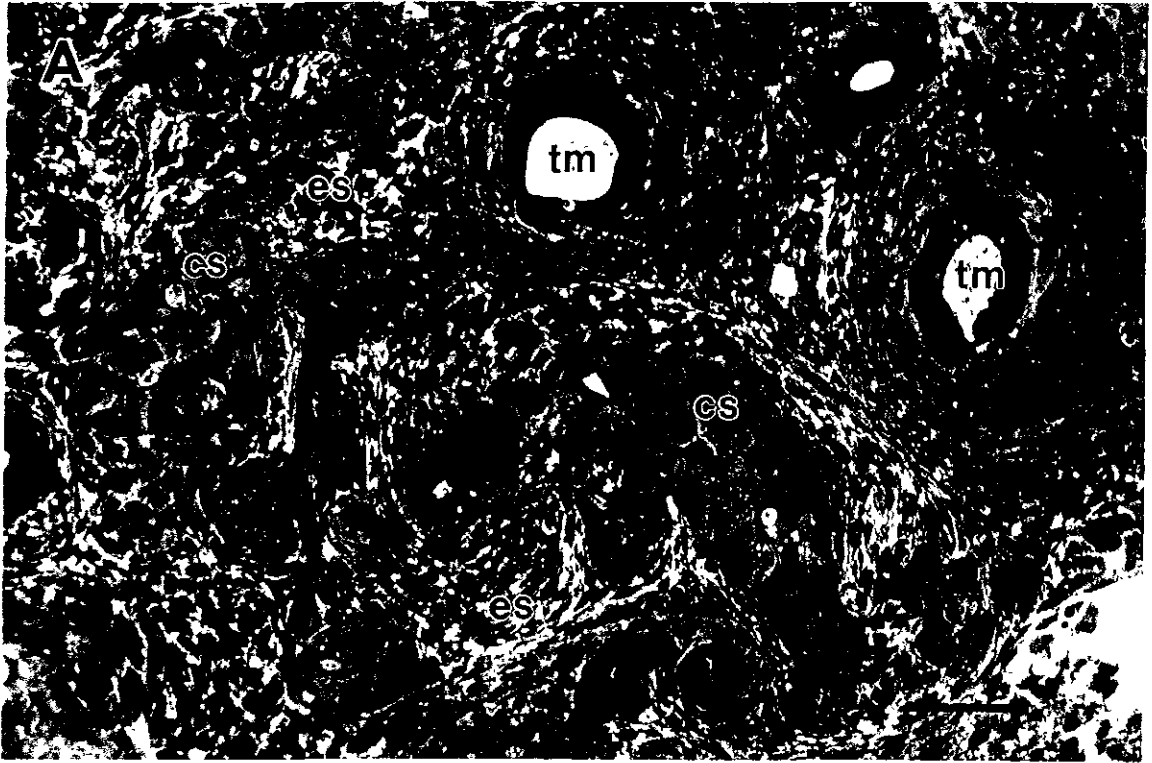


Fig. 5

A) Reagregado de CgM+Me y cultivado 96 h. La detección inmunocitoquímica de la Sustancia Inhibidora de Müller (MIS) en el citoplasma de las células de Sertoli (s), hace evidente la organización de los cordones seminíferos (sc). Escala: 50 μ m.

B) Detección de Sox9 por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-SOX9 en un reagregado formado por CgM+Me. Después de 96 h de cultivo, la proteína SOX9 se mantiene y su expresión se detecta en el núcleo de las células de Sertoli (flechas). Escala: 100 μ m.

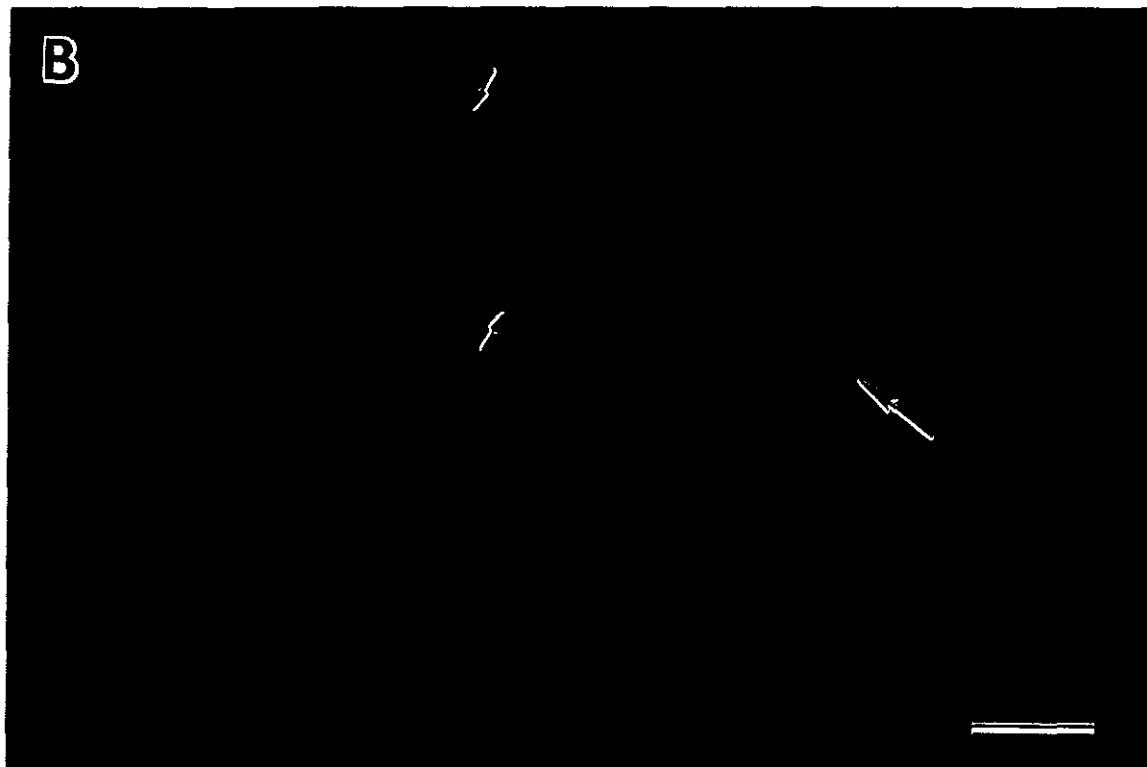
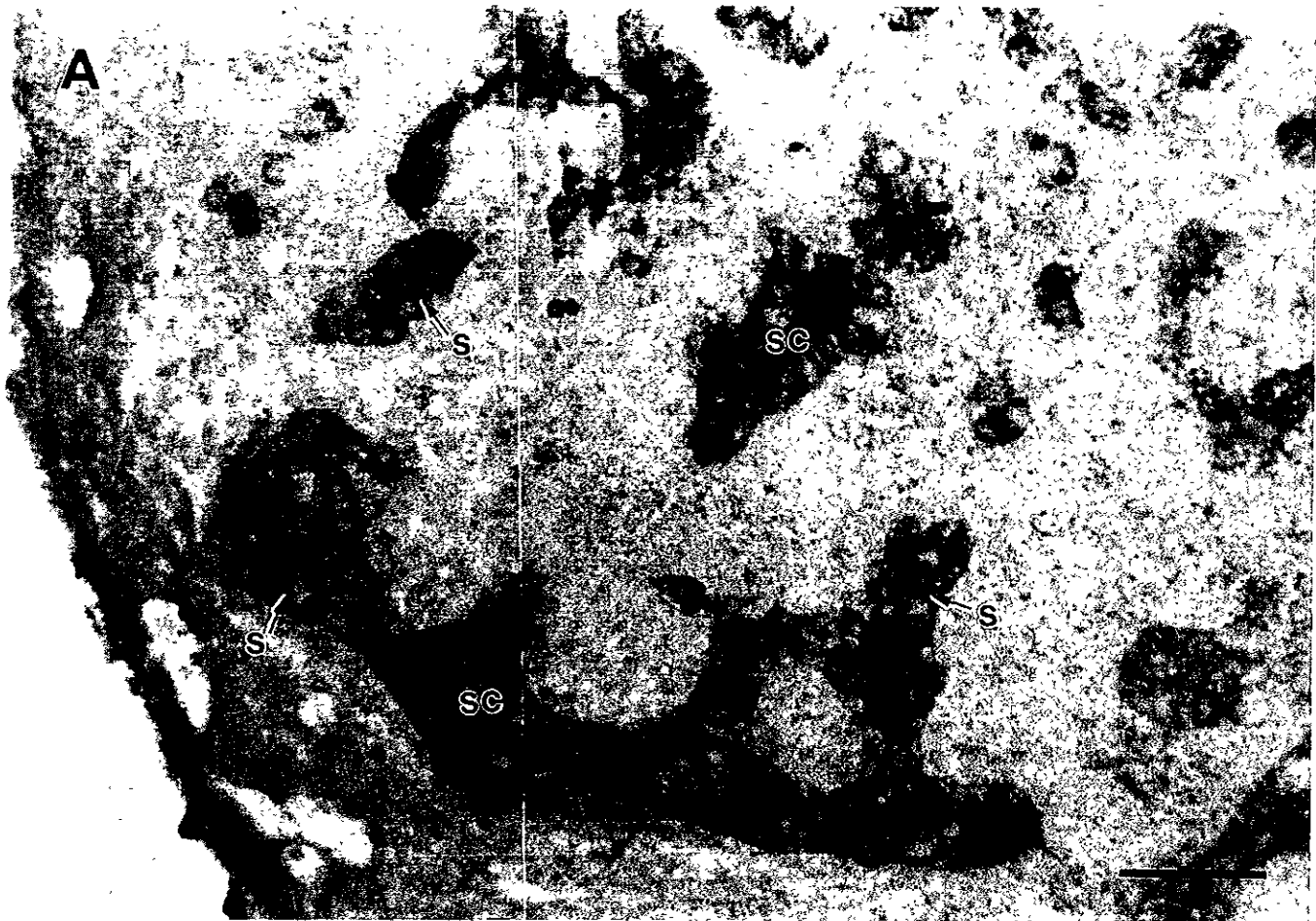


Fig. 6

A) Detección inmunohistoquímica de Laminina en reagregados de CgM+Me mostrando la formación de cordones seminíferos (sc). En el compartimento estromático, la reacción de la 3 β HSD revela a las células de Leydig (le) localizadas tanto en la periferia del reagregado, como en el estroma que rodea a los cordones seminíferos (precipitado violeta). Escala: 50 μ m.

B) Micrografía electrónica del mismo reagregado mostrado en la fig. 2B. Se observa que los cordones seminíferos (sc) se encontraron separados de las células estromáticas por una membrana basal (mb). Dentro de los cordones, las células germinales (cg) se distinguen por su gran tamaño y núcleo redondo. Las células de Sertoli (s) presentan un núcleo irregular. Por fuera de los cordones, en el estroma, aparecen células mioides (mi) y fibroblastos (f). También se localizan algunas células apoptóticas probablemente germinales (ap). Escala 5 μ m.

