

57
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“DISGREGACION, REAGREGACION Y
MORFOGENESIS DE LA GONADA
EMBRIONARIA, FETAL Y NEONATAL
DEL RATON (Mus musculus)”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DIANA MARIA ESCALANTE ALCALDE

DIRECTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

México, D. F.

1987.



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 está 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.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	
1.	Planteamiento del problema	1
2.	Antecedentes	
2.1.	Determinación del sexo en los mamíferos	2
2.2.	La gónada indiferenciada	3
2.2.1.	El establecimiento de la gónada indiferenciada	4
2.2.2.	Migración de las células germinales primordiales (CGP)	5
2.3.	Diferenciación sexual de la gónada	7
2.3.1.	Diferenciación testicular	9
2.3.2.	Diferenciación ovárica	13
2.3.2.1.	Período prenatal	13
2.3.2.2.	Período postnatal	15
3.	El enfoque morfogenético experimental	19
II.	OBJETIVOS	24
III.	MATERIAL Y METODOS	
1.	Animales	25
2.	Obtención de gónadas	25
3.	Disgregación enzimática	26
4.	Prueba de viabilidad de gónadas disgregadas	27
5.	Formación de botones celulares por centrifugación	28
6.	Recuperación y cultivo de botones celulares	28
7.	Microscopía	
7.1.	Fijación e inclusión	29
7.2.	Análisis histológico	30
7.3.	Análisis ultraestructural	30
IV.	RESULTADOS	
1.	Incubación enzimática requerida para disgregación	31
2.	Viabilidad de las suspensiones celulares	31
3.	Porcentaje de células disgregadas en las suspensiones celulares	32
4.	Análisis de los disgregados control	
4.1.	Disgregados de testículos	33
4.2.	Disgregados de ovarios	34
5.	Botones celulares reagregados después de 24 horas de cultivo	35
6.	Reagregación y morfogénesis	35
6.1.	Reagregación y morfogénesis de testículos	
6.1.1.	Las células somáticas	36
6.1.2.	Las células germinales	38
6.2.	Reagregación y morfogénesis del ovario	
6.2.1.	Las células somáticas	40
6.2.2.	Las células germinales	42
6.2.3.	Etapas de la foliculogénesis	43

V.	DISCUSION	
1.	Métodos de disgregación-reagregación	44
2.	Morfogénesis de los reagregados	49
3.	Células con desarrollo programado	
3.1.	Las células de Leydig	54
3.2.	Las células germinales	55
4.	Cambio en la afinidad entre las células germinales (CG) y las de Sertoli (S)	57
5.	Consideraciones finales	59
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	APENDICES	62
VIII.	REFERENCIAS	64

I. INTRODUCCION.

1. Planteamiento del problema.

La reagregación de suspensiones celulares ha demostrado ser una gran herramienta para el conocimiento de como se dan las interacciones celulares y cuales son los mecanismos que llevan a la formación de asociaciones celulares específicas en diversos órganos y tejidos embrionarios.

El conocimiento de dichas interacciones y asociaciones es de gran importancia en el campo que concierne a la diferenciación gonadal de los mamíferos donde, hasta nuestros días, es poco lo que se sabe a ciencia cierta, cuales son los mecanismos involucrados en la regulación de la diferenciación sexual de la gónada de los mamíferos, así como cuales son las interacciones celulares que se dan durante este evento y cuales son los mecanismos que llevan a la formación de asociaciones celulares específicas durante la diferenciación gonadal.

Con base en lo anterior, el presente trabajo se avocó al estudio de dichas interacciones y asociaciones en la gonada embrionaria, fetal y neonatal del ratón para lo que se utilizó un modelo experimental de reagregación morfogénica de suspensiones celulares. Los eventos de interés que abarca el presente trabajo son: la diferenciación testicular temprana; el inicio de la diferenciación ovárica que en el ratón está representada por el inicio de la meiosis; y la foliculogénesis hasta la formación de folículos primordiales.

Para el desarrollo del presente estudio fue importante tener como antecedente un panorama general de los eventos que ocurren

en la diferenciación sexual de los mamíferos y más específicamente en la del ratón; esto abarca 1) la determinación del sexo, 2) la migración de las células germinales hacia la cresta genital, 3) el establecimiento de la gónada indiferenciada y 4) la diferenciación sexual de la gónada. Estos eventos serán descritos a continuación.

2. Antecedentes.

2.1. Determinación del sexo en los mamíferos.

La determinación del sexo en este grupo de organismos es estrictamente cromosomal y no está influenciada por el ambiente. El sexo genético se determina en el momento de la fertilización por la presencia de los cromosomas sexuales (X y Y).

Las hembras son los individuos homogaméticos, es decir, sus gametas poseen sólo un tipo de cromosoma sexual, el X. Contrariamente los machos son individuos heterogaméticos por poseer gametas con cromosomas sexuales tanto X como Y. De este modo, en el caso del ratón, la fórmula cromosómica de la población de gametas en una hembra es 19X, mientras que la fórmula cromosómica de la población de gametas de un macho es 19X o 19Y. Es por lo anterior que se dice que el macho es quien determina el sexo genético de la descendencia al dar lugar a cigotos con fórmula cromosómica 38XX (hembra) o 38XY (macho). La presencia del cromosoma Y parece dirigir el desarrollo del sexo gonadal hacia testículo.

2.2. La gónada indiferenciada.

El desarrollo de las gónadas, ya sean ovarios o testículos, es resultado del sexo genético del individuo; sin embargo, los dos tipos de gónadas se originan de una estructura común para ambos sexos. A esta estructura se le ha denominado gónada indiferenciada. Esta es una estructura par, caracterizada por ser una masa celular compacta que se localiza en la región ventral del mesonefros; está constituida por los siguientes componentes : i) Tejido epitelial, representado por el epitelio superficial o celómico y el epitelio interno, ii) Tejido mesenquimático y iii) Las células germinales primordiales.

El origen de los componentes somáticos de esta estructura es de gran controversia. Witschi (1951), con base en sus estudios en anfibios , llegó a la conclusión de que la gónada estaba compuesta por dos territorios : la corteza derivada del epitelio superficial y la médula derivada del mesonefros. Estas conclusiones las aplicó también a mamíferos. Gillman (1948) y Burns (1961) describen un modelo de doble proliferación del epitelio superficial. Según esta hipótesis, el tejido epitelial interno tiene un origen único. Byskov (1981), Upadhyay et al (1981), Gropp y Ohno (1966) sugieren que algunas células derivadas del mesonefros contribuyen sustancialmente en la población celular de la gónada . Postulan que la gran mayoría, si no es que en su totalidad, las células epiteliales de los cordones sexuales, son derivadas del epitelio de túbulos mesonefricos. Esta idea se desarrolló con base en la evidencia morfológica, por lo que es necesario una evidencia experimental para reforzar esta hipótesis; a pesar de esto es la que más

adeptos ha cobrado.

El principal argumento en contra de esta idea es que las células epiteliales mesonefricas, con función excretora, tendrían que desdiferenciarse para pasar a formar parte de una estructura con funciones completamente diferentes aunque cabe señalar que, durante el desarrollo embrionario, no en todos los mamíferos el mesonefros es funcional. En trabajos realizados con embriones de pollo, Merchant et al (1984) provocaron agénesis unilateral del mesonefros y sugieren que no hay participación de las células de este órgano para el establecimiento de la gónada indiferenciada.

Allen (1904), Brambell (1927), Gruenwald (1942), Pinkerton et al (1961), Merchant (1975, 1979a) y Pelliniemi (1976) proponen que la gónada se origina por la proliferación del epitelio celómico y del mesénquima embrionario.

2.2.1. El establecimiento de la gónada indiferenciada.

En los embriones de ratón a los 10 días postcoito (dpc) se observa un engrosamiento del epitelio celómico en la región ventral del mesonefros; debido a su proliferación, éste forma primero un epitelio de dos estratos y posteriormente, por proliferación continua, se forma una estructura compacta; este evento se realiza en sentido antero-posterior (Brambell, 1927). Las células germinales primordiales (CGP) que van llegando a la gónada quedan incluidas en la masa epitelial compacta que constituye la gónada indiferenciada, establecida finalmente a los 11 dpc; ésta tiene algunos capilares y algunas células mesenquimáticas provenientes de la región dorsal de la gónada. Las observaciones realizadas en cerdo y rata muestran que en

esta etapa comienza la formación de láminas basales muy delgadas alrededor de las células del epitelio interno, epitelio producto de la proliferación del epitelio celómico o superficial, que rodean a las CGP, lo que sugiere una formación muy temprana de cordones gonadales (Merchant, 1975; Pelliniemi, 1976).

2.2.2 Migración de las células germinales primordiales (CGP).

Hoy día existe consenso de que las CGP, que son predecesoras de las células germinales (CG) en el adulto, son de origen extragonadal (Brambell y Parkes, 1927; Everett, 1945; Mintz, 1958; Merchant, 1975). Las CGP se pueden identificar por su actividad fosfatasa alcalina (Mckay et al, 1953) y por sus características morfológicas: poseen gran núcleo, nucléolo prominente, citoplasma claro al teñirse con azul de toluidina, mitocondrias perinucleares con crestas escasas, vesículas de núcleo denso (Zamboni y Merchant, 1973) y una inclusión de material fibrilar denominada "Nuage" (del francés: nube) (Eddy, 1974).

En el embrión de ratón, la etapa más temprana en la que se han podido detectar CGP es en la de la formación del pliegue cefálico entre los 7.5 y 8 días dpc (Chiquoine, 1954). Estas se localizan en el extremo caudal de la línea primitiva y en la base del alantoides; poco después se encuentran entre la pared del saco vitelino y el alantoides.

Debido a movimientos morfogenéticos, a los 9.5 dpc se forma el intestino por invaginación del endodermo; dicho movimiento arrastra primero a las CGP en un movimiento caudal por la parte ventral del intestino, para posteriormente llevarlas a una posición dorsal del intestino. A los 10 dpc, en la región

ventral del mesonefros, se observan los primeros rudimentos de la formación de la cresta gonadal representada por un engrosamiento del epitelio celómico de manera longitudinal y pareada en la región del mesonefros; este evento coincide con la salida del las CGP del intestino y la migración de éstas por el mesenterio dorsal y lateralmente hacia la región de las crestas gonadales. Las CGP, en su fase migratoria, se caracterizan por presentar además: forma amiboidea, núcleo un poco irregular, nucleoplasma granuloso, nucléolo prominente y reticulado; presentan algunas interdigitaciones con células somáticas circundantes (Zamboni y Merchant, 1973) y organelos polarizados en sentido inverso a la dirección del movimiento (Clark y Eddy, 1975). Las CGP, a medida que colonizan las crestas genitales, pierden dichas características.