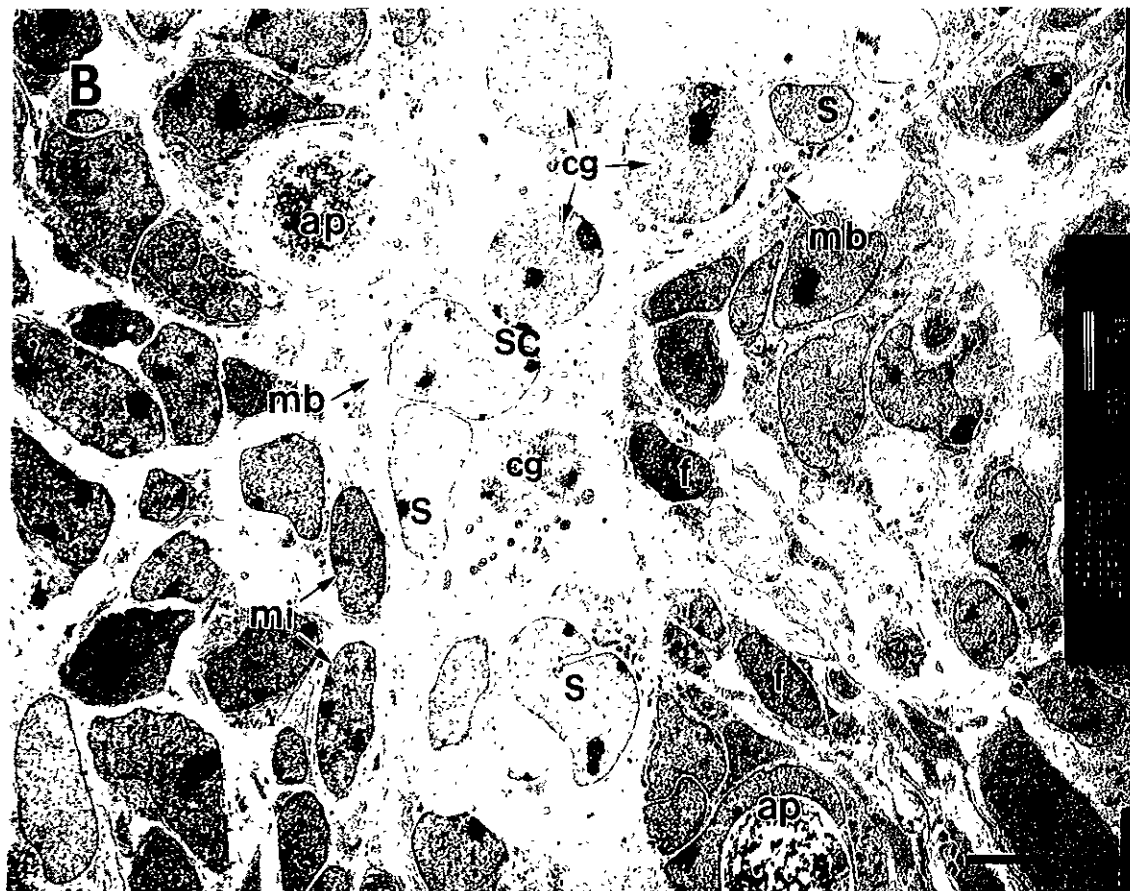
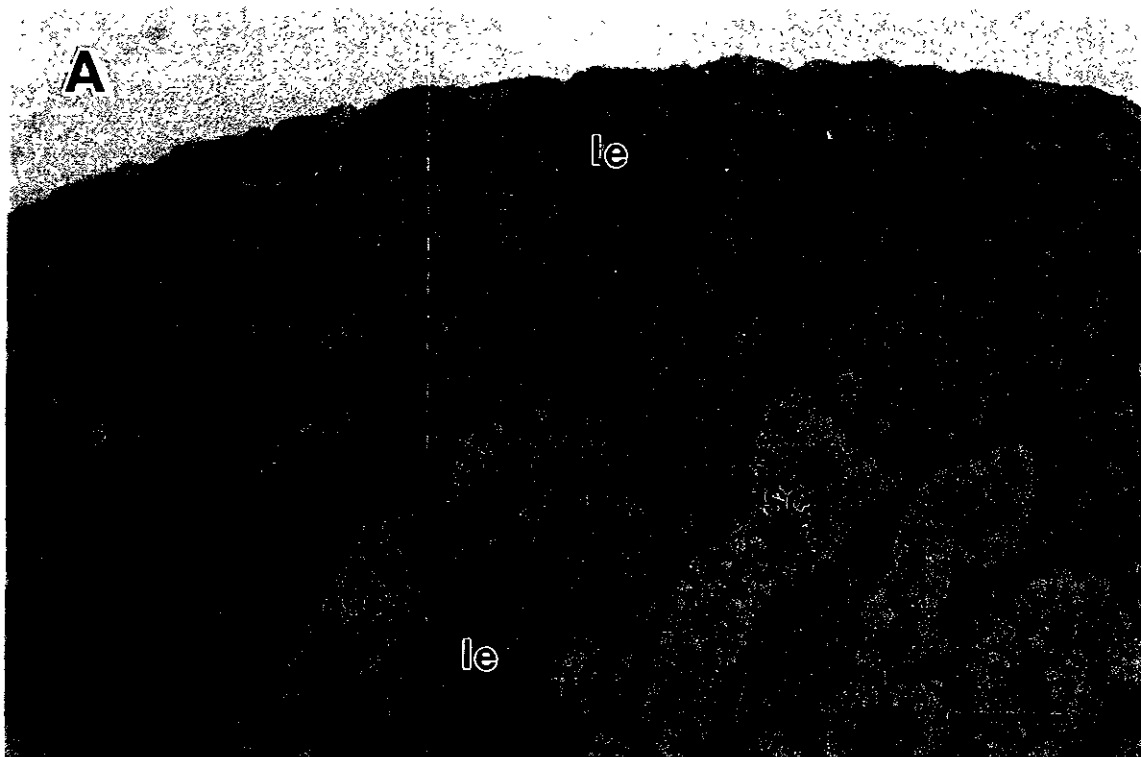


Fig. 7

A) Reagregado de gónadas aisladas de macho de 11.5 *dpc* cultivado 96 h (CgM). Tanto las células mesenquimáticas (me) como las epiteliales (ep) presentan un arreglo compacto. Escala: 100 μ m.

B) Imagen a mayor amplificación del mismo reagregado de la fig.

A. Se observa que las células germinales (cg) y de Sertoli (s) están agrupadas y delimitadas por una membrana basal (mb) que las separa del compartimento estromático (es). Escala: 50 μ m.

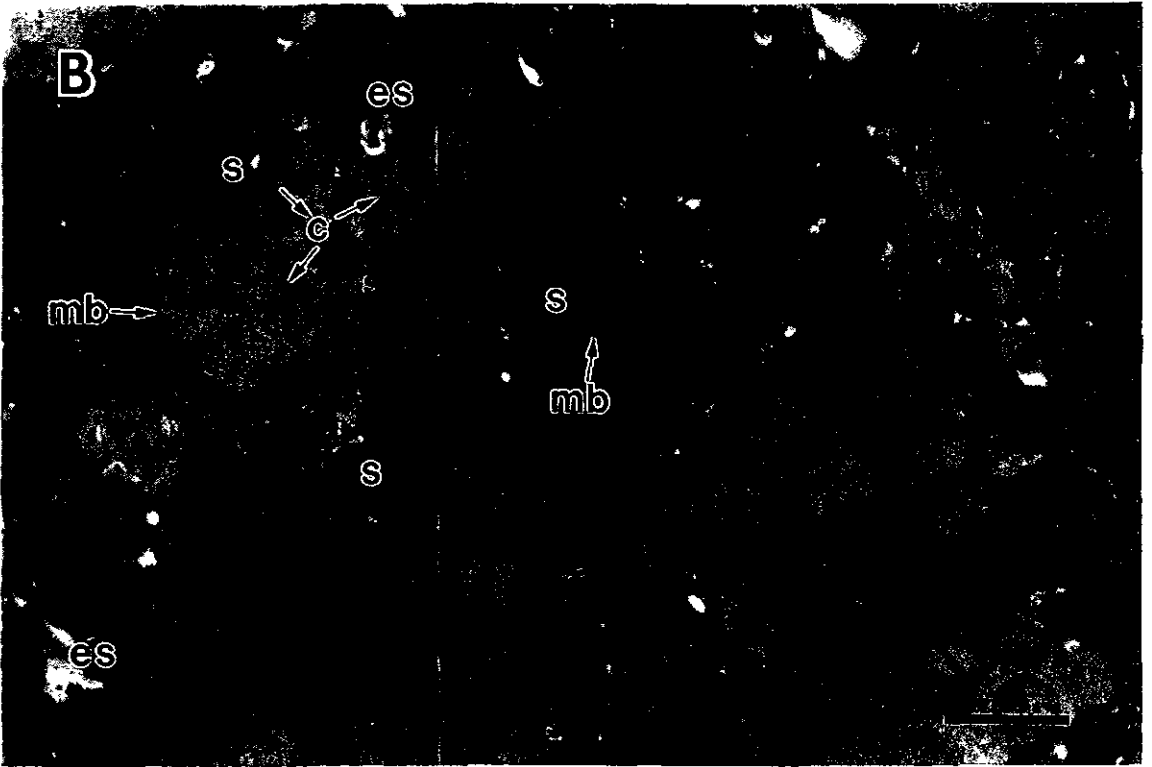
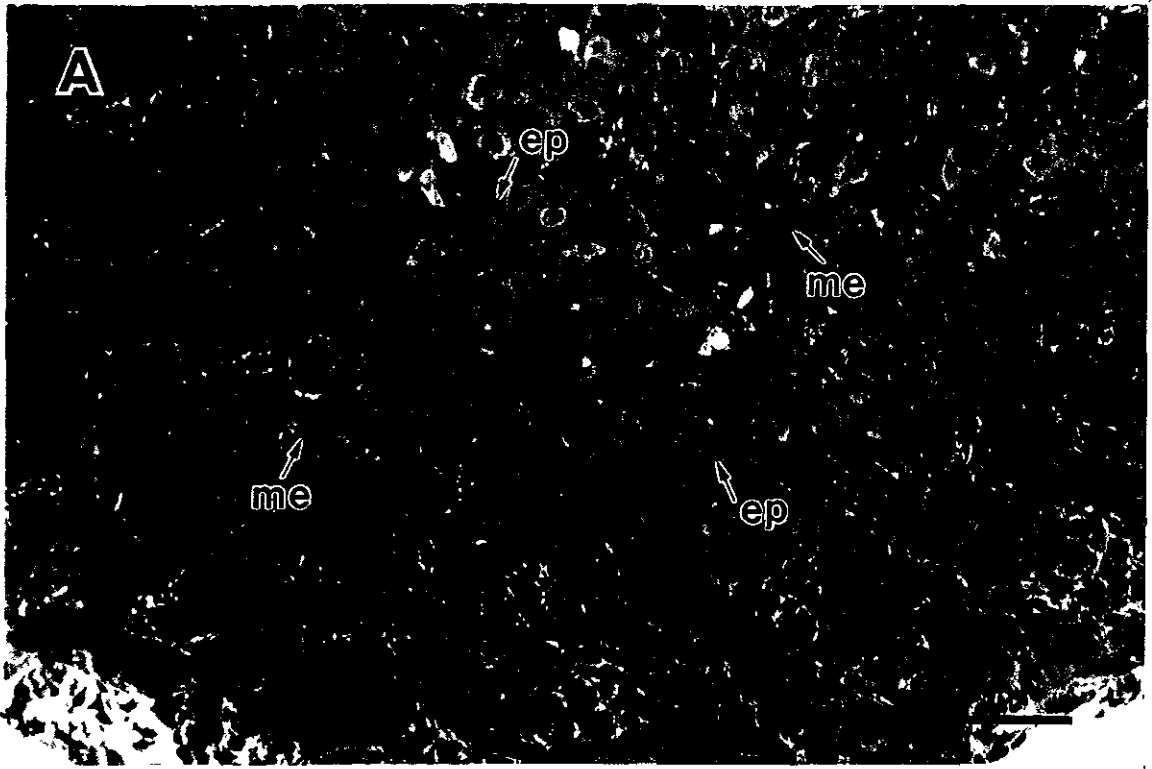


Fig. 8

A) Detección inmunocitoquímica de la Sustancia Inhibidora de Müller en un regregado de CgM. Después de 96 h de cultivo se lleva a cabo la organización de los cordones seminíferos (cs) y la diferenciación de las células de Sertoli (s). Escala: 50 μ m.

B) Detección inmunohistoquímica de Laminina donde se confirma la formación de los cordones seminíferos (cs) en reagregados de CgM. El depósito violeta de formazán revela la actividad de la 3 β -HSD en las células de Leydig (le). Escala: 100 μ m.

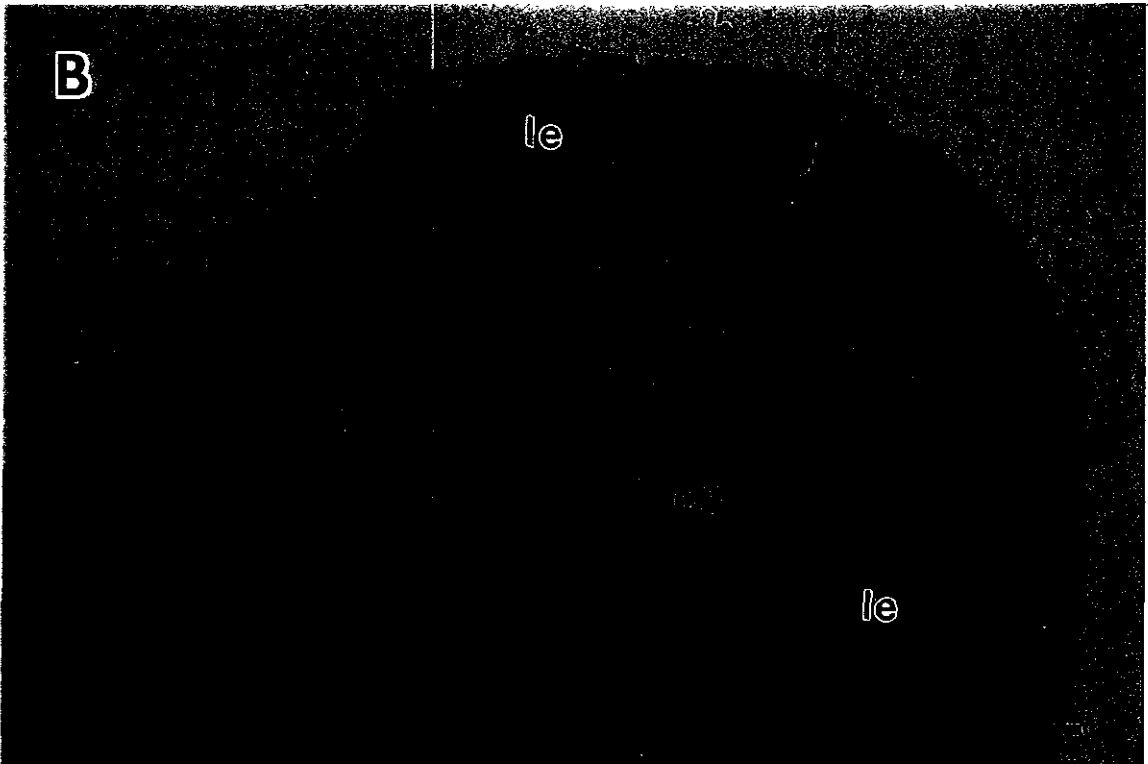
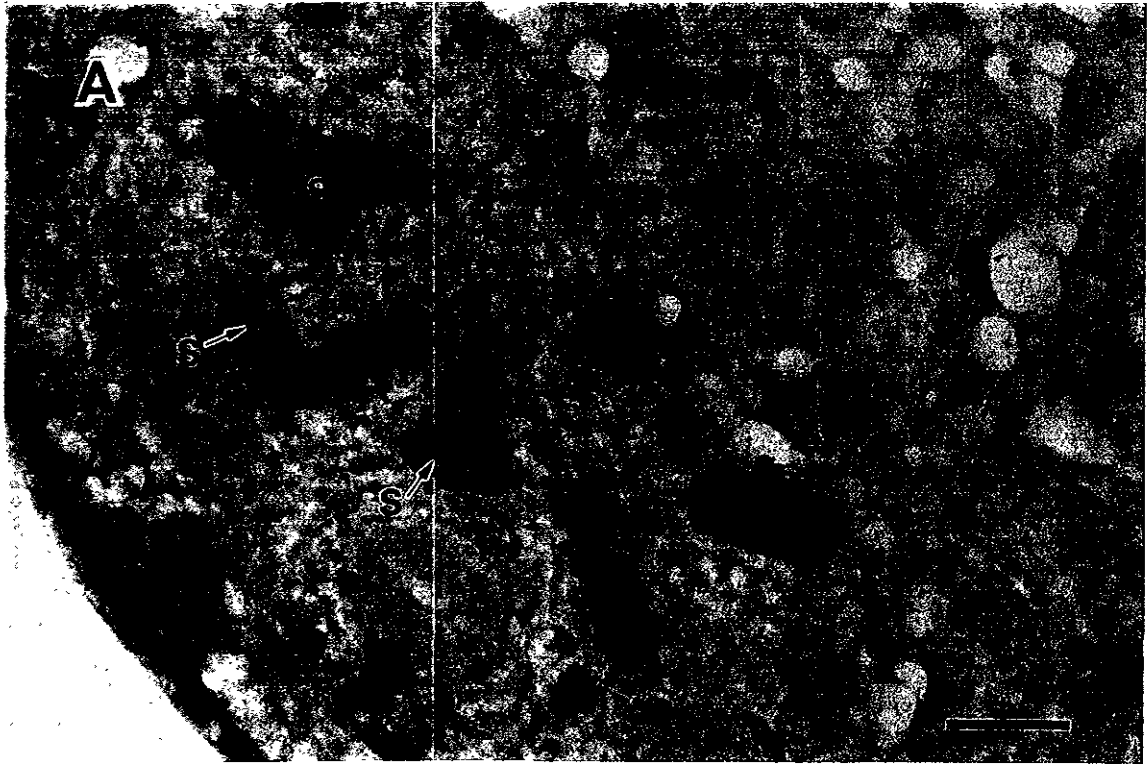


Fig. 9

A) Reagregado de gónadas de hembra cultivado 96 h (CgH). Las células germinales (cg) parecen estar en profase I de la primera división meiótica. Las células somáticas (cs) se encuentran arregladas de una manera compacta alrededor de las células germinales. Se observan células endoteliales formando vasos sanguíneos (flechas) entre células del estroma ovárico (es). Escala: 50 μ m.

B) Micrografía electrónica del reagregado mostrado en la fig. A. A este nivel de resolución se confirma que las células germinales (cg) se encuentran iniciando la meiosis por la presencia de complejos sinaptinémicos (sp) en el núcleo. Las células somáticas (cs) se distinguen claramente por su menor tamaño y núcleo irregular (n). Escala 8 μ m.

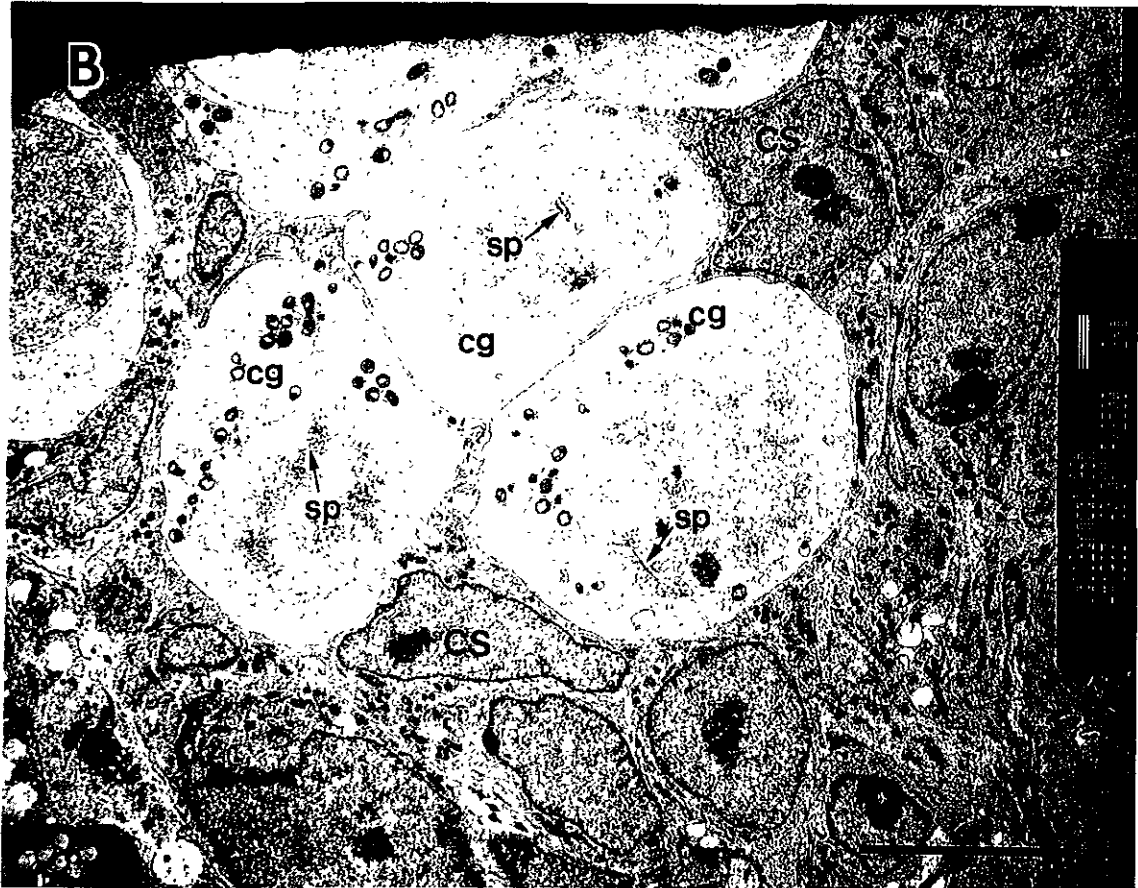
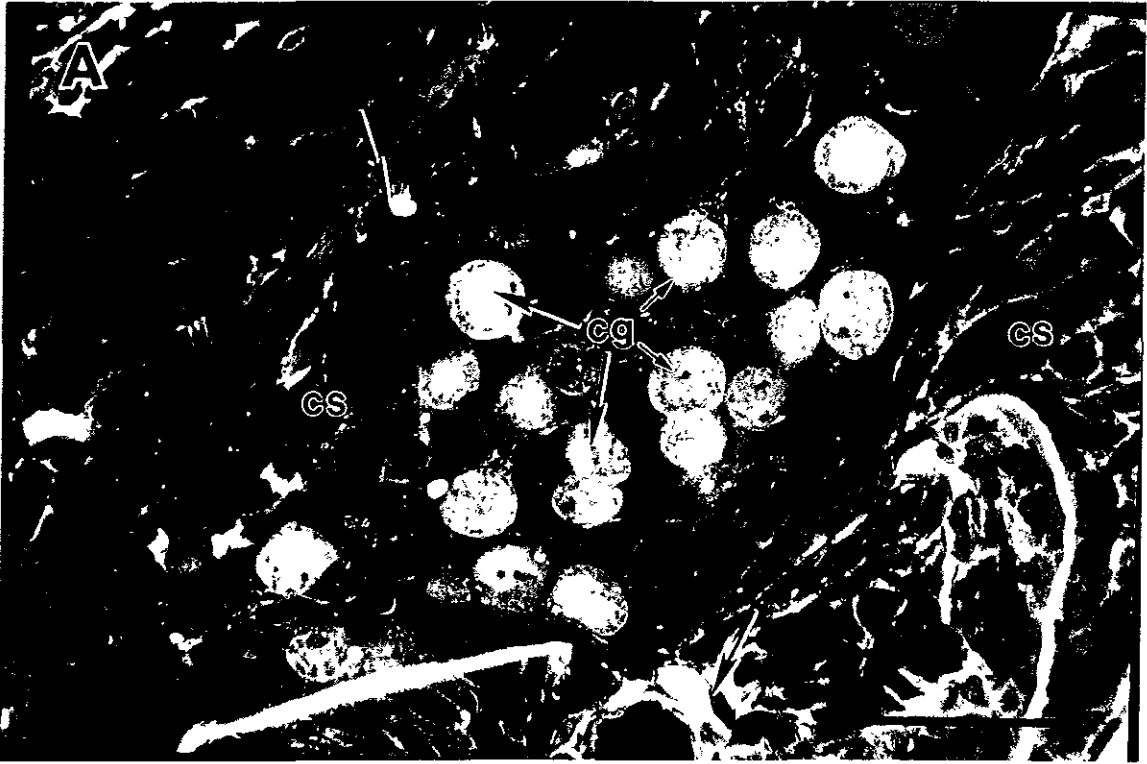