Como ya se mencionó anteriormente, las CGP llegan a su destino por movimientos pasivos, producto de reajustes morfogénéticos de las estructuras embrionarias y por movimientos activos de éstas. La razón por la que las CGP llegan a su destino, la cresta gonadal, se ha tratado de explicar de tres maneras. Witschi en 1948 propuso que las CGP eran guiadas por un gradiente de concentración creciente de una sustancia quimiotáctica sintetizada por la gónada en formación. Hay que hacer notar que paralelamente al inicio de la formación de la cresta gonadal, las CGP abandonan el intestino para dar comienzo a su fase migratoria. Algunas investigaciones realizadas con pollos apoyan la existencia de un factor de ésta naturaleza (Kuwana et al, 1986). La segunda hipótesis, denominada "guía por contacto" (Weiss, 1945), propone la existencia de caminos preestablecidos por el tejido circundante. La tercera hipótesis,

denominada de "adhesión diferencial" (Sperry, 1963), propone la adhesión, por parte de las CGP, a células o sustancias de la matriz extracelular que hacen más eficiente su movimiento hacia la cresta gonadal. Recientemente se ha observado que la fibronectina, glucoproteína abundante en la matriz extracelular, es utilizada por las CGP como sustrato para la migración (Alvarez-Buylla y Merchant, 1986). Sin embargo, esta glucoproteína parece no guiar a las CGP a su destino, por lo que es muy probable que la migración se de por la existencia de una sustancia quimiotáctica aunada a la existencia de la fibronectina, así como de otras glucoproteínas de la matriz extracelular que sirvan como sustrato para su migración.

Algo importante de mencionar respecto al establecimiento de la gónada indiferenciada es la aparente falta de participación de las CGP en este evento, aunque si son necesarias para la diferenciación de los folículos primordiales y del tejido esteroideogénico del ovario (Merchant, 1976; Merchant y Centeno, 1981; Merchant, 1984).

2.3. Diferenciación sexual de la gónada

El evento que sigue al establecimiento de la gónada indiferenciada es la diferenciación gonadal. Existen dos hipótesis que tratan de explicarla. La primera es la concerniente al antígeno de histocompatibilidad H-Y; éste se ha propuesto es el responsable de la inducción de la diferenciación testicular (Wachtel et al, 1975). Se observó que individuos que presentaban testículos eran antígeno H-Y positivos independientemente de su sexo cariotípico (Silver y Wachtel, 1977; Ohno et al, 1979). Sin embargo se ha visto que hay

individuos que presentan testículos y son antígeno H-Y negativos, esto es lo que lleva a pensar que el papel de dicho antígeno, en la morfogénesis de la gónada no es aún claro. La segunda hipótesis supone que el mecanismo de diferenciación está dirigido genéticamente, ya que por lo general la presencia del cromosoma Y provoca la aparición de testículos. Simpson en 1982, propuso que el cromosoma Y, en interacción con algunos otros genes en autosomas regulan la diferenciación testicular.

Existen varios modelos que explican la forma en la que se expresa la diferenciación gonadal. Witschi (1951) en su hipótesis corticomedular propone la existencia de dos sustancias antagonistas, una producida por la corteza, la "cortexina" y otra producida por la médula, la "medularina"; una de éstas, según el sexo genético del organismo, se sobreproduce y origina una proliferación del territorio correspondiente y una inhibición de la proliferación del territorio contrario de tal manera que se diferencia un ovario si la cortexina tiene una secreción más abundante; contrariamente, se diferencia un testículo si es más abundante la secreción de la medularina. Gillman (1948) y Burns (1961) propusieron que el testículo se diferencia de una primera proliferación del epitelio celómico lo que da origen a cordones testiculares. Por otro lado un ovario se diferencia como producto de una segunda proliferación del epitelio celómico, lo que da origen a cordones ováricos; paralelamente con esta segunda proliferación debe ocurrir una desaparición de los cordones producto de la primera.

Brambell (1927) consideró que la diferenciación temprana del testículo era efecto de una invasión de mesénquima que

provocaba un rearrreglo estructural característico. Por el contrario, el ovario permanecía estructuralmente en una condición indiferenciada por no existir un reacomodo estructural producto de una invasión de mesénquima.

En el ratón entre los 12 y 12.5 dpc ya se puede distinguir, bajo el microscopio estereoscópico, el sexo gonadal del individuo, lo que indica que el inicio y la progresión de los eventos que ocurren hacia la diferenciación gonadal se da entre los 11.5 y 12 dpc. Bajo el microscopio estereoscópico se distingue un ovario de un testículo porque éste último, en comparación con el ovario, es un poco más voluminoso, presenta una gran vascularización, además de que en su interior se observan estructuras refringentes; éstas representan los cordones testiculares ya diferenciados. El ovario no presenta las características anteriores y su apariencia interna es muy homogénea.

A continuación y con base en la hipótesis de que la gónada se origina de la proliferación del epitelio celómico y el mesénquima embrionario se mencionan los eventos que ocurren durante la diferenciación gonadal.

2.3.1. Diferenciación testicular.

Un individuo con cromosomas sexuales XY, normalmente desarrollará testículos a partir de las gónadas indiferenciadas. Los eventos que ocurren en la diferenciación de esta gónada son:

i) Invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que provoca la compactación de los cordones testiculares - formados por células del epitelio interno o células de Sertoli y las CG- y separación de éstos del epitelio superficial lo que da lugar a la túnica

albugínea.

ii) Las células que rodean a los cordones testiculares se aplanan en forma paralela a la lámina basal delgada. Estas células al diferenciarse tomarán el nombre de células mioideas; éstas son las encargadas de la formación de las membranas basales. Ultraestructuralmente se caracterizan por tener un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado; en el espacio extracelular adyacente a éstas, se observa gran cantidad de material fibrilar como lo es la colágena y la fibronectina (Paranko et al, 1983).

iii) Diferenciación de las células de Sertoli (nombre dado a las células del epitelio interno). Estas tienen dos funciones principales: el empaquetamiento de las CG y la síntesis de la hormona antimulleriana (Josso et al, 1977), responsable de la regresión de los conductos Mullerianos. Probablemente, las células de Sertoli intervengan en la producción de un factor inhibidor de la meiosis (Byskov, 1978). Las células de Sertoli forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplásmicas que rodean a las CG. En el ratón, en etapa fetal, entre las células de Sertoli se encuentran uniones estrechas incompletas; éstas en el adulto se completan y forman la unión intersertoliana que origina la barrera hematotesticular (Nagano y Zuzuki, 1976). Estas células sólo proliferan durante la etapa fetal y durante un corto tiempo en el período postnatal; en la rata este lapso abarca hasta dos semanas después del nacimiento (Nagy, 1972).

La síntesis de la hormona inhibidora de los conductos mullerianos comienza poco tiempo después de la diferenciación de la gónada. La citodiferenciación endócrina de estas células

parece ser independiente de la formación de los cordones testiculares; lo anterior se desprende de los estudios realizados por Magre y Jost en 1984 donde muestran que en testículos de rata, con ausencia de organización testicular- provocada por el cultivo en un medio suplementado con suero bovino fetal (Magre et al 1981)- las células de Sertoli desarrollan y conservan la capacidad de síntesis de la hormona antimulleriana.

iv) Diferenciación de las células de Leydig. Estas se diferencian a partir del tejido intersticial y son las encargadas de la síntesis de andrógenos en el testículo. Las células de Leydig se citodiferencian poco tiempo después de la diferenciación de cordones testiculares. Al igual que en las células de Sertoli, parece que la citodiferenciación endócrina de las células de Leydig es independiente de la organización testicular. Patsavoudi et al (1985) realizaron un estudio en el que utilizaron el sistema de inhibición de organogénesis testicular provocado por el cultivo con suero bovino fetal (Magre et al 1981). En estas condiciones, observaron que las células de Leydig desarrollan y conservan la capacidad de sintetizar esteroides. En el ratón, la citodiferenciación de las células de Leydig, se hace evidente a partir de los 14 dpc; se caracterizan por presentar gran cantidad de mitocondrias de crestas tubulares, organelos característicos de células productoras de esteroides. También se observa a partir de este momento, un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso, aparición de gotitas de lípidos e inclusiones de glucógeno en el citoplasma (Russo y De Rosas, 1971). El origen de este tipo celular es 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. La función principal de este tipo celular durante el período prenatal es la producción de hormonas androgénicas, responsables de la diferenciación del tracto genital interno y externo del individuo.

v) Diferenciación de las células germinales (período prenatal). Las CG en el testículo temprano reciben el nombre de proespermatogonias (Hillscher y Hillscher 1978). Estas presentan características que indican que entraron a otra etapa de su diferenciación, representada por la iniciación de un período de proliferación activa seguido por un período de reposo mitótico que se mantiene hasta la pubertad. Dicho período de proliferación coincide temporalmente con un período de iguales características que ocurre a las CG en el ovario. El inicio del reposo mitótico de las CG del testículo coincide temporalmente con el inicio de la meiosis en el ovario. Se ha observado que en ocasiones, algunas CG intracordales en posición cercana al mesonefros parecen entrar a la profase de la primera división meiótica (Byskov, 1978); lo mismo se observó en algunas CG en posición extracordal y cercanas al mesonefros. Con base en las observaciones anteriores Byskov en 1978 propuso la existencia de un factor inhibidor de la meiosis sintetizado por las células de Sertoli que es antagonista de un factor inductor de la meiosis sintetizado por componentes epiteliales mesonefricos. Upadhyay y Zamboni (1982) encontraron que las CG que quedan atrapadas en la región de la glándula suprarrenal entran en meiosis sin importar el sexo genético del individuo, e incluso que estas

células llegan a presentar características morfológicas muy similares a folículos primordiales. Con base en lo anterior postularon (op cit.) que en la gónada debe existir algún factor inhibidor de la meiosis; sin embargo, tal y como lo sugieren sus resultados, están en contra de la existencia del factor inductor de la meiosis de origen mesonéfrico.

Otra característica importante que presentan las CG después de la diferenciación testicular temprana es la presencia de puentes citoplasmáticos producto de citocinesis incompletas. Estos puentes son conservados por las CG hasta su diferenciación en espermátidas y desaparecen cuando se diferencian en espermatozoides (Gondos, 1984). Se postula que la presencia de estos puentes esta involucrada con la manifestación de las siguientes funciones: 1) Sincronización de la maduración de las CG; 2) Nutrición de las CG; 1) Limitación del número de divisiones mitóticas por las que pasan; 4) Restricción de la mortalidad y 5) Regulación genética (Gondos, 1984).

2.3.2. Diferenciación ovárica.

2.3.2.1. Período prenatal.

El ovario, en comparación con el testículo, permanece más tiempo con un aspecto histológico similar a la gónada indiferenciada. En el ratón, el testículo se diferencia claramente dos días antes de que comience la diferenciación ovárica, representada claramente por el inicio de la meiosis. Los cordones ováricos (constituidos por agrupaciones de CG y células del epitelio interno), que en algunos puntos están en continuidad con el epitelio superficial, son pequeños, de forma

irregular y están rodeados por una delgada lámina basal continua. Los cordones no sufren un rearrreglo inmediato por invasión de mesénquima y vasos sanguíneos, como ocurre en la diferenciación testicular, sino hasta los 15 dpc, donde ambos elementos originan una separación más evidente de los cordones ováricos y la separación de cordones del epitelio superficial en la región más cercana al mesonefros. La invasión de mesénquima y vasos sanguíneos proviene de una región de túbulos mesonéfricos que conectan con el ovario, el rete ovarii (Sainmont, 1906). Dicha invasión se propaga dentro del ovario en forma radial y es más evidente conforme se acerca el día del nacimiento. Este evento es de gran importancia en el proceso de la foliculogénesis. Finalmente, algunos estudios realizados en rata y ratón sugieren que la presencia de las CG no es una condición necesaria para la diferenciación estructural del ovario en etapa prenatal (Merchant, 1975; Merchant y Centeno, 1981).