Fig. 10

A) Reagregado heterotípico de gónadas de hembras y machos junto con su mesonefros cultivado 96 h (CgH+CgM+Me). Tanto las células germinales como epiteliales se encuentran segregadas formando los cordones seminíferos (cs). En el compartimento estromático (es) es evidente la formación de vasos sanguíneos (vs), así como la reorganización de algunos túbulos mesonéfricos (tm). Escala: 50 μ m.

B) Detección por inmunofluorescencia de la proteína del gene Sox9 en regregado de CgH+CgM+Me. Las células de Sertoli se detectan positivas y se encuentran formando estructuras semejantes a cordones seminíferos (cs). Escala: 50 μ m.

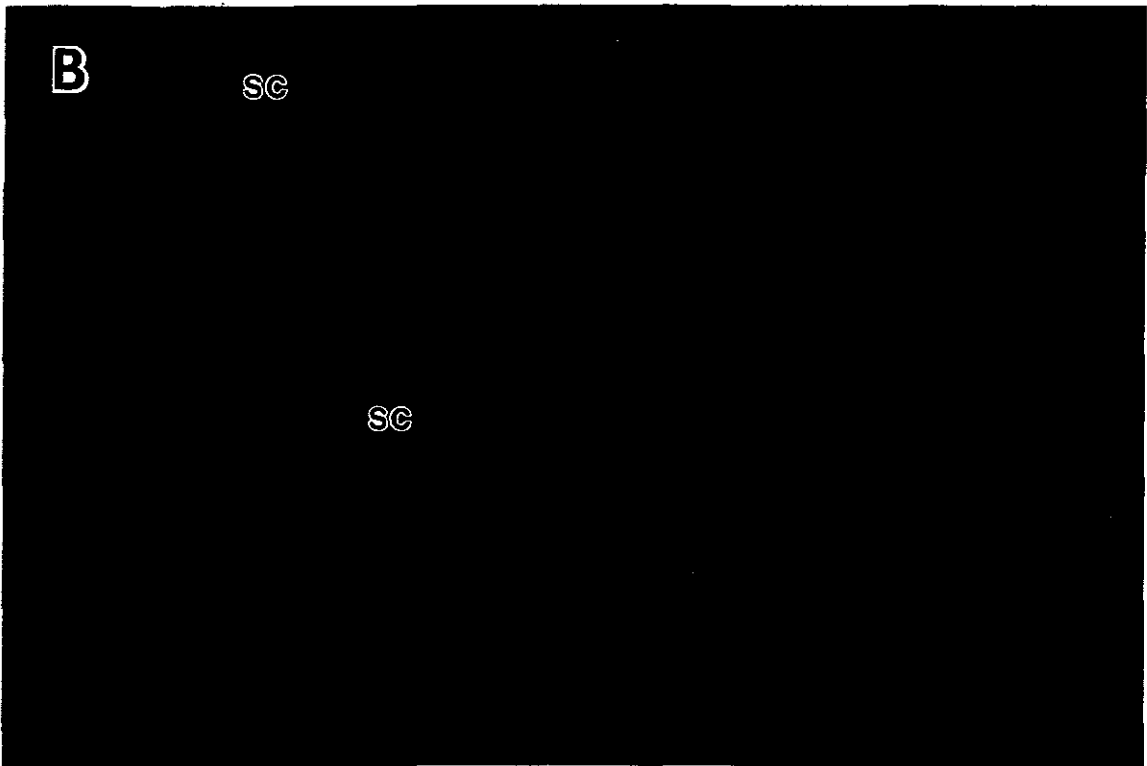
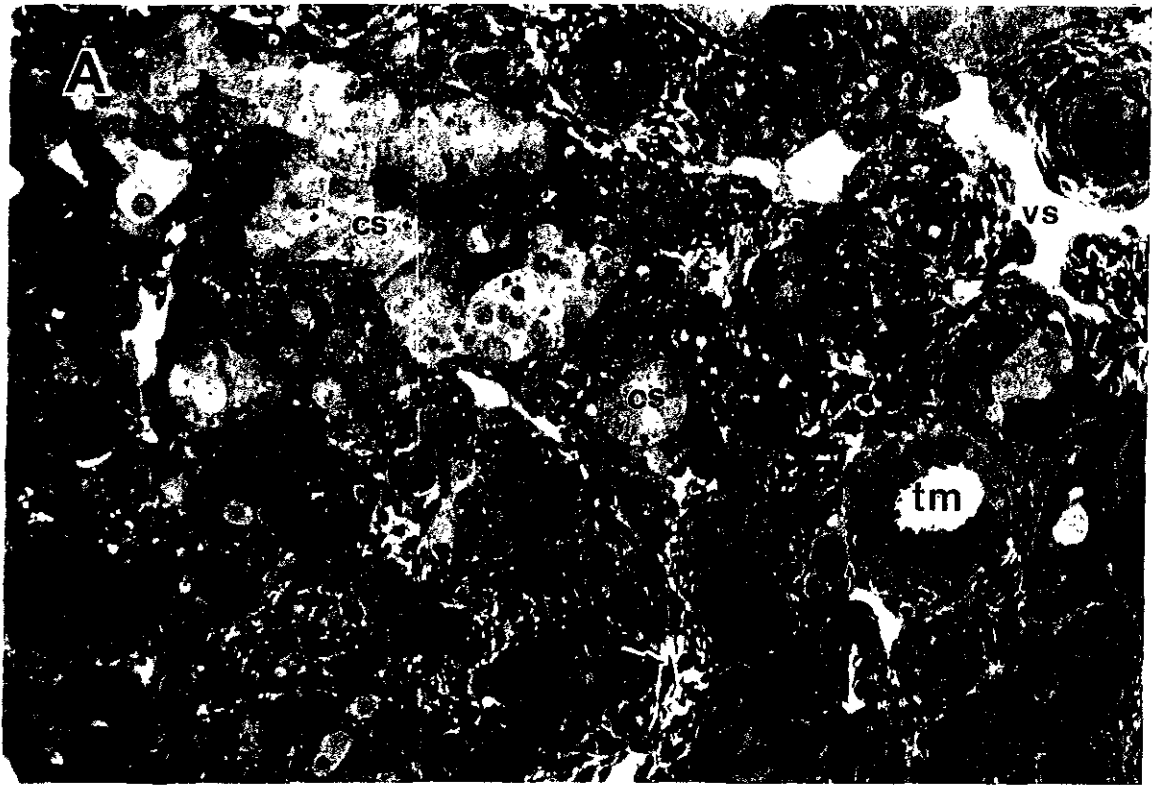
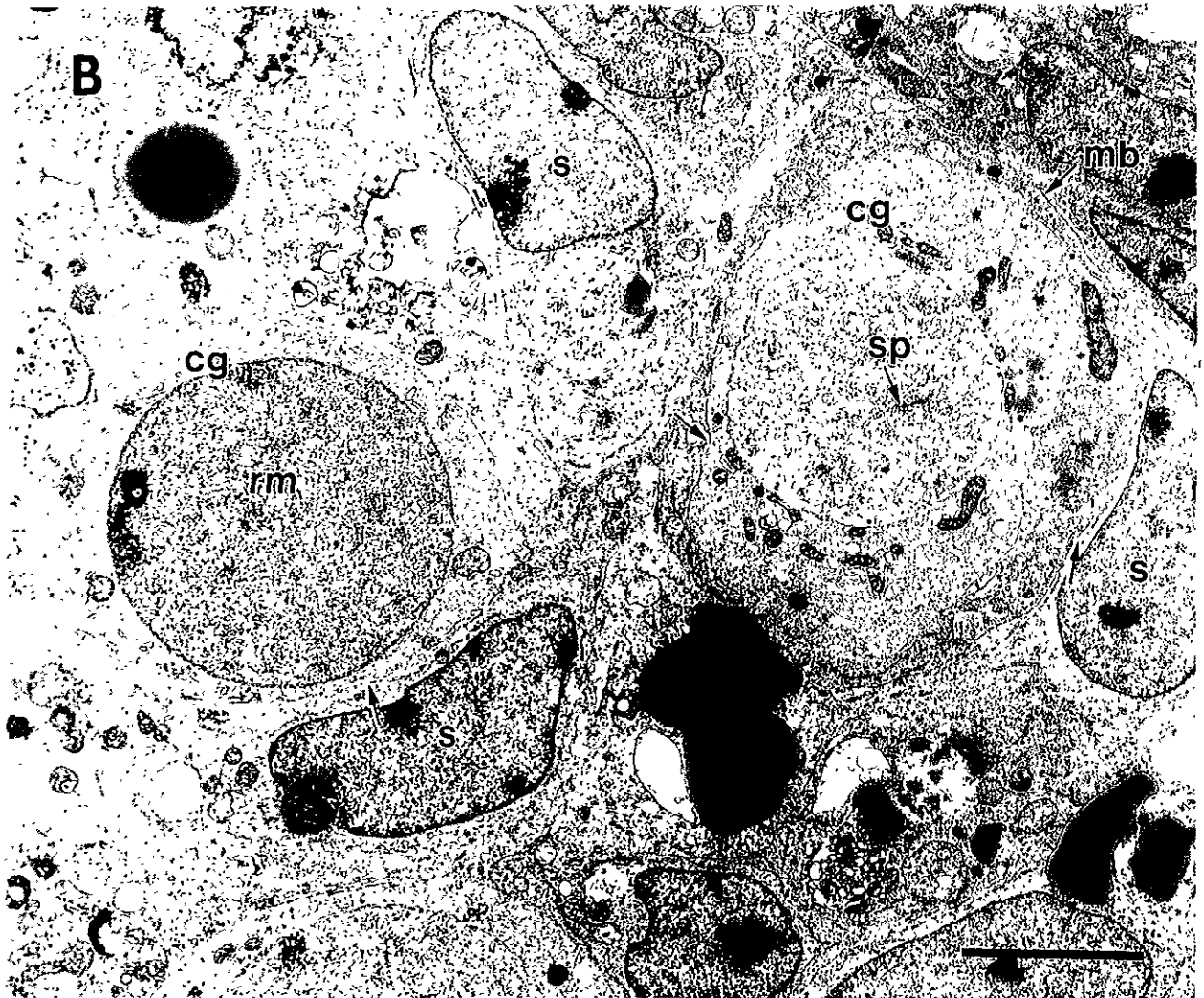
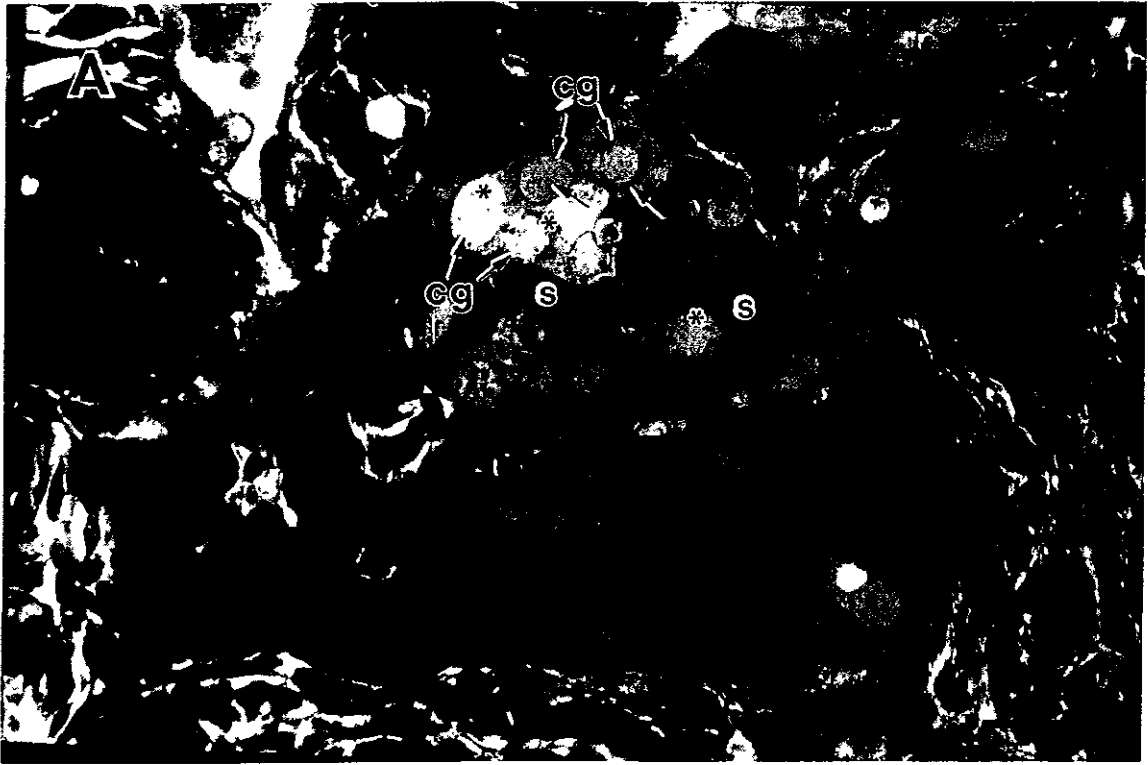


Fig. 11

A) Parte de un reagregado heterotípico de CgH+CgM+Me. Se muestra la formación de un cordón seminífero formado por células de Sertoli (s), y células germinales (cg) tanto en meiosis (*) como en reposo mitótico (flecha). Escala: 50 μ m.

B) Empleando microscopía electrónica del mismo reagregado mostrado en la fig. A, se confirma que dentro de los cordones seminíferos, algunas células germinales (cg) han iniciado el proceso de meiosis evidenciado por la presencia de complejos sinaptinémicos (sp). En este mismo cordón también se detectan células germinales (cg) en reposo mitótico (rm). La diferenciación de células de Sertoli (s) es evidente y se encuentran en contacto con las células germinales (flechas). Se observa parte de la membrana basal (mb) que separa los compartimentos epitelial y estromático (es). Escala 5 μ m.



7. DISCUSION

Al estudiar el desarrollo de las gónadas fetales *in vitro*, algunos autores han propuesto que la diferenciación celular, así como la formación de cordones seminíferos en el testículo pudieran estar controlados por mecanismos independientes (Magre y Jost, 1984; Patsavoudi *et al.*, 1985). Observaciones realizadas en cultivos de gónadas fetales sugieren que la diferenciación de células de Sertoli, células de Leydig y la formación de cordones seminíferos en el testículo puede ser inhibida independientemente *in vitro* (Magre *et al.* 1981; Jost y Magre, 1988; Taketo *et al.* 1984). Sin embargo, no se consideró en ningún caso el papel del mesonefros adyacente en la organización testicular.

Buehr *et al* (1993), encontraron que el testículo fetal en el ratón se desarrolla mejor cuando es cultivado con el mesonefros adyacente. Esto sugiere que este órgano puede jugar un papel importante en la diferenciación de la gónada del macho, ya que en cultivos de gónadas sin mesonefros no se llevó a cabo la formación de los cordones seminíferos. Sin embargo, la diferenciación de los diferentes tipos celulares que conforman al testículo se diferencian normalmente en las gónadas aisladas (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Esto se puede explicar, basandose en el hecho de que las células del complejo urogenital comunes al blastema gonadal y al estroma mesonefrico iniciaron el establecimiento de la gónada indiferenciada desde etapas muy tempranas del desarrollo (9.5 *dpc*), y los presentes experimentos se realizaron partiendo de los 11 *dpc*, lo que hace pensar que los precursores de las células testiculares ya se encontraban en la gónada aislada.

En el presente trabajo utilizamos un método de disociación celular a partir de gónadas indiferenciadas, las cuales al ser mantenidas en cultivo de órganos, se llevó a cabo una reconstrucción histotípica de la gónada donde ocurrió una diferenciación de los principales tipos celulares de manera similar con respecto a la gónada *in situ*. De esta manera, se confirmó que la región del mesonefros adyacente es necesaria para que en nuestras condiciones experimentales se lleven a cabo los procesos morfogenéticos que conducen a la formación de los cordones seminíferos en gónadas de ratón *in vitro*. La ausencia de cordones seminíferos en cultivos de gónadas aisladas, se debe probablemente a la escasa cantidad de células estromáticas comunes a la gónada y al mesonefros presentes en la cresta genital a los 11 *dpc*. En los reagregados en cambio, se suman las células estromáticas de seis gónadas disociadas, que al reagregarse parecen ser suficientes para permitir la organización de los cordones seminíferos. Por lo tanto, se puede asumir

que en las gónadas de 11 *dpc* existe una insuficiente cantidad de células para la formación de cordones seminíferos. Esta posibilidad es apoyada en el hecho de que al cultivar gónadas sin mesonefros de 12.5 *dpc*, donde ya se llevó a cabo la formación de los cordones seminíferos, estos se mantienen gracias a la mayor cantidad de células estromáticas presentes en la gónada al inicio del cultivo (Escalante y Merchant, 1992).

Por otra parte, en testículos de rata, se encontró que las membranas basales que rodean a los cordones seminíferos son producidas por una colaboración entre las células de Sertoli y las células mioideas (Skinner *et al.* 1985). En condiciones de cultivo, las células mioideas peritubulares producen componentes extracelulares como fibronectina y laminina, mientras que las células de Sertoli producen sólo laminina (Davis *et al.* 1990). En el caso de nuestros reagregados, la cantidad de células precursoras de células mioideas, fibroblastos y de Sertoli se incrementa, con lo cual es probable que aumente su actividad para secretar laminina, fibronectina y colágena.

Aunque se podría argumentar que el papel del mesonefros en la formación de los cordones seminíferos podría deberse a que en esta región se produce algún factor difusible que induce la organización de los cordones, dos evidencias experimentales indican que se trata de interacciones celulares directas: i) Cuando se colocó un filtro permeable entre el mesonefros y la gónada, se previno la formación de los cordones seminíferos (Buehr *et al.* 1993). ii) Realizando injertos se observó que no se lleva a cabo la formación de los cordones seminíferos cuando el mesonefros y la gónada no se fusionan y sólo se tocan sus epitelios. Cuando hay fusión, células del mesonefros migran hacia la gónada a través de la superficie expuesta por la cirugía (Merchant-Larios, *et al.*, 1993).

Se plantea entonces el problema de la producción de un factor difusible requerido para la migración de células del estroma mesonéfrico producido por las células de la gónada indiferenciada. Este evento puede ser un paso subsecuente a la expresión del *Sry*, por lo que resulta relevante conocer si el factor putativo es producido por las mismas células somáticas que expresan el *Sry*. A nivel de microscopía electrónica, la cresta genital a los 11.5 *dpc* está formada por células germinales, células epiteliales, vasos sanguíneos y algunas células mesenquimáticas. En el presente estudio encontramos que en reagregados de gónadas aisladas se lleva a cabo la diferenciación de células de Sertoli y de Leydig, lo que sugiere que las precursoras de estas células están ya presentes en la cresta genital desde etapas muy tempranas. De modo que el gene *Sry* se puede expresar en cualquiera de estos tipos celulares.

La diferenciación de células de Sertoli y de Leydig *in vitro* coincide cronológicamente con su diferenciación *in vivo*. La presencia del mesonefros no influye en el tiempo de diferenciación de estos dos linajes celulares. En experimentos anteriores se encontró que en complejos urogenitales como en gónadas aisladas, las células de Sertoli se detectan por inmunohistoquímica del MIS después de 12 h de cultivo, lo que es comparable con gónadas de macho *in vivo*. La detección de MIS después de 24 h se incrementa tanto *in vivo* como *in vitro*, y sólo se observan diferencias en cultivos de gónada aislada donde las células de Sertoli se encuentran distribuidas formando grupos irregulares de diferente tamaño y rara vez se encontraron estructuras parecidas a cordones. Al tomar la expresión de MIS y Sox9 como una evidencia para la diferenciación de las células de Sertoli, se demostró que aunque la organización de los cordones seminíferos no es necesaria para la diferenciación de las células de Sertoli, la migración de células de la región mesonéfrica es importante para que las células de Sertoli junto con las células germinales formen los cordones seminíferos (Merchant-Larios *et al.*, 1993).