1) Diferenciación de las CG en el ovario.

Las células germinales, que una vez en el ovario se denominan ovogonias, inician un período de proliferación activa que termina con el inicio de la meiosis. Al igual que las prespermatogonias del testículo, las ovogonias también presentan puentes citoplásmicos producto de citocinesis incompletas. Dichos puentes podrían tener una función muy importante en la sincronización de la meiosis, además de las ya mencionadas para la diferenciación testicular (Gondos, 1984). Los puentes citoplasmáticos en la ovogonias desaparecen con la formación de folículos primarios.

El ratón es un mamífero que posee lo que se denomina meiosis

inmediata, es decir que comienza muy poco tiempo después de la diferenciación sexual (Byskov, 1979). Según Brambell (1927) entre los 13 y 14 dpc se observan ovocitos -llamados así para resaltar que han entrado en meiosis- en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica, es decir en preleptoteno y leptoteno. En estas etapas 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 las etapas de cigoteno y paquiteno, esta última representada por la presencia de complejos sinaptonémicos, formado por el acoplamiento de los cromosomas homólogos y una estructura protéica que le da la apariencia de un complejo tripartita cuando se observa al microscópio electrónico. Es durante estas dos etapas que ocurre un proceso de degeneración en algunos de los ovocitos como parte de un programa de muerte celular ya establecido. En el ratón, la etapa de paquiteno se prolonga hasta un par de días después del nacimiento. Como ya se mencionó anteriormente, se ha propuesto que el inicio de la meiosis está controlado por un factor de origen mesonéfrico (Byskov, 1978). Sin embargo, hay autores que ponen en duda la existencia de tal factor (Upadhyay y Zamboni, 1982; Challoner, 1975 con estudios de cultivo de órganos.) y proponen en cambio, que el inicio de la meiosis es un proceso espontáneo que se da en un periodo crítico del desarrollo.

2.3.2.2. Periodo postnatal.

En el ratón ocurren tres eventos primordiales después del nacimiento: i) la formación de folículos, ii) la detención de la meiosis al final de la profase I de la división meiótica y iii)

la diferenciación del tejido esteroideogénico.

i) La foliculogénesis es el mecanismo mediante el cual los ovocitos se individualizan y se rodean de su dotación de células foliculares y de una lámina basal. Dicha individualización se realiza por la fragmentación de los cordones ováricos (Brambell, 1927; Merchant, 1975; 1984). Esta comienza en la región cercana al rete ovarii y es provocada por la invasión de mesénquima y vasos sanguíneos, lo que ocasiona la fragmentación de los cordones ováricos. Los estudios de microscopía electrónica muestran como las células mesenquimáticas se abren camino entre cada uno de los grupos de ovocitos rodeados de células prefoliculares y además, terminan de depositar el material que forma la membrana basal que rodea a los folículos (Chimal, 1987). La formación de folículos primordiales - ovocitos individualizados rodeados por una capa de células foliculares y una lámina basal - es dependiente de la presencia de ovocitos. La ausencia de ovocitos conlleva a que los folículos no se formen en el ovario (Merchant, 1976; Merchant y Centeno, 1981). Las células foliculares ultraestructuralmente se caracterizan por tener un gran número de mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso evidente, complejo de Golgi desarrollado y algunas gotitas de lípidos incluidas en su citoplasma. También presentan uniones intercelulares entre sí así como sucede con los ovocitos. Los tipos de uniones son adherentes y comunicantes.

Byskov et al (1977) proponen que los túbulos mesonéfricos del rete ovarii tienen un papel muy importante en el proceso de la foliculogénesis. Los autores observaron que en el ratón, la formación temprana de los folículos y su crecimiento dependen de

la presencia del rete ovarii, e inclusive han propuesto que las células foliculares se derivan de esta estructura (Byskov y Lintern-Moore, 1973; Byskov, 1975; Peters, 1978). Sin embargo, en varios estudios in vitro de cultivo de gónadas sin mesonefros, se observa que hay formación de folículos primordiales lo que pone en duda el papel que se postula para el rete ovarii (Baker y Neal, 1974 en humano; Odor y Blandau, 1971 y Chimal, 1987 en ratón).

Una vez formados los primeros folículos primarios, alrededor del cuarto día postparto, se forma una teca primitiva representada por "células parecidas a tejido conectivo que se arreglan en una forma circular alrededor del epitelio folicular" (Brambell, 1927).

Otra característica folicular importante que aparece pocos días después del nacimiento, es la formación de la zona pelúcida. Esta está formada por el depósito de un material acelular de naturaleza glucoprotéica que aparece entre la membrana plasmática del ovocito y la de las células foliculares circundantes. Odor y Blandau (1969; 1971) observaron que en el ratón la zona pelúcida se comienza a formar en los primeros folículos formados al segundo día postparto. Se ha postulado que el material glucoprotéico que la constituye es sintetizado por las células foliculares (Chiquoine, 1960); sin embargo, hay evidencias que sugieren que dicho material es sintetizado por el ovocito (Chimal, 1987).

ii) Detención de la meiosis.

El núcleo de los ovocitos de los folículos primarios ya formados se encuentra en la etapa de diploteno de la profase I de la división meiótica. Esta etapa se caracteriza por la

reaparición de hebras sencillas de cromatina rodeadas por una vaina fibrilar organizada en proyecciones laterales y horquillas con gránulos asociados. Es en esta etapa donde se lleva a cabo el entrecruzamiento entre los cromosomas homólogos; el nucléolo es más grande que en otras etapas y presenta una apariencia reticular o compacta (Zamboni, 1972). En los roedores se encuentra un estado más de la profase I que es el dictiado (Slizynski, 1967); en éste, los cromosomas se extienden aún más que en el diploteno y aparecen como hebras finas reticuladas asociadas a grumos de heterocromatina (Zamboni, 1972). En el ratón la meiosis se detiene en el estado de dictiado. Se ha sugerido que el contacto entre ovocito y células foliculares juega un papel importante en la detención de la meiosis (Ohno y Smith, 1964). Byskov (1978) propuso que este proceso se detiene por la presencia de un factor inhibidor de la meiosis sintetizado por las células foliculares; sin embargo, hace falta más evidencia experimental que apoye esta idea.

iii) Diferenciación del tejido esteroideogénico.

En el ratón la diferenciación del tejido esteroideogénico depende de la formación de folículos y, por lo tanto, de la presencia de CG (Merchant, 1984). En este roedor, las primeras células con características de síntesis de esteroides aparecen pocos días después del nacimiento (Pehleman y Lombard, 1978). Los estudios realizados con ratas tratadas con busulfán y con un ratón mutante estéril sugieren que el proceso de atresia folicular, durante la infancia o el periodo prepuberal, es de gran importancia para la inducción de la diferenciación del tejido intersticial esteroideogénico (Merchant, 1979b; Merchant, 1976; Merchant y Centeno, 1981).

3. El enfoque morfogénético experimental.

En la secuencia de eventos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario (morfogénesis, proliferación y diferenciación celular), la superficie celular juega un papel muy importante. Es la estructura mediante la cual las células reconocen su microambiente, se comunican, reconocen a otras células y se unen para formar tejidos. Estos eventos recíprocos 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 eventos muy importantes en los procesos morfogénéticos. Las células embrionarias son capaces de identificar a otras por medio del contacto y de asociarse selectivamente para desarrollar 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 la evidencia que apoya lo anterior proviene 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 (Wilson, 1907; Galtsoff, 1925; Faure-Fremient, 1932; Brien, 1937).

Dichos estudios muestran que las células disgregadas mantienen su identidad original por lo que son capaces de reensamblarse y de reconstituir su sistema multicelular característico; esto mediante el reconocimiento mutuo, la asociación selectiva y segregación de acuerdo a sus entidades

funcionales y tipo celular. Algo muy importante de mencionar respecto a la utilización de este modelo experimental es que los autores postulan que el proceso de ensamblaje morfogenético en reagregados celulares es fundamentalmente similar a los eventos que ocurren en la morfogénesis normal de los embriones.

El modelo experimental de reagregación de suspensiones celulares ha sido utilizado con el fin de aclarar el mecanismo de la formación de las asociaciones celulares específicas durante la morfogénesis de varios órganos (Moscona, 1974; Fischman y Moscona, 1971; Moscona y Moscona, 1965; Garber y Moscona, 1972).

Este enfoque experimental también se ha utilizado para tratar de entender los mecanismos de regulación involucrados en la diferenciación sexual de gónadas de aves y mamíferos (Zenzes, 1981; Zenzes y Engel, 1981; Urban et al, 1981; Muller et al, 1982; Zenzes et al, 1980; Ohno et al, 1978; Zenzes et al, 1978a; O y Baker, 1978, Grund et al, 1986), en función de que los eventos que ocurren durante la reagregación de suspensiones celulares recapitulan los eventos que ocurren durante la morfogénesis normal de la gónada.

Varios de los trabajos realizados sobre reagregación de tejido gonadal se han dirigido en dos sentidos fundamentales: i) observar el papel del antígeno de histocompatibilidad H-Y en la diferenciación testicular (Zenzes, 1981; Zenzes y Engel, 1981; Urban et al, 1981; Muller et al, 1982; Zenzes et al, 1980; Ohno et al, 1978; Zenzes et al, 1978a) y ii) el esclarecimiento del mecanismo de regulación del inicio de la meiosis (O y Baker, 1978 con estudios en hamster). La mayoría de estos trabajos se han realizado con gónadas de ratas neonatales. Se ha observado

que los patrones de reagregación varían de acuerdo a la edad embrionaria del tejido (Hausman y Moscona, 1975). Debido a lo anterior, parece necesario realizar más estudios con este enfoque experimental en gónadas de etapas tempranas del desarrollo con la finalidad de obtener un mejor conocimiento, a nivel celular, de los eventos que ocurren durante la morfogénesis y diferenciación gonadal.