En el ratón el gen *Sry* se expresa entre los días 10.5-12.5 *dpc*, alcanzando su nivel máximo en el día 11 *post coitum* (Hacker, *et al.*, 1995). Burgoyne (1988), sugirió que el gene *Sry* se expresa en las células precursoras de Sertoli para llevar a cabo su propia diferenciación, y que todos los demás aspectos de la diferenciación testicular son dirigidos por estas células. En el presente trabajo, después de disgregar-reagregar gónadas de macho de 11 *dpc*, se llevó a cabo la diferenciación de las células de Sertoli y de Leydig además de la formación de los cordones seminíferos. Esto sugiere que las señales requeridas para la diferenciación testicular a partir de la gónada indiferenciada permanecen funcionales en nuestras condiciones experimentales.

En estudios previos se observó que los precursores de las células de Leydig se encuentran formando parte de la gónada a los 11.5 *dpc*, cuando el *Sry* se está expresando. Sin embargo, el radioinmunoanálisis de testosterona muestra que células del mesonefros forman parte de los precursores de las células de Leydig (Merchant, *et al.*, 1993). Recientemente, utilizando células marcadas con el gene *lacZ*, se ha confirmado que no sólo las células mesonéfricas contribuyen en la formación de células mioides, fibroblastos y vasos sanguíneos, sino también las células precursoras de Leydig migran de este órgano (Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 1998).

La diferenciación de células de Leydig en testículos fetales de ratón se ha estudiado por medio de los criterios de citoquímica (Hitzemann, 1962), ultraestructura (Russo y de Rosas, 1971) y morfología (Vergouwen *et al*, 1991). En todos estos estudios, las células de Leydig se localizan en el compartimento estromático después de la formación de los cordones seminíferos. Por otro lado, aunque Taketo, *et al* (1991) reportaron que los testículos fetales de ratón secretan testosterona a los 12.5 *dpc*, una correlación entre la diferenciación morfológica y fisiológica de las células de Leydig durante la ontogenia del testículo no se ha hecho.

La diferenciación de las células de Leydig en nuestros reagregados se detectó utilizando la reacción de la 3 β HSD, sin embargo, esta técnica sirve sólo para observar la ubicación y abundancia de células esteroideogénicas en general. En nuestras condiciones experimentales, al obtener gónadas en etapas tempranas (11-11.5 *dpc*), las precursoras de las células de la glándula adrenal están formando parte de la cresta urogenital. Estas células de la corteza adrenal producen corticosteroides, por lo que también son positivas a la reacción de la 3 β HSD. Utilizando la técnica de radioinmunoanálisis se midieron los niveles de testosterona secretados en el medio de cultivo de los reagregados. Encontramos que, aunque en los reagregados de gónadas de machos con el mesonefros adyacente los niveles de testosterona son mayores (230 pg/0.5ml) los reagregados de gónadas aisladas también la producen (200 pg/0.5ml). De esta manera se confirmó que las células esteroideogénicas detectadas con la reacción de la 3 β HSD corresponden a células de Leydig que se diferencian en la gónada.

Estos datos apoyan en parte los resultados obtenidos en cultivos de gónadas aisladas, los cuales indican que los niveles de testosterona secretados en el medio son más altos cuando las gónadas son cultivadas junto con el mesonefros adyacente (Merchant-Larios, *et al.*, 1993). Sin embargo, las diferencias en los reagregados con y sin mesonefros no son significativas. Este resultado puede deberse también a la suma de las células precursoras de Leydig cuando se reagregan seis o más gónadas lo que incrementa el número de células estromáticas.

Escalante y Merchant (1992), en un estudio de los patrones de agregación histotípica de testículos fetales a partir del 12.5 *dpc*, observaron que las células somáticas formaron patrones histotípicos semejantes a los de gónadas intactas, es decir, la estructuración de cordones seminíferos segregados del compartimento estromático. Sin embargo, la distribución de las células germinales dentro de los agregados, se modificó según la edad

de los testículos. En estos experimentos de reagregación, se observó que aquellas proespermatozonias que quedan en el estroma, fuera de la influencia directa de las células de Sertoli, sólo en raras ocasiones iniciaron la meiosis. Estos resultados podrían interpretarse de la siguiente manera: a los 12.5 *dpc*, etapa en la que se inicia la diferenciación histológica del testículo, las CGP de los machos ya recibieron una señal de las células de Sertoli, de manera que después de disgregarse mantienen el estado de reposo mitótico aunque queden fuera de los cordones seminíferos.

Se ha observado que durante la fase migratoria las células germinales primordiales (CGP), pueden quedar en sitios ectópicos, como la glándula adrenal o la región mesonéfrica (Upadhyay y Zamboni, 1982). Las CGP ectópicas son capaces de diferenciarse, pero sorprendentemente siempre se diferencian como ovocitos independientemente del sexo del embrión. Estos es, las CGP extragonadales con genotipo XY se comportan como CGP XX e inician la meiosis al igual que los ovocitos en las hembras (Upadhyay y Zamboni, 1982; Zamboni y Upadhyay, 1983).

En el presente estudio, el análisis de regregados provenientes de gónadas sólo de macho (CgM), mostró que la mayoría de las CGP incorporadas dentro de los cordones seminíferos se comportan de acuerdo a su sexo, es decir, se mantienen en un estado de reposo mitótico, tal como lo hacen *in situ*. Asimismo, en los regregados formados con gónadas de hembra (CgH), el 100% de las CGP iniciaron la profase de la primera división meiotica. Estos datos parecen apoyar fuertemente la hipótesis propuesta sobre algún factor inhibidor de la meiosis secretado por las células de Sertoli que forman los cordones seminíferos.

Francavilla y Zamboni (1985), sugirieron que la diferenciación de las CGP es un proceso autónomo, y que existe alguna señal que modifica su comportamiento. Estas observaciones apoyan la hipótesis originalmente propuesta por Tarkowski (1969), quien menciona que las CGP independientemente de su sexo genético están programadas para iniciar la meiosis durante la vida fetal, pero que son impedidas de hacerlo por el ambiente somático testicular que las rodea. En nuestro estudio, la mayoría de las células germinales XY permanecieron en reposo mitótico, tanto dentro de los cordones seminíferos como en el tejido estromático. Estos resultados nos llevan a pensar que un factor inhibidor de la meiosis (FIM), podría ser secretado por las células de Sertoli y actuaría dentro y fuera de los cordones testiculares. Otra posibilidad es que el FIM haya determinado a las CGP que no inician la meiosis fuera de los cordones, antes de la disociación de la gónada. Esto

implicaría que el FIM es secretado por las células precursoras de Sertoli antes de los 11 *dpc* como se sugiere en las hipótesis establecidas.

En un estudio reciente realizado por McLaren y Southee (1997), se sugiere que al disgregar-reagregar gónadas indiferenciadas (11 *dpc*), la actividad del FIM se pierde. Sin embargo, en sus condiciones experimentales no demostraron la presencia de las células de Sertoli, por lo que la diferenciación de estas células podría haberse inhibido, y por consiguiente no producirse el FIM en sus reagregados. En conclusión, la diferenciación normal de las células de Sertoli en los reagregados parece ser indispensable para la producción del FIM.

Dos criterios pueden ser considerados fundamentales para establecer la clara diferenciación de las células de Sertoli: la producción de la Sustancia Inhibidora de los conductos Mülllerianos (MIS) y la expresión de la proteína del gene Sox9 (Münsterberg *et al.*, 1991; Da Silva *et al.*, 1996). En nuestras condiciones experimentales, ambos criterios se cumplieron, por lo que probablemente las células de Sertoli fueron capaces de producir el FIM.

Por otra parte, las observaciones de que todas las células germinales inician la profase I de la primera división meiótica en reagregados de hembras, nos indican que la manipulación experimental no altera la diferenciación normal de estas células. En reagregados donde se mezclaron gónadas XX y XY, se encontró un 52% de células meióticas y un 47.5% de células en arresto mitótico, lo que hace pensar que a diferencia de las células germinales de macho, las células germinales de hembra fueron capaces de iniciar la meiosis en un ambiente de macho. Esto sugiere que las CGP XX no fueron influenciadas por el FIM producido por las células de Sertoli.

Aunque en el presente estudio no se identificó el sexo de las células germinales, el análisis cuantitativo de reagregados en los que se mezclaron los dos sexos mostró que un alto porcentaje de CGP permanecieron en arresto mitótico. Esto sugiere que el factor inhibidor de la meiosis no se pudo diluir por la manipulación experimental. Por otra parte, en estos reagregados heterotípicos varias de las presuntas CGP XX en meiosis, se detectaron en contacto directo con las células de Sertoli dentro de los cordones seminíferos identificadas por ultraestructura.

Nuestros resultados sugieren que el contacto directo entre las células somáticas y germinales en la gónada indiferenciada (11 *dpc*), es suficiente para dirigir el comportamiento de las CGP en los reagregados. Así, la determinación de las CGP XX para iniciar la meiosis queda demostrada cuando estas inician el proceso dentro de los cordones seminíferos, en tanto que las CGP XY no lo hacen aunque queden en el estroma de los reagregados.

En los reagregados, las CGP XX son capaces de formar parte de los cordones testiculares e interactuar con las células de Sertoli. Si a los 11 *dpc* ya están determinadas para iniciar la meiosis y la cercanía con Sertoli no tiene ningún efecto sobre este proceso, este resultado se puede basar en lo siguiente: a los 10.5 *dpc* se inicia la expresión del gen determinante del testículo (*Sry*) en las células de preSertoli, desencadenando una serie de eventos para la diferenciación testicular. Uno de estos eventos pudiera ser la expresión del FIM, por el cual las CGP XY quedarían "programadas" para no iniciar la meiosis. Esta información sería transmitida a las subsecuentes generaciones del mismo linaje celular. De esta manera, en nuestros reagregados, al utilizar gónadas de embriones XX de 11 *dpc* la señal temprana proveniente de las células de preSertoli no estuvo presente sobre las CGP XX rodeadas por células prefoliculares que no producen el FIM y por consecuencia tienden a iniciar la meiosis (figura 13).

Se plantea entonces el problema de una temprana diferenciación de las células precursoras de Sertoli, capaces de "programar" a las CGP antes de los 11.5 *dpc* previos a la disociación. Aunque se sabe que los genes SF-1, Wt-1, ZFY, Sox9 y Dax1 se expresan desde etapas muy tempranas del desarrollo gonadal, todos ellos lo hacen en los dos sexos, por lo que ninguno parece estar involucrado directamente en la temprana producción del FIM. Por otra parte, el gene Oct-4 se expresa específicamente en las CGP, pero también es común a los dos sexos en el período de gónada indiferenciada, por lo que su regulación tampoco parece ser responsable para el inicio o no de la meiosis. Tanto el Oct-4 de las CGP como el SF-1, Sox9 y Dax1 de las somáticas se expresan en forma sexo-específica a partir del 12.5 *dpc*, por lo que su regulación parece ser importante para mantener la diferenciación de ovarios y testículos embrionarios. Sin embargo, la regulación diferencial de estos genes es secundaria al compromiso de las CGP, a la luz de nuestros presentes resultados.

Podemos sugerir que en las CGP XY existieran receptores a algún factor secretado por las células de Sertoli que inhibiera el inicio de la meiosis. La expresión de los receptores en

las CGP puede ser inducida por las células somáticas de la cresta genital XY desde el momento de su llegada a las crestas genitales (9.5 dpc). Las CGP XX al no expresar estos receptores en las crestas genitales XX, no responderían a dicho factor. Por otra parte, cabe la posibilidad que en nuestros reagregados, células somáticas XX (prefoliculares) se incorporen a los cordones seminíferos e inhiban la actividad del FIM sobre las CGP XX pero no sobre las CGP XY (figura 14). Esta posibilidad sólo podrá demostrarse haciendo reagregados con CGP y células somáticas altamente enriquecidas, cuyo sexo genético pueda identificarse bajo el microscopio.

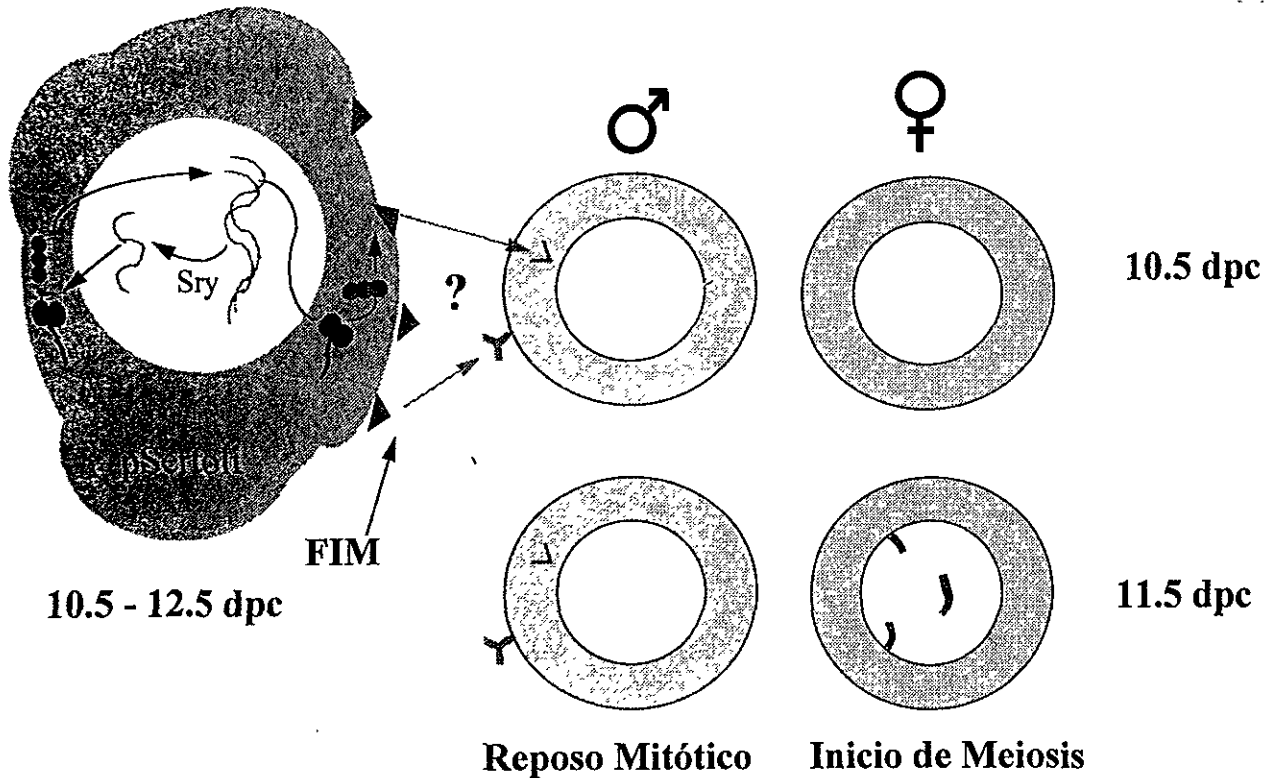


Figura 13.

A los 10.5 dpc se inicia la expresión del gen Sry en las células de preSertoli, desencadenando una serie de eventos que llevan a la diferenciación testicular a partir de la gónada indiferenciada. Uno de estos eventos, pudiera ser la expresión de un factor inhibidor de la meiosis (FIM) el cual actuaría sobre las CGP al establecerse la cresta genital XY. En los reagregados, al utilizar gónadas de 11-11.5 dpc, la señal proveniente de las células de preSertoli no estuvo presente sobre las CGP XX y por consecuencia inician la meiosis.

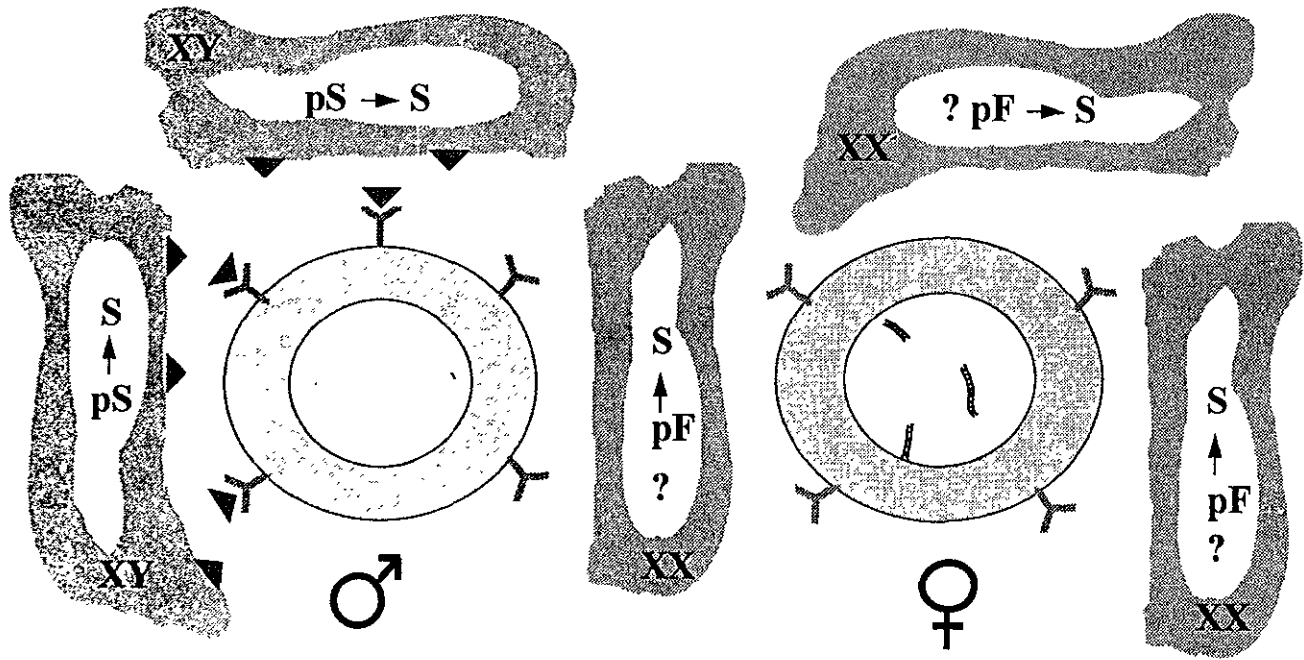


Figura 14.

En reagregados mixtos, las CGP de hembra presentan receptores al FIM. Sin embargo, pueden o no responder al FIM cuando están rodeadas de células somáticas XX prefoliculares.

8. CONCLUSIONES

- 1) En nuestras condiciones experimentales de disgregación-reagregación celular, se recapitulan los procesos histogenéticos que llevan a la diferenciación de testículos y ovarios a partir de la gónada indiferenciada (11 *dpc*).
- 2) La formación de cordones seminíferos requiere la presencia de células del estroma mesonéfrico. Sin embargo, el inicio de la meiosis se lleva a cabo con o sin células mesonéfricas.
- 3) La manipulación experimental de disgregar-reagregar crestas urogenitales de 11 *dpc* no altera el destino de las células germinales primordiales (CGP) *in situ*. Las CGP XY se mantienen en un estado de reposo mitótico, mientras que las CGP XX inician el proceso de meiosis.
- 4) En los reagregados mixtos, las CGP inician o no la meiosis independientemente de su ubicación dentro de los cordones seminíferos.
- 5) Nuestros resultados sugieren que las CGP están determinadas durante el establecimiento de la gónada indiferenciada (11.5 *dpc*). La presencia del factor inhibidor de meiosis podría actuar en etapas más tempranas del desarrollo gonadal (10.5 *dpc*).

9. REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla A. and Merchant-Larios H. (1986).** Mouse primordial germ cells use fibronectin as substrate for migration. *Expl. Cell. Res.* 165: 362-368.
- Ashworth, A., S. Swift, and N. Affara. (1989).** Sequence of cDNA for murine Zfy-1, a candidate for Tdy. *Nucl. Acids. Res.* 17:2864-2869.
- Bardoni, B., E. Zanaria, S. Guioli, G. Florida, K.C. Worley, G. Tonini, G. Chiumello, E.R. McCabe, M. Fraccaro, O. Zuffardi and G. Camerino. (1994).** A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genet.* 7:497-501.
- Berta P, Hawkins J.R., Sinclair A.H, Taylor A, Griffiths B,L, Goodfellow P.N. and Fellows M. (1990):** Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. *Nature* 348: 248-250.
- Brambell, F.W. and Parkes, S.A. (1927).** Changes in the ovary of the mouse following exposure to X-rays: 3. Irradiation of nonparous adult. *Prog. Roy. Soc. B.* 101:36
- Brien P. (1937).** La réorganisation de l'éponge après dissociation par filtration et phénomènes d'involution chez *Ephydatia fluviatilis*. *Arch. Biol.* 48: 185-268.
- Buehr M, Subin G.U. and McLaren A. (1993):** Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273-281.
- Bull, J.J., D.M., Hilla, and S. O'Steen. (1988).** Mammalian ZFY sequences exist in reptiles regardless of sex determining mechanism. *Science* 242:567-569.
- Burgoyne P.S. (1988):** Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* B322: 63-72.
- Burgoyne, P.S., Buehr, M., Koopman, P., Rossant, J. and McLaren A. (1988).** "Cell autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX-XX chimaeric mouse testes. *Development* 102:443-450.
- Byskov, A.G. and Saxen L. (1976).** "Induction of meiosis in fetal mouse testis *in vitro*". *Dev. Biol.* 52:193-200.
- Byskov, A.G. (1979).** "Regulation of meiosis in mammals". *Ann Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 19:1251-1261.

Cate R.L., Danahoe P.K. and MacLaughlin. (1990): Müllerian inhibiting substance. *Handbook Exp. Pharmacol.* **95**: 179-210.

Chiquione, A.D. (1954). the identification origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat. Rec.* **118**:135-146.

DaSilva, A.M., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A. and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics* **14**: 62-68.

Davis M.C, Papadopoulos V, Sommers H.K. y Dym M. (1990): Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **43**: 860-869.

Dolci, S. and DeFelici, M. (1990). A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads. *Development* **109**: 37-40.

Dollé, P. and Duboule, D. (1989). Two gene members of the murine Hox-5 complex show regional and cell-type specific expression in developing limbs and gonads. *The EMBO Journal* **8**(5);1507-1515.

Escalante, D. and Merchant-Larios, H. (1992). Somatic and germ cell interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. *Exp. Cell. Res.* **198**: 150-158.

FrancaVilla, S. and Zamboni, L. (1985). Differentiation of mouse ectopic germinal cells in intra- and perigonadal locations. *J. Experimental Zoology* **233**:101-109.

Fajer, A.B., Schneider, J.A. McCall, D., Ances, I.G. and Polakis, S.E. (1979). The induction of meiosis by ovaries of newborn hamsters and its relation to the action of the extra ovarian structures in the mesovarium (rete ovarii). *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* **19**:1273-1278.