El método experimental empleado en forma más frecuente en estudios de reagregación de suspensiones celulares de órganos disgregados enzimáticamente es el modelo desarrollado por Moscona en 1961. Este modelo, denominado de "agregación por rotación", consiste en colocar la suspensión de células dispersadas en matraces que contienen un medio de cultivo específico; los matraces se colocan en un dispositivo de rotación controlada bajo condiciones de cultivo determinadas. Mediante este método se puede obtener la reconstitución (reagregación) del patrón histotípico original del tejido que se disgregó enzimáticamente. La principal limitante para el empleo de la técnica de Moscona es la cantidad de material histológico requerido, ya que existe una masa crítica, por abajo de la cual la morfogénesis y el desarrollo del reagregado no se llevan a cabo (Moscona, 1956). Se han descrito otros métodos de formación de reagregados celulares. Uno de ellos está basado en la formación y cultivo de botones celulares formados por centrifugación (Regenass et al, 1982; O y Baker, 1978). El empleo de la técnica de reagregación por centrifugación tiene la ventaja de que la cantidad de material biológico requerido es relativamente bajo. Con base en lo anterior, en el presente trabajo se utilizó un sistema de reagregación por centrifugación

que se describirá en la sección de materiales y métodos.

Los eventos que se postulan ocurren hacia la reagregación de suspensiones celulares se pueden resumir de la siguiente manera: inmediatamente después de disociado el tejido, las células presentan gran número de prolongaciones citoplásmicas. Es por medio de éstas que las células forman puntos de contacto con otras a distancia. Estas prolongaciones, una vez que han hecho contacto con células circundantes, se retraen para dar origen a agregados compactos de células. Después, o quizá simultáneamente, dentro de los agregados las células migran y toman posiciones preferentes según su tipo celular; esto es, hay una segregación de tipos celulares lo que lleva a una reconstitución progresiva del patrón histológico similar al del tejido de origen. Por último, se establecen uniones intercelulares entre las células del agregado. En la mayoría de los casos, estos eventos ocurren durante tiempos de cultivo que van de 12 a 24 horas (Ben-Shaul y Moscona, 1975a y b; Shimada et al, 1974).

A nivel molecular, el reconocimiento y la adhesividad diferencial deben estar mediados por moléculas en la superficie celular. Existen tres hipótesis que tratan de explicar, a nivel molecular, como ocurren estos eventos:

i) Roth et al (1971) y Roseman (1974) propusieron un modelo que sugiere que la adhesión celular selectiva es el resultado de interacciones entre carbohidratos y glucosiltransferasas en la superficie celular. La diversidad de cadenas de carbohidratos y de glucosiltransferasas, así como la especificidad de estas últimas por aquellas, proporcionan las variaciones necesarias para dar lugar a las diferencias en adhesividad específica que

existe entre la diversidad de células.

ii) Steinberg (1964) propone que las células se adhieren por uniones cualitativamente similares pero que las diferencias cuantitativas de estos enlaces entre las células son las responsables de la adhesión celular y de la fuerza de tal adhesión, lo que da lugar a afinidades celulares específicas.

iii) Moscona (1974) y Moscona et al (1975) propusieron que las afinidades celulares embrionarias están mediadas por interacciones entre componentes macromoleculares específicos de la superficie celular. Estos tienen la función de ser sitios de reconocimiento y ligandos entre célula y célula. En este modelo el reconocimiento entre células está determinado por características químicas de los ligandos, así como sus cantidades y arreglo topográfico en la superficie celular. Esta hipótesis postula que la superficie celular de varias líneas y tipos celulares está marcada con patrones específicos de ligandos celulares. Dichos patrones expresan las identidades fenotípicas de las células y determinan las propiedades de reconocimiento entre las células y sus afinidades mutuas.

Existen varias evidencias experimentales que apoyan esta última hipótesis. Se sabe que existen moléculas de superficie que son tejido o tipo celular específicas, así como también las hay entre células del mismo origen embrionario (Goldschneider y Moscona, 1972); también, se han detectado algunas que son estado específicas (Fischman et al, 1976). De estos componentes de superficie se han aislado e identificado los llamados "factores de agregación celular"; dichos factores, se ha visto, juegan un papel muy importante en el reconocimiento y adhesividad celular (Hausman y Moscona, 1975).

II. Objetivos

1. Establecer una técnica que permita la reagregación y morfogénesis a partir de suspensiones celulares de gónadas embrionarias, fetales y neonatales del ratón.
2. Comparar los patrones de agregación obtenidos a partir de gónadas de diferentes etapas del desarrollo.
3. Observar si el suero bovino fetal tiene efectos sobre la reagregación de suspensiones celulares de gónadas embrionarias, fetales y neonatales de ratón.

III. MATERIALES Y METODOS

1. Animales.

En el presente estudio se trabajó con gónadas embrionarias fetales y neonatales de ratón de la cepa CD I de las siguientes edades: 12,13,14,15,16 y 17 días de gestación (dg); 1 y 2 días postparto (dpp).

Se colocaron cinco grupos de hembras jóvenes y vírgenes (tres hembras por grupo) con cinco machos sementales durante toda la noche. A la mañana siguiente se revisaron y se separaron las hembras que presentaron tapón vaginal, indicación de que hubo cópula. El día que se registró el tapón vaginal se consideró como día cero del período de gestación. El nacimiento de las crías en nuestra colonia fue al día 18.

2. Obtención de gónadas.

Se utilizaron, para cada experimento, dos ratonas de cada una de las edades mencionadas y se trabajó de la siguiente manera:

Las hembras gestantes se sacrificaron por dislocación cervical. Se colocaron con el vientre hacia arriba en un campo estéril y se les aplicó en el abdomen una solución atiséptica de BENZAL-alcohol al 70% en una proporción de uno a uno. Se les practicó una laparotomía para exponer los órganos internos; con ayuda de pinzas y tijeras, se separaron los úteros colocándolos en una caja de Petri estéril para ser transportados al cuarto de cultivo. Aquí se disecaron los embriones separándolos de la placenta y el amnios. Se colocaron en una caja de Petri que contenía medio de Leibovitz L-15 (L-15) (GIBCO) suplementado con

200 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomicina (MICROLAB), ajustado a un pH de 7.4 y esterilizado por filtración. A continuación cada embrión se colocó sobre una base de hule para realizarle un corte que abarcó la parte dorsal y posterior del embrión. Bajo el microscopio estereoscópico se localizaron las gónadas, se sexaron por sus características morfológicas y por su ubicación. Con microtijeras se aislaron las gónadas y se colocaron en pozos que contenían medio L-15 para mantenerlas antes de su disgregación enzimática .

Los ratones postnatales se limpiaron con una solución antiséptica antes de transportarlos al cuarto de cultivo en una caja de Petri estéril. Se sacrificaron por decapitación y se trataron de la misma manera que los embriones y fetos.

3. Disgregación enzimática.

Las gónadas aisladas se revisaron para asegurarse que estuvieran libres de tejido mesonéfrico. Para cada una de las edades se utilizó diferente número de gónadas: a) De 12 a 14 dg se utilizaron veinte gónadas de cada sexo separadas en dos grupos de diez. b) De 15 a 17 dg, 1 y 2 dpp se utilizaron de 4 a 6 testículos separados en dos grupos de 2 a 3 por grupo y de catorce a veinte ovarios separados en dos grupos de 7 a 10.

En caso de ser necesario , las gónadas se fraccionaron con microtijeras. Se retiró el medio L-15 de los pozos y se sustituyó por 0.5 ml de una solución 0.25% (p/v) de tripsina (DIFCO) en solución salina de Rinaldini (1959) modificada (se le agregó sacarosa en lugar de glucosa). Se incubaron a 37°C por lapsos de 10 a 25 minutos dependiendo de la edad de las gónadas. Después de la incubación se colocaron las gónadas en tubos

estériles desechables de 5 ml (FALCON), debidamente rotulados, que contenían 0.5 ml de medio MacCoy 5a modificación (MICROLAB), suplementado con 200 U/ml de penicilina y 200 µg/ml de estreptomicina (MICROLAB) y con 10% de suero bovino fetal (GIBCO) (inactivado 30 min a 56°C durante media hora) para detener la reacción enzimática. El medio de cultivo suplementado con suero y antibióticos se denominó "MSA". Los tubos se centrifugaron 3 min a 1,500 rpm y se decantaron para realizar un lavado más con el mismo medio (MSA) . Después del segundo lavado se resuspendieron las gónadas en 400 µl de MSA y por agitación mecánica (golpeando el tubo con el dedo no más de cuarenta veces) se disgregaron hasta obtener una suspensión homogénea. Se tomó una muestra de cada suspensión para tener controles del estado de las células después de la disgregación enzimática; cada una de éstas se colocó en un tubo de centrifuga de 400 µl (EPENDORFF) y se centrifugó 7 min a 1,500 rpm para obtener un botón de células el cual se procesó para su análisis citológico y ultraestructural.

4. Prueba de viabilidad de gónadas disgregadas.

A un disgregado de gónadas de cada sexo y de cada edad se le aplicó la prueba de viabilidad con azul de tripano. Se tomaron 40 µl de la suspensión de células disgregadas; se agregaron a un tubo de centrifuga de 400 µl (EPENDORFF) que contenía 8 µl de azul de tripano 0.4% (consultar Apéndice I; página 62) y 40 µl de medio MSA. Se mezcló y, después de 5 min (no más de 15) se contó en una cámara de Neubauer el número total de células y el número de células teñidas; este último correspondió al de las células no viables. Los resultados se expresaron en porcentaje

de viabilidad. También se tomaron datos relacionados al porcentaje de células disgregadas, se contaron el número de células aisladas y el número de células no separadas.

5. Formación de botones celulares por centrifugación.

Cada suspensión de células disgregadas se colocó en un tubo de centrifuga de 400 μ l (EPPENDORF) y se centrifugaron durante 7 min a 1,500 rpm. Posteriormente se procedió a desprender los botones celulares de la siguiente manera: cada tubo se limpió con alcohol al 70% y se cortó en la porción distal al tapón, aproximadamente a una distancia de 5 mm del fondo del tubo, procurando no seccionarlo por completo.

Se manipuló cada tubo por el extremo del tapón, se colocó el casquete cortado bajo el microscopio estereoscópico y, con ayuda de una microespátula de platino, se desprendió el botón celular sin desintegrarlo, hasta que quedara completamente libre.

6. Recuperación y cultivo de los botones celulares.

Cada botón de células se recogió con una punta para pipeta de 250 μ l (CLEAN-PAK), cortada por la punta de forma diagonal y con abertura suficiente para que entrara libremente, acoplada a una micropipeta (GILSON) con un volumen entre 6 y 8 μ l.

Cada botón (cuatro de cada edad y dos de cada sexo) se colocó sobre un filtro NUCLEOPORE (de 13 mm de diámetro y con una porosidad de 1.0 μ m) que flotaba sobre 1.5 ml de medio de cultivo contenido en una caja de Petri desechable y estéril de 35 mm de diámetro (LUX).

Un botón de cada edad y de cada sexo se cultivó en medio MSA (medio de cultivo MacCoy + suero+ antibióticos) en una estufa a

37°C con 100% de humedad y en una atmósfera al 5% de CO₂ en aire durante 24 horas . Los botones paralelos se cultivaron en medio MacCoy 5a modificación suplementado con la misma cantidad de antibióticos y en ausencia de suero (MA) bajo las mismas condiciones de cultivo.

Transcurridas las 24 hr de cultivo se observaron los reagregados bajo el microscopio estereoscópico y se anotaron sus características. Posteriormente se procesaron para su análisis histológico y ultraestructural.

Cada experimento se repitió al menos dos veces.

Como controles se utilizaron gónadas de las edades mencionadas fijadas inmediatamente después de su obtención. Estas fueron procesadas de la misma manera que los reagregados obtenidos.

7. Microscopía.

7.1. Fijación e inclusión.

Los reagregados y controles se fijaron por inmersión en fijador de Karnovsky (1965) modificado (sin CaCl₂) durante una hora a 4°C y se lavaron una hora a 4°C en amortiguador de cacodilatos 0.1 M con un pH de 7.4 . Se postfijaron en una solución 1% (v/v) de OsO₄ (Zetterqvist, 1956) durante media hora a 4°C. Los botones de las suspensiones celulares control se procesaron de la misma manera; solo se centrifugaron después de cada paso si se había resuspendido el botón.

Las muestras se lavaron después de la postfijación con agua destilada; se deshidrataron con alcoholes graduales: 70%, 80%, 90% y 95%, diez minutos en cada uno; alcohol absoluto, dos

cambios de diez minutos. Posteriormente se pasaron a óxido de propileno durante veinte minutos. Se impregnaron en una mezcla de Epon 812-óxido de propileno en proporción de uno a uno, durante una hora; finalmente en Epon 812 durante dos horas. La deshidratación y la impregnación se realizaron a temperatura ambiente. Se incluyeron en Epon 812 (Luft, 1961) y se dejaron 12 hr a 60°C para la polimerización de la resina.

7.2. Análisis histológico.

Se obtuvieron cortes semifinos (de 190 nm a 1 μ m de espesor) en el ultramicrotomo ULTRATOME III 8800 (LKB), se tiñeron por flotación con azul de toluidina 0.4% (consultar Apéndice II; página 62) y se montaron en portaobjetos para su estudio en microscopia de luz. Las observaciones y toma de fotografías se realizaron en los microscopios de luz ULTRAPHOT II (ZEISS) y en un OPTIPHOT (NIKON).

7.3. Análisis ultraestructural.

Se obtuvieron cortes finos (de 60 a 90 nm de espesor) en el ULTRATOME III 8800 (LKB) y se montaron sobre rejillas de cobre; éstas se contrastaron 5 min con acetato de uranilo al 2.5% en agua destilada y 1 min con citrato de plomo alcalino (consultar Apéndice III; página 63). Las rejillas se observaron en el microscópio electrónico EM-9 (ZEISS). El análisis de los resultados se realizó sobre el material electromicrográfico tomado.

IV. RESULTADOS

1. Incubación enzimática requerida para disgregación.

La tripsina es una de las enzimas más empleadas en la disgregación de tejidos. Los tiempos requeridos para una eficiente disgregación del tejido gonadal resultó ser dependiente de las edades del sujeto experimental.

Se necesitaron tiempos de incubación cortos para gónadas de ambos sexos de edades fetales tempranas (10 minutos para 12 y 13 dg). Gradualmente los tiempos de incubación requeridos aumentaron conforme aumentó la edad fetal o neonatal (25 minutos para las edades de 17 dg a 2 dpp). La gráfica número 1 muestra los tiempos de incubación utilizados para disgregar el tejido gonadal de ambos sexos.

Los ovarios de las edades entre 17 dg y 2 dpp presentaron problemas de disgregación. Después de la incubación enzimática y disgregación mecánica, quedaron varios fragmentos de tejido no disociado. Se prefirió no aumentar el tiempo de incubación enzimática y trabajar con las suspensiones de células obtenidas no sin antes descartar los fragmentos de tejido no disociado. Por esta razón se tuvo que emplear mayor cantidad de gónadas femeninas, para obtener una cantidad suficiente de células disociadas para la formación de botones celulares del tamaño deseado.

2. Viabilidad de las suspensiones celulares.

El tratamiento de disgregación enzimático-mecánico pudo, de alguna manera, afectar la viabilidad de las células disociadas. La tripsina es una enzima que afecta en gran medida las

proteínas de la superficie celular y modifica la fluidez de la membrana. Esta modificación de la superficie puede afectar la relación de la célula con su entorno, y provocar que resientan la naturaleza del sistema de disgregación. Para evitar cultivar dentro de los botones celulares gran número de células no viables, se realizaron pruebas de viabilidad a las suspensiones celulares previas a la formación de botones. Esto con la finalidad de determinar el porcentaje de células muertas después de la disociación.

La gráfica 2 muestra los porcentajes de viabilidad obtenidos con la prueba de exclusión de azul de tripano en suspensiones celulares de gónadas de las edades trabajadas y de ambos sexos. En esta se puede observar que en todos los casos el porcentaje de viabilidad nunca fué menor del 90%. Dicho porcentaje se consideró como bueno para proceder a la formación y cultivo de botones celulares para su reagregación.

3. Porcentaje de células disgregadas en las suspensiones celulares.

Se aprovechó el conteo de células viables en la cámara de Neubauer para realizar también un conteo, en las suspensiones obtenidas, del número de células individualizadas y de las que se mantenían unidas a otras formando grupos de células no disociadas. La gráfica 3 muestra los resultados, expresados en porcentaje de disgregación. Se observa que las suspensiones celulares de gónadas de todas las edades así como de ambos sexos, consistían de células individualizadas siempre por arriba del 80%. Se observó la presencia de algunos grupos de células no individualizadas; sin embargo estos estaban constituidos de

no más de ocho células. En el caso de disgregados de testículos, estos grumos de células no representaron la adición de estructuras testiculares previas al cultivo, es decir no existían fragmentos de cordones testiculares no disgregados. En el caso de los disgregados de ovarios de 2 dpp se observó la presencia de algunos ovocitos de gran tamaño rodeados por hasta tres células foliculares o prefoliculares.

4. Análisis de los disgregados control.

4.1. Disgregados de testículos.

Los botones celulares procesados para ver el estado de las células después de su disgregación y antes del cultivo en forma organotípica, mostraron que en ningún caso existían estructuras testiculares no disgregadas por la acción enzimática (Figuras 1 A, C y D). En general, se observó una buena disociación del tejido en todas las edades trabajadas y con los tiempos de incubación enzimática empleados. La mayoría de las células eran independientes aunque se encontraron algunos grupos de células que estaban unidos por uniones intercelulares tipo desmosoma (Figura 1 B). Los grupos de células encontrados estaban constituidos por un máximo de 8 células.

En los disgregados de testículos se observaron todos los tipos celulares que constituyen al órgano según la edad en la que fueron disgregados: células epiteliales o de Sertoli, mesenquimáticas, endoteliales, fibroblastos, de Leydig y células germinales (Figuras 1 C y D).

La superficie celular de las células somáticas presentaba gran actividad. Esta consistió de la formación de gran número de

prolongaciones citoplasmáticas del tipo filopodios, es decir filamentosas. También presentaban prolongaciones citoplasmáticas tipo lobopodios (Figuras 1 C y D). Las proespermatozonias de edades fetales tempranas presentaban la formación de prolongaciones citoplasmáticas tipo lobopodios, estas fueron disminuyendo conforme avanzó la edad fetal o neonatal. Algunas proespermatozonias se mantuvieron en grupos por medio de complejos de unión y fue evidente que los puentes citoplasmáticos característicos no son destruidos por el tratamiento enzimático-mecánico de disgregación (Figura 1 E). En disgregados de testículos de 17 dg a 2 dpp se observó que las células somáticas presentaban un citoplasma muy vacuolado. Probablemente el estado de estas células fué provocado por la inmersión en tripsina durante un tiempo prolongado (Figura 1 D).

4.2. Disgregados de ovarios.

Los botones celulares de disgregados de ovarios de las edades fetales de 12 dg a 2 ddp presentaron características similares a las observadas en los disgregados de testículos, es decir, la formación de gran número de prolongaciones citoplasmáticas. En los disgregados de ovarios de 17 dg a 2 dpp algunos ovocitos murieron al parecer por el tratamiento de disgregación. Se encontraron también ovocitos de diferentes estados de maduración, esto indicado por su tamaño. En los disgregados de ovarios de 2 dpp se encontraron ovocitos individualizados y algunos rodeados por 2 ó 3 células prefoliculares o foliculares sin embargo en ningún caso se observó que la lámina basal se conservara. También se observó que en disgregados de ovarios de 17 dg a 2 dpp se conservó gran cantidad de fibras de colágena entre el espacio "intercelular".

5. Botones celulares reagregados después de 24 horas de cultivo.

Después de 24 hr de cultivo en forma organotípica cada cultivo se revisó bajo el microscopio estereoscópico. Los botones celulares cultivados con medio suplementado con suero bovino fetal (SBF) formaron una masa celular compacta, translúcida y de bordes lisos. Por el contrario los botones celulares cultivados en medio sin SBF eran de forma muy irregular y aplanada, aunque con apariencia compacta y translúcida. La diferencia más aparente fué que los botones cultivados con suero siempre eran más voluminosos y redondeados que los cultivados sin él. Después de las 24 hr de cultivo cada botón celular se le denominó "reagregado" por considerarse que después de ese tiempo de cultivo se llevaron a cabo eventos de identificación, segregación y reensamblaje celular para dar origen a estructuras gonadales.

6. Reagregación y morfogénesis.

En todos los casos, al realizar el análisis histológico de los reagregados, se observó que después de 24 hr de cultivo en forma organotípica, se reconstituyeron las características principales que identifican a cada órgano en condiciones de desarrollo normal. De aquí se desprende que durante este tiempo de cultivo se llevó a cabo un desplazamiento celular en el interior de los botones, que parecen recapitular la morfogenénesis del tejido gonadal. Los criterios de evaluación de la organización utilizados fueron: 1) A microscopía de luz, la apariencia del reagregado es semejante a la del órgano

normal, es decir, la formación de estructuras similares a cordones testiculares u ováricos según el caso. Esto implica la segregación de ambos componentes somáticos, el epitelial y el estromático. 2) A nivel ultraestructural, la formación de láminas basales que indican la restitución de un compartimiento epitelial separado del estromático y la formación de uniones intercelulares. En lo que respecta al compartimiento estromático, se tomó en cuenta la restitución de la matriz extracelular, así como la presencia de fibras de colágena y otras glucoproteínas en el espacio extracelular.

6.1. Reagregación y morfogénesis de testículos.

6.1.1. Las células somáticas.

Los reagregados de suspensiones celulares de testículos cultivados con y sin suero bovino fetal presentaron características similares. En observaciones realizadas con el microscopio de luz, todos presentaron la formación de estructuras semejantes a cordones testiculares. La morfología de dichos cordones fué muy variable: desde algunos pequeños de forma cilíndrica hasta otros grandes e irregulares. Algunos de estos últimos cordones eran superficiales; es decir, no quedaron en la zona medular del reagregado sino que quedaron en posición superficial (Figuras 2 A-C).