Fauré-Fremient, E. (1932): Morphogénèse expérimentale (reconstitution) chez Ficulina ficus. *Arch. Anat Microscop. Morphol. Exper.* **28**:1-80.

Featherstone, M.S., Baron, A., Gaunt, S.J., Mattei, M.G. and Duboule, D. (1988). Hox-5.1 defines a homeobox-containing gene locus on mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Sci. USA* **85**:4760-4764.

Foster, W.J., Dominguez, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D., Goodfellow, P.N., Brook, J.D. and Schafer, A.J. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* **372**:525-529.

Gardner, R.L. (1975). Germ plasm and the differentiation of the germ line. *Int. Rev. Cytol.* **43**:229-280.

Godin, I., and Wylie, C.C. (1991). TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113:1451-1457.

Gomperts, M., García-Castro, M., Wylie, C. and Heasman, C. (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120:135-141.

Grinsted, J., Byskov, A.G. and Andreassen, M. (1979). Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro by rete testis obtained from pubertal mouse and bull testes. *J. Reprod. Fert.* 35:199- 204.

Grund K.S, Pelliniemi J, Paranko J, Muller U. and Lakkala-Paranko T. (1986): Reaggregates of cells from rat testis resemble developing gonads. *Differentiation* 32: 135-143.

Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603-1614.

Herrera, J., Sosa, M., Ayala, F., Galina, C., Hernández-Jauregui and Bermudez, J.A. (1983). Morphophysiological correlation of boar Leydig cell development during postnatal stage. *Cornell Vet.* 73:67-75.

Hastie, N.D. (1992). Dominant negative mutations in the Wilms' tumor gene *Wt1* cause Denys-Drash syndrome: proof that a tumor suppressor plays a crucial role in normal genitourinary development. *Hum. Mol. Genet.* 1;293-295.

Hillscher, B. and Hillscher, W. (1978). "Some details on the kinetics of oogonia and M-prospermatogonia in NMRI mice in comparison to rat and man". En: *development and function of reproductive organs*)Edsd. Byskov AG and Peters H). *Experta Medica*, Amsterdam 131-139.

Hitzeman, S.J.W. (1962): Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. *Anat. Rec.* 143: 351-362.

Ikeda, Y., Lala, D.S., Luo, X., Kim, E., Moisan, M.P. and Parker, K.L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 7:852-860.

Ilmense, K., Mahowald, A.P. and Loomis, M.R. (1976). the ontogeny of germ plasm during oogenesis in *Drosophila*. *Devel. Biol.* 49:40-65.

Josso, W., Picard, J.Y. and Tran, D. (1977). The antimullerian hormone. *Recent. Prog. Horm. Res.* 33: 117-163.

Jost, A. (1947). Sur les effets de castration precoce de l'embryon male de lapin. C.R. Acad. Sci. (Paris), 141: 126-129.

Jost A. and Magre S. (1988): Control mechanisms of testicular differentiation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B322: 55-61.

Karnovsky, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. J. Cell Biol. 27:137A.

Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H. and Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. Development 122: 2813-2822.

Koopman, P., Münsterberg, A., Blanche, C., Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (1990): Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. Nature 348: 450-452.

Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. Nature 351:117-121.

Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., Jaenisch, R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. Cell 74:679-691.

Kuwana, T., Maeda, S.H. and Fujimoto, T. (1986). Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage *in vitro*. Anat. Rec. 215: 403-406.

Luo, X., Ikeda, Y. and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. Cell 77:481-490.

Magre, S., Angelopoulou, A. and Jost, A. (1981): Action du sérum de foetus veau sur la différenciation *in vitro* ou le maintien des cordons séminifères du testicule du foetus du rat. C R Acad. Bc. Paris t 292 serie III: 85-89.

Magre, S. and Jost, A. (1984): Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytidifferentiation of Sertoli cell. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 7831- 7834.

Mardon, G., Luoh, S.W., Simpson, E.M., Gill, G., Brawn, L.G. and Page, D.C. (1990). Mouse Zfx protein is similar to Zfy-z: each contains an acidic activating domain and 13 zinc fingers. Mol. Cell Biol. 10:681-688.

MacGregor, G.R., Zambrowicz, P. and Soriano, P. (1995). Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. Development 121:1487-1496.

- McCoshen, J.A. and McCallion, D.J.** (1975). A study of primordial germ cells during their migratory phase in steel mutant mice. *Experientia* 31:589-590.
- McLaren, A.** (1984). Chimaeras and sexual differentiation. In: *Chimaeras in developmental biology*. (Ed: N. LeDouarin and A. McLaren). London, Academic Press, pp. 381-399.
- McLaren, A. and Buehr, M.** (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ. Dev.* 31: 185-195.
- McLaren, A.** (1995). Germ cells and germ cell sex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 350:229-233.
- McLaren, A. and Southee, D.** (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Developmental Biology* 187:107-113.
- Merchant-Larios, H.** (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Developmental Biology* 44:1-21.
- Merchant-Larios, H.** (1976). The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. Elsevier New York, 453-462.
- Merchant-Larios, H.** (1978). *Ovarian Differentiation*. (Ed: R.E. Jones). Plenum publishing Corporation, pp. 47-81.
- Merchant-Larios, H.** (1979). Origin of the somatic cells in the rat gonad: an autoradiographic approach. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19:1219-1229.
- Merchant-Larios, H. and Centeno, B.** (1981). Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W mouse. *Eleventh International Congress of Anatomy: Advances in the Morphology of Cells and Tissue*, pp. 383-392.
- Merchant-Larios, H.** (1984). Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis. In: *Ultrastructure of Reproduction*. Blerkmon J. and Motta, P.M. (eds). Martinus Nijhoff Publishers. Boston, 19-30.
- Merchant-Larios, H. and Chimal-Monroy, J.** (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Developments in Ultrastructure of Reproduction*, pp. 55-63.
- Merchant-Larios, H., Popova, L. and Reyss-Brion, M.** (1984). Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. *Develop. Growth and Differ.* 26(5): 403-417.

- Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza, N. and Buehr, M. (1993):** The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.
- Merchant-Larios, H. and Moreno-Mendoza, N. (1998).** Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Experimental Cell Research* 244: 230-238.
- Muller, U., Siggh, L., Grund, K.S. and Jones, W.K. (1982):** Ovarian cells participate in the formation of tubular structures in mouse/rat heterosexual gonadal cocultures: A direct demonstration by hybridization. *Differentiation* 22: 136-138.
- Mustacatelli, F., Strom, T.M. Walker, A.P. Zanaria, E., Recan, D., Meindl, A., Guioli, S., Zehetner, G., Rabl, W., Schwarz, H.P., Kaplan, J.C. Camerino, G., Meitinger, T. and Monaco, A.P. (1994).** Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadism. *Nature* 372:672-676.
- Münsterberg, A. and Lovell-Badge, R. (1991).** Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggest a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.
- Ozdzanski, W. (1967).** Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica Poloniae* 17:367-379.
- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E.M., Fisher, E.M., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., De la Chapelle, A. and Brown, L.G. (1987).** The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104.
- Palmer, S.J. and Burgoyne, P.S. (1991).** The *Mus musculus domesticus tdy* allele acts later than the *Mus musculus domesticus Tdy* allele: a basis for XY sex- reversal in C57BL-6Ypos mice. *Development* 113:709-714.
- Paranko, J., Pelliniemi, J., Vaheri, A., Foidart, J.M., and Lakkala-Paranko, T. (1983).** Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryon gonads. *Differentiation* S23: S72-S81.
- Patsavoudi, E., Magre, S., Castanier, M., Scholler, R. and Jost, A. (1985):** Dissociation between testicular morphogenesis and functional of Leydig cells. *J. Endocr.* 105: 235-238.
- Pesce, M., Xiangyuan, W., Wolgemuth, D.J. and Schöler, H. (1998).** Differential exoression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mechanism of Development.* 71: 89-98.

Russo, J., and De Rosas, J.C. (1971). Differentiation of Leydig cell of the mouse testis during the fetal period. An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 130: 461-480.

Schöler, H.R., Hatzopoulos, A.K., Balling, R., Suzuki, N. and Gruss, P. (1989). A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO Journal* 9(8):2543-2550.

Sinclair, A.H., Foster, J.W., Spencer, J.A., Palmer, D.C., Goodfellow, P.N. and Graves, J.A.M. (1988). Sequences homologous to ZFY, a candidate sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336:780-783.

Skinner, M.K., Tung, P.S. and Fritz, I.B. (1985): Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production extracellular components. *J. Cell Biol.* 100: 1941-1947.

Swain, A., Zanaria, E., Hacker, A., Lovell-Badge, R. and Camerino, G. (1996). Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genetics* 12:404-409.

Taketo, T., Thau, B.R., Adeyemo, O. and Koide, S.S. (1984): Delay of testicular differentiation in the B6.Ydom ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for Müllerian Inhibiting Substance. *Dev. Biol.* 146: 523-531.

Taketo, T., Saeed, J., Roberge, S., Matsuo, N. and Koide, S.S. (1991): Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38(4): 523-531.

Tarkowski, A.K. (1969). Are the genetic factors controlling sexual differentiation of somatic and germinal tissue of a mammalian gonad stable or labile? In: *Environmental influences in genetic expression* (Ed: N. Kretchmer and D.N. Walcher) Washington, DC, Fogarty International Center Proceedings, pp. 49-60.

Upadhyay, S. and Zamboni, L. (1981). The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In: *development and function of reproductive organs. V workshop on development and function of reproductive organs.* Copenhagen. Byskov A. and Peters H. (eds). Amsterdam, Excerpta Medica 18-27.

Upadhyay, S. and Zamboni, L. (1982). Ectopic germ cells: Natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6584-6588.

Vergouwen, R.P.F., Jacobs, S.G.P.M., Huiskamp, R., Davids, J.A.G. and De Rooij, D.G.(1991): Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93: 233-243.

Wartenberg, H. (1981). The influence of the mesonephric blastema on gonadal development and sexual differentiation. In: *Development and function of reproductive organs. V workshop on development and function reproductive organs.* Copenhagen. Byskov A.G. and Peters H. (eds). Amsterdam, Excerpta Medica 3-12.

Zamboni, L. and DeMartino, C. (1967). Buffered picric acid-formaldehyde: A new rapid fixative for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 35:148A.

Zamboni, L. (1972). "Comparative studies on ultrastructure of mammalian oocytes" En: *Oogenesis* (Eds. Biggers JD and Schuetz AW). University Park Press, Baltimore 5-45.

Zamboni, L., Bézard, J. and Mauléon, P. (1979). The role of the mesonephros in the development of the sheep fetal ovary. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19:1153-1178.

Zamboni, L. and Upadhyay, S. (1983). Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. *J. Experimental Zoology* 228:173-193.

Zambrowicz, B.P., Zimmermann, J.W., Harendza, C.J. Simpson, E.M., Page, D.C. Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1994). Expression of a mouse *Zfy-1/lacZ* transgene in the somatic cells of the embryonic and germ cells of the adult testis. *Development* 120: 1549-1559.

Zenzes, M.T. and Engel, W. (1981). The capacity of testicular cells of the postnatal rat to reorganize into histotypic structures. *Differentiation* 20:157-161.

Zwingman, T., Erickson, R.P. Boyer, T. and Asangla, A. (1993). Transcription of the sex-determining region genes *Sry* and *Zfy* in the mouse preimplantation embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:814-817.