A nivel ultraestructural las estructuras parecidas a cordones testiculares estaban constituidas por células epiteliales o de Sertoli; estas presentaron la formación de láminas basales que separaban el compartimiento estromático del epitelial. Entre las células epiteliales se registró la presencia de uniones intercelulares tipo desmosoma y uniones

estrechas incompletas; no se observaron otro tipo de uniones. En la región basal, las células epiteliales presentaron un citoesqueleto muy desarrollado, como lo muestra la gran cantidad de microfilamentos que se disponen de forma paralela a la lámina basal (Figuras 3 A y B).

En los reagregados de testículos de todas las edades se observaron zonas en la que la lámina basal no era continua. Estas zonas se pueden interpretar como regiones en las que la lámina basal se estaba formando de novo en el momento de la fijación. Aquí se observaron prolongaciones citoplásmicas por parte de las células epiteliales, éstas formaron interdigitaciones y establecieron contacto directo con las células del estroma (Figura 3 C).

En reagregados de testículos de 1 y 2 dpp se observaron algunas zonas en las que permanecían mezcladas las células epiteliales y las del estroma.

Los cordones se encontraron incluidos dentro de un tejido estromático organizado en forma diferente según la etapa de desarrollo en la que se hizo la disgregación-reagregación.

Al microscopio de luz, el estroma presentaba una apariencia que fué de laxa a compacta (Figuras 2 A-C). A nivel ultraestructural las células tipo fibroblasto eran fusiformes o irregulares, presentaban un retículo endoplásmico muy desarrollado. Hacia el espacio extracelular contiguo a estas células se observaron gran cantidad de fibras de colágena y algunos depósitos de otro material fibrilar de naturaleza no identificada (Figuras 4 A y B).

En reagregados de testículos de 15 dg a 2 dpp, se observó que algunas células del estroma se aplanaron en sentido paralelo

a la lámina basal que rodea a los cordones testiculares (Figuras 4 A y 5 A). Estas presentaron gran similitud con las células miodes que aparecen durante la morfogénesis normal del testículo. Al igual que en testículos normales, estas células aparentemente secretaron fibras de colágena las cuales se depositaron sobre la lámina basal. A nivel ultraestructural estas células son de forma alargada dispuestas en sentido paralelo a la lámina basal y presentaron un retículo endoplásmico muy desarrollado. El depósito de fibras de colágena sobre la lámina basal por parte de éstas células se observó que era más abundante conforme avanzaba el día de desarrollo de los reagregados. Al parecer existe una relación directa entre la edad fetal o neonatal del reagregado y la cantidad de fibras de colágena depositadas sobre la lámina basal. (Compárese las figuras 3 B y 4 C).

Las células de Leydig se localizaron siempre en el estroma en reagregados de testículos de 13 dg a 2 dpp. Las características por las que se identificaron fueron: Al microscopio de luz son células que se tiñen densamente con azul de toluidina (Figura 5 B). Ultraestructuralmente por la presencia de gran número de mitocondrias con crestas de tipo tubular e inclusiones lipídicas en su citoplasma (Figuras 6 A y B). Algunas de estas células presentaron en su citoplasma inclusiones de glucógeno y en ocasiones se observaron que formaban cadenas o agrupamientos.

6.1.2. Las células germinales.

Los reagregados en general eran sanos como lo demostró la presencia de gran número de figuras mitóticas tanto en las

células somáticas como en las células germinales, estas últimas antes de entrar en reposo mitótico. Es importante hacer notar que el periodo de proliferación activa por el que pasan las proespermatogonias no se ve afectado por el proceso de disgregación - reagregación de los testículos.

Respecto a la conducta de las proespermatogonias en los reagregados de diferentes edades, se observó que a partir de los 15 dg, su incorporación dentro de los cordones fué menor, de manera que la mayoría permanecían anormalmente en el estroma. (Figuras 2 B-C y 5 B).

A nivel ultraestructural las proespermatogonias incluidas en el estroma presentaron características similares a las que presentan las células in vivo: núcleo grande y redondeado, mitocondrias perinucleares de crestas escasas, citoplasma con gran cantidad de ribosomas libres y vesículas de núcleo denso (Figuras 5 A y 6 A).

Para tener una idea más clara de la dinámica de este evento, se realizó un estudio cuantitativo de la cantidad de proespermatogonias que quedaron en posición intracordonal en relación a las que ocupaban una posición extracordonal en reagregados de las edades entre 12 dg y 1 dpp cultivados con suero bovino fetal. La gráfica 4 muestra los valores expresados en porcentaje, del número de células en ambas posiciones. En ésta se muestra como el porcentaje de células germinales en posición intracordonal decrece de manera gradual de un valor máximo, obtenido en reagregados de testículos de 12 dg, hasta un mínimo de alrededor de 3% en reagregados de testículos de 15 dg a 1 dpp. De manera inversa se observó que la cantidad de células en posición extracordonal se incrementó desde un mínimo,

en reagregados de testículos de 12 dg, hasta un máximo de cerca de 97% en reagregados de testículos de 15 dg a 1 dpp.

Una observación interesante en los reagregados fué el contacto directo de las proespermatogonias extracordonaes con células de Leydig (Figura 6 A).

Algunas de las proespermatogonias excluidas o en el borde del cultivo, presentaban signos de muerte celular; esto es la vacuolización de su citoplasma y algunas zonas de la superficie celular interrumpida.

6.2. Reagregación y morfogénesis del ovario.

6.2.1. Las células somáticas.

En todos los reagregados se observó segregación de componentes epitelial y estromático. Al microscopio de luz los reagregados de ovarios de 12 a 15 dg cultivados con y sin suero, presentaron la formación de estructuras semejantes a cordones ováricos. Estos eran de forma muy irregular y semejantes a como se presentan en sus controles in vivo. En los reagregados de estas edades los cordones ováricos eran más evidentes a medida que avanzó la edad fetal que dió origen al reagregado. Esto era debido a la cantidad de tejido estromático que se encontraba entre los cordones. En los reagregados de ovarios de 16 dg a 2 dpp la formación de cordones ováricos no fué muy clara al observarse al microscopio de luz (Figuras 7 A-D).

A nivel de microscopía electrónica se observó en todos los casos zonas en las que se restituyeron estructuras epiteliales similares a los cordones sexuales del ovario intacto. Estos cordones ováricos restituyeron, al igual que los de testículos,

una lámina basal que separó el componente estromático del epitelial (Figura 8 A). También se observó la formación de láminas basales entre dos porciones epiteliales que no implicaron la interacción epitelio mesénquima en la formación de la lámina basal. De igual manera, se observaron zonas de segregación y formación de lámina basal incompletas (zonas de transición) (Figura 8 B). En reagregados de ovarios de 16 dg a 2 dpp se observaron gran cantidad de zonas de transición. Al igual que en las células epiteliales de los reagregados de testículos, las de reagregados de ovarios presentaban en la porción basal un citoesqueleto muy desarrollado; presencia de gran cantidad de microfilamentos en disposición paralela a la lámina basal. Entre las células epiteliales se observó la formación de uniones intercelulares tipo desmosoma. También se observó la formación de uniones intercelulares entre las células epiteliales y los ovocitos. (Figuras 10 A y B)

En reagregados de ovarios de 15 dg en adelante se observó que en algunas zonas se inicia el depósito de gran número de fibras de colágena sobre la lámina basal, sin embargo en ninguno de los casos se observó un depósito tal como para indicar la formación de una membrana basal. La mayor parte de las fibras de colágena producida por las células del estroma se depositó entre los espacios intercelulares (Figura 8 A). Al parecer en los reagregados de ovarios cultivados con suero la producción de fibras de colágena es más abundante que en aquellos cultivados sin este componente. De igual manera los reagregados de ovarios de 16 dg a 2 dpp cultivados sin suero bovino fetal presentaron una apariencia más laxa, probablemente como resultado de la restitución deficiente de la matriz extracelular (Figuras 7 C y

D).

6.2.2. Las células germinales.

En reagregados de ovarios de 12 dg cultivados con y sin suero las células germinales presentaron una gran actividad mitótica (Figura 9 A). Esto concuerda con el período de proliferación activa por el que pasan las ovogonias antes de su entrada a la profase de la primera división meiótica in vivo. En reagregados de ovarios de 13 dg y algunos de ovarios de 12 dg, las células germinales presentaron los primeros indicios de inicio de la meiosis embrionaria, representado por un grado de condensación de la cromatina similar al preleptoteno o leptoteno.

En reagregados de ovarios de 14 dg se observó que gran cantidad de las células germinales habían iniciado la meiosis. A microscopía electrónica, se hacían evidentes los complejos sinaptinémicos, estructuras características de células que han iniciado la meiosis (Figura 9 B).

El estado de avance de la meiosis en ovocitos de reagregados de ovarios de 15 dg a 2 dpp fué como sigue: En reagregados de ovarios de 15 dg casi la totalidad de los ovocitos se encontraban en paquiteno en el momento de la fijación. En los de 16 dg se encontraron en paquiteno y diploteno, esta última evidenciada por el grado de descondensación de la cromatina. En los de 17 dg los ovocitos se encontraron en diploteno y dictiado. Finalmente en los reagregados de ovarios de 1 y 2 dpp la gran mayoría de los ovocitos se encontraron en dictiado, etapa donde se detiene la meiosis en los roedores.

A pesar de que los reagregados probaron estar sanos como lo demostró la alta actividad mitótica de las células, algunas de

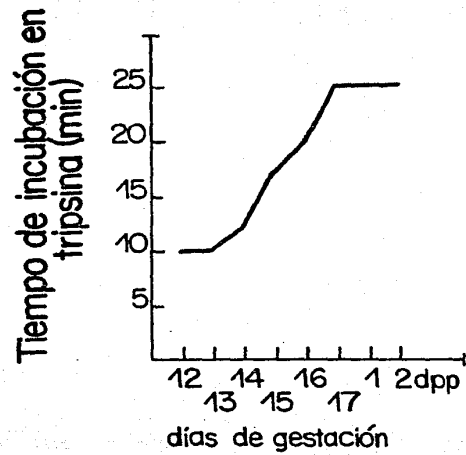
éstas, tanto células somáticas como germinales, se encontraron muertas dentro del cultivo (Figura 9 B). Esta muerte celular fué más evidente en reagregados de ovarios de 14 a 16 dg.

6.2.3. Etapas de la foliculogénesis.

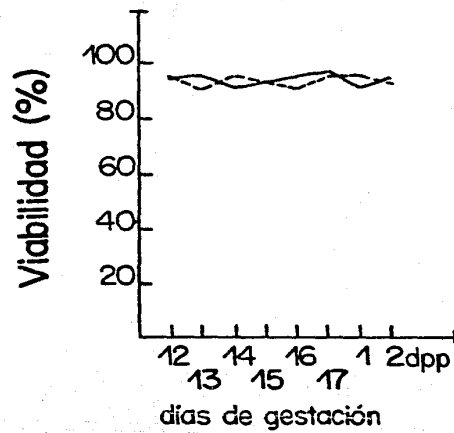
En reagregados de ovarios cultivados con suero y sin este componente, se observaron varios estados de la foliculogénesis. Se observó una primera etapa donde los ovocitos mantenían contacto entre sí (Figura 10 A). Esta fase de la foliculogénesis se observó en reagregados de ovarios de 12 a 16 dg.

Otra fase de la foliculogénesis detectada consiste en el evento que lleva hacia la individualización de los ovocitos, en éste se observa como algunos procesos citoplasmáticos de las células epiteliales se abren camino entre los ovocitos íntimamente unidos. Esta fase se encontró en reagregados de ovarios de 14 dg a 1 dpp. Algunas de las prolongaciones citoplasmáticas provenientes de dos diferentes células prefoliculares, durante esta fase de separación, presentaron uniones intercelulares tipo desmosoma (Figura 10 C).

En reagregados de ovarios de 17 dg a 2 dpp se observaron estructuras semejantes a folículos primordiales ya formados (Figura 10 B). Sin embargo, la lámina basal que rodeaba a estas estructuras era incompleta en algunos puntos e incluso a microscopía electrónica se observó que algunas regiones de los ovocitos se encontraban en contacto con células estromáticas y fibras de colágena. En ocasiones se observó como las células del estroma se abrían camino entre las células epiteliales. Este evento recuerda la fase de fragmentación de cordones ováricos que da origen a los folículos primordiales (Figura 10 B).

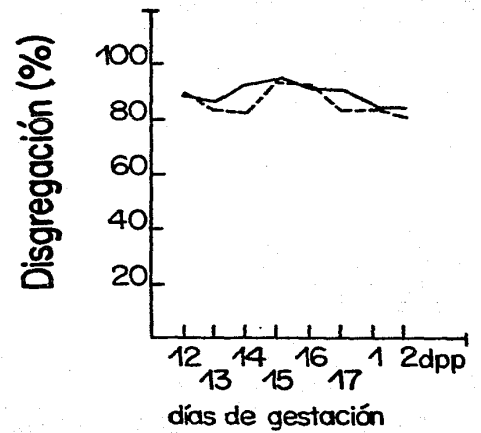


GRAFICA 1



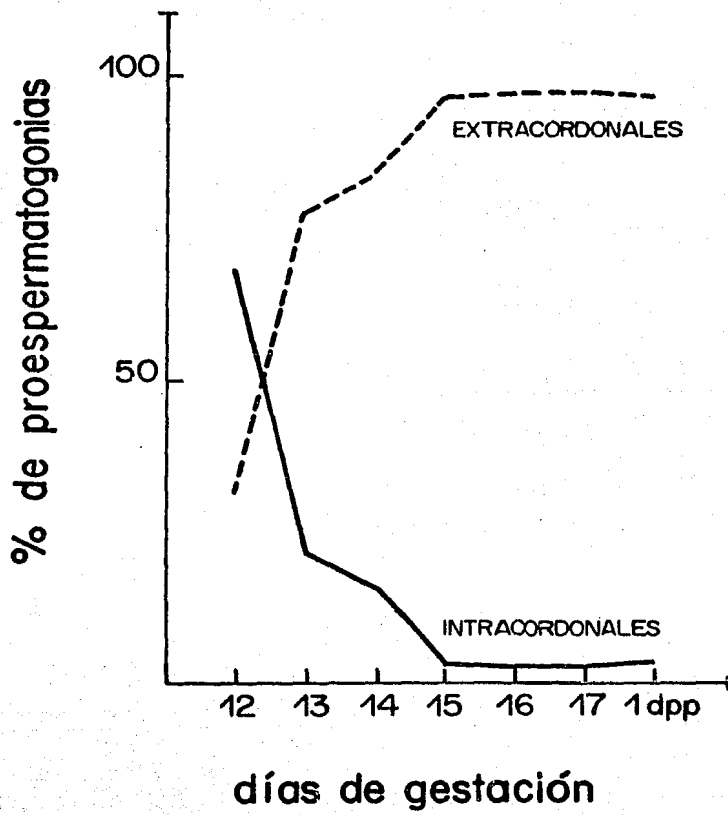
E D A D

GRAFICA 2



GRAFICA 3

— Ambos sexos
 — Disgregado de ovarios
 - - Disg. de testículos
 dpp Días posparto



Gráfica 4

Lámina 1

Fig.1A Micrografía de luz de la suspensión celular obtenida de la disgregación de testículos de 12 dg (312x).

Fig.1B Micrografía electrónica de dos células germinales que se mantuvieron unidas por complejos de unión (+) después de la disgregación enzimática-mecánica (7800x).

Fig.1C Micrografía electrónica de células disgregadas obtenidas de testículos de 12 dg. Obsérvese la gran cantidad de procesos citoplásmicos que producen las células disgregadas (7,800x).

Fig.1D Micrografía electrónica de la suspensión celular obtenida de la disgregación de testículos de 2 dpp. Obsérvese la gran longitud de las prolongaciones citoplásmicas y la gran cantidad de vacuolas que presentan las células. Se distingue claramente una célula de Leydig (L) por la cantidad de inclusiones lipídicas en su citoplasma (7,800x).

Fig.1E Micrografía electrónica de dos células germinales que conservaron un puente citoplásmico (+) después de la disgregación enzimática-mecánica (7,800x).

Lamina 1

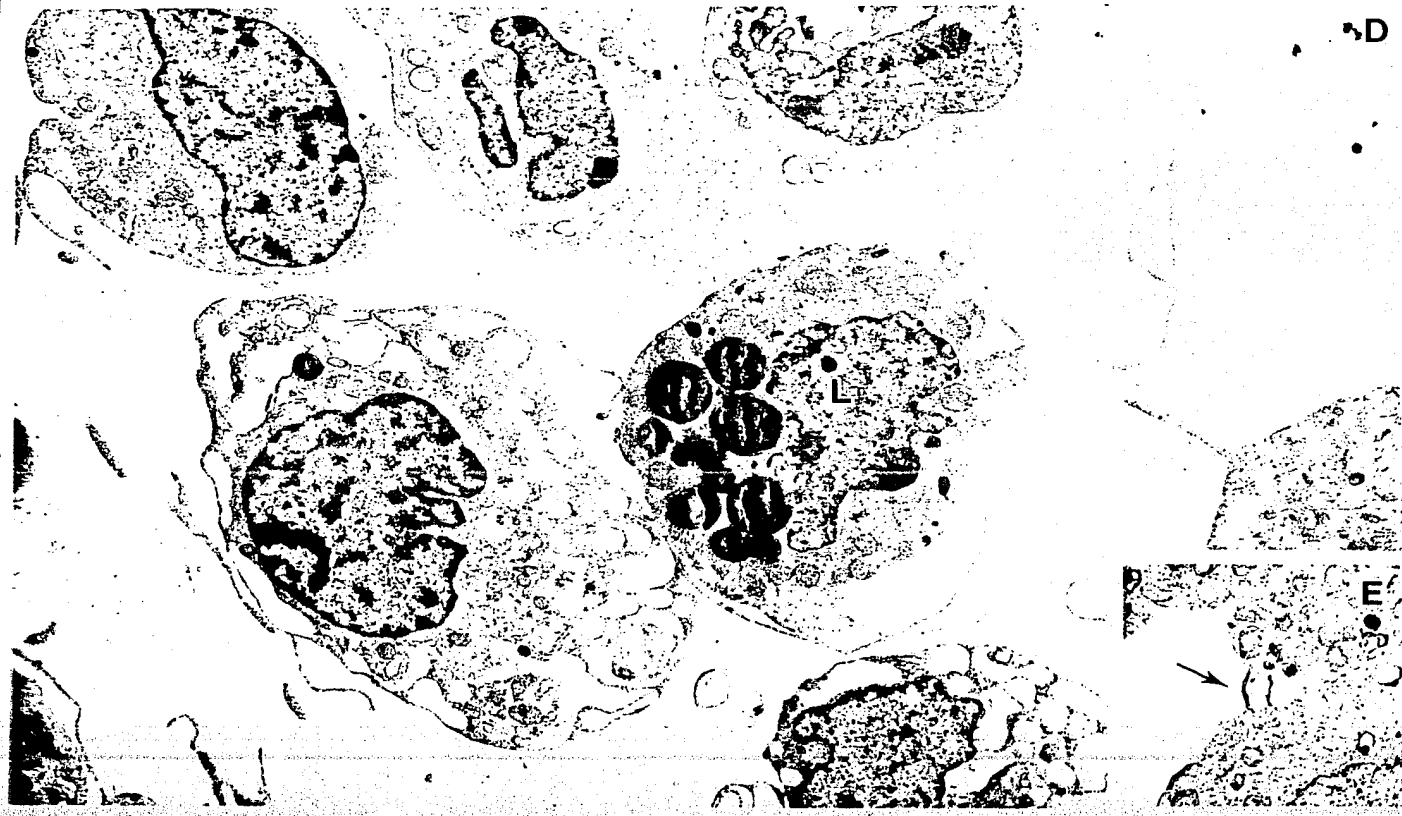
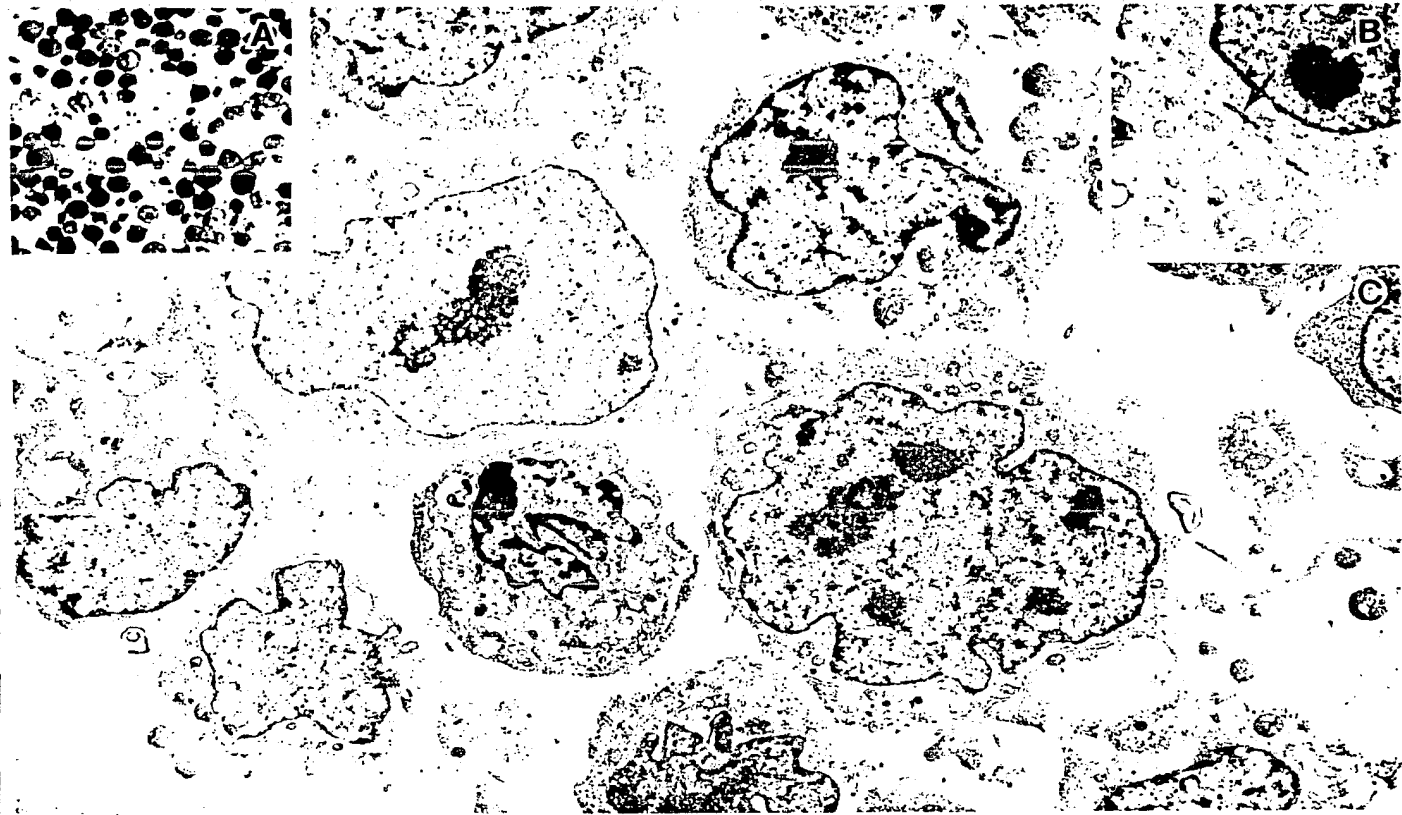
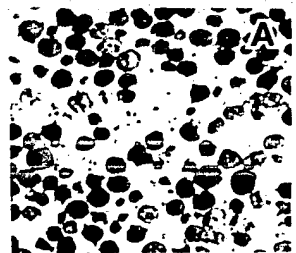


Lámina 2

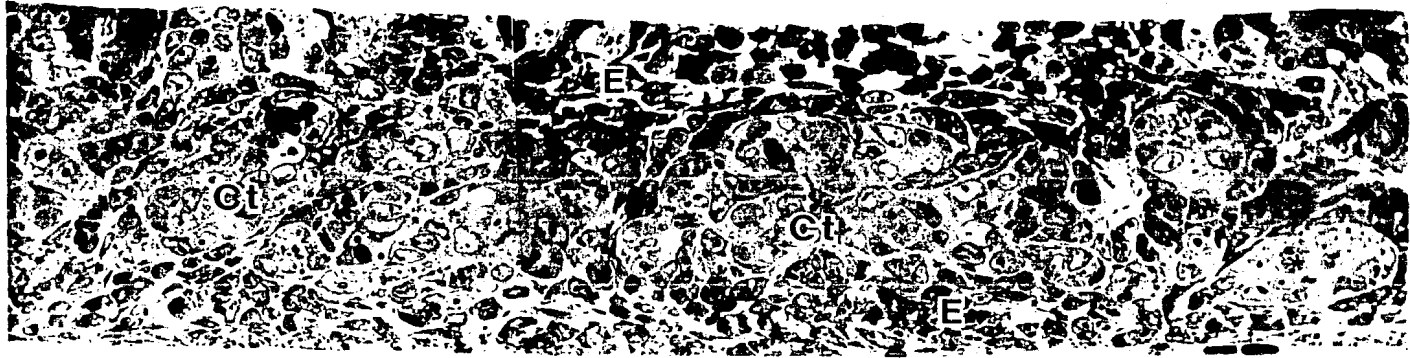
Fig.2A Micrografía de luz de un reagregado de testículos de 12 dg cultivado con MSA. El reagregado está constituido por cordones testiculares (Ct) y se encuentran incluidos en un tejido estromático (E). Se muestran algunas proespermatogonias dentro de los cordones testiculares (*) (320x).

Fig.2B Micrografía de luz de un reagregado de testículos de 16 dg cultivado con MA. El reagregado está constituido por cordones testiculares (Ct) y estroma (E). Nótese que no hay proespermatogonias dentro de los cordones, éstas se encuentran incluidas en el estroma (*). Algunas células del estroma se aplanan en sentido paralelo a la lámina basal de los cordones testiculares, éstas se identificaron como células tipo mioide (→) (128x).

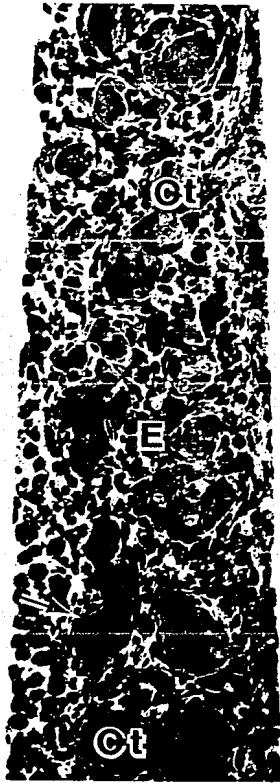
Fig.2C Micrografía de luz de un reagregado de testículos de 1 dpp cultivado con MA. Es un reagregado muy similar al de la figura anterior, constituido por cordones testiculares (Ct) y estroma (E). Las proespermatogonias se encuentran incluidas en el estroma o en el borde del reagregado (*) (128x).

Lámina 2

A



B



C



Lámina 3

Fig.3A Micrografía electrónica que muestra uniones intercelulares tipo desmosoma (→) establecidas entre células de Sertoli (30,000x).

Fig.3B Micrografía electrónica de un reagregado de células de testículos de 15 dg cultivado con MSA. Las células de Sertoli (S) se encuentran separadas de las células del estroma (E) por medio de una lámina basal continua (→). Nótese la gran cantidad de microtúbulos y microfilamentos en el citoplasma de la célula de Sertoli, adyacente a la lámina basal (*) (30,000x).

Fig.3C Micrografía electrónica de un reagregado de células de testículos de 15 dg cultivado con MA. Se observa como se establece contacto e interdigitaciones entre las células de Sertoli (S) y las del estroma (E). En los puntos donde ocurre esta interacción, la lámina basal es discontinua, las puntas de flecha (>) indican los sitios donde la lámina basal se interrumpe (30,000x)

Lamina 3

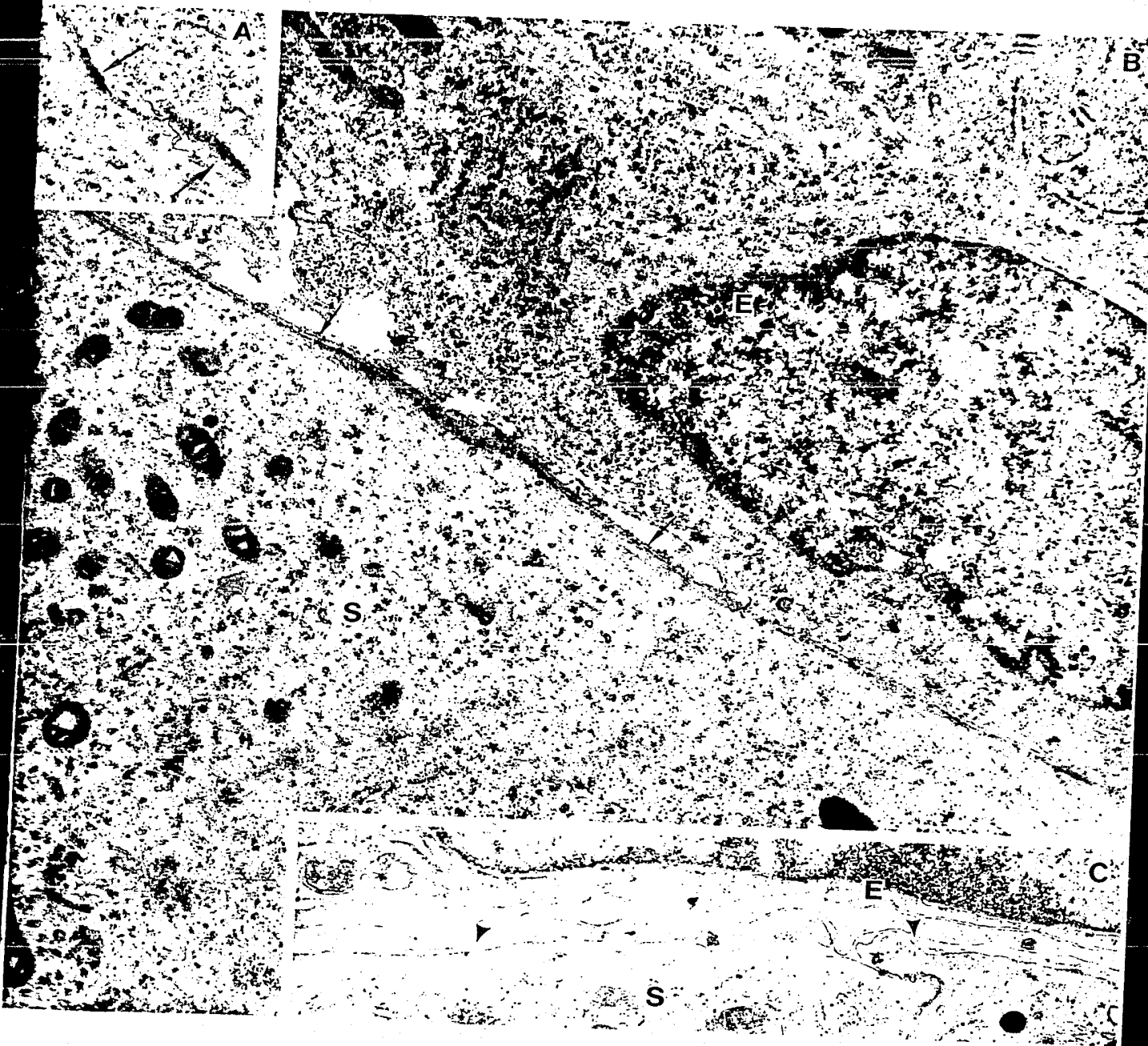


Lámina 4

Fig.4A Micrografía electrónica de un reagregado de testículos de l dpp cultivado con MA. Los cordones testiculares (Ct) son claramente distinguibles del estroma (E). Nótese que las células del estroma tienen un retículo endoplásmico muy desarrollado. En la vecindad de estas células se observa gran cantidad de fibras de colágena (c). Alrededor de un cordón testicular se observa una célula tipo mioide (*) (30,000x).

Fig.4B Micrografía electrónica que muestra depósitos de material fibrilar de naturaleza desconocida, localizados entre los espacios extracelulares de las células del estroma (30,000x).

Fig.4C Micrografía electrónica de un reagregado de células de testículos de l dpp cultivado con MSA. Nótese la gran cantidad de fibras de colágena que se depositan sobre la lámina basal (30,000x).

Lámina 4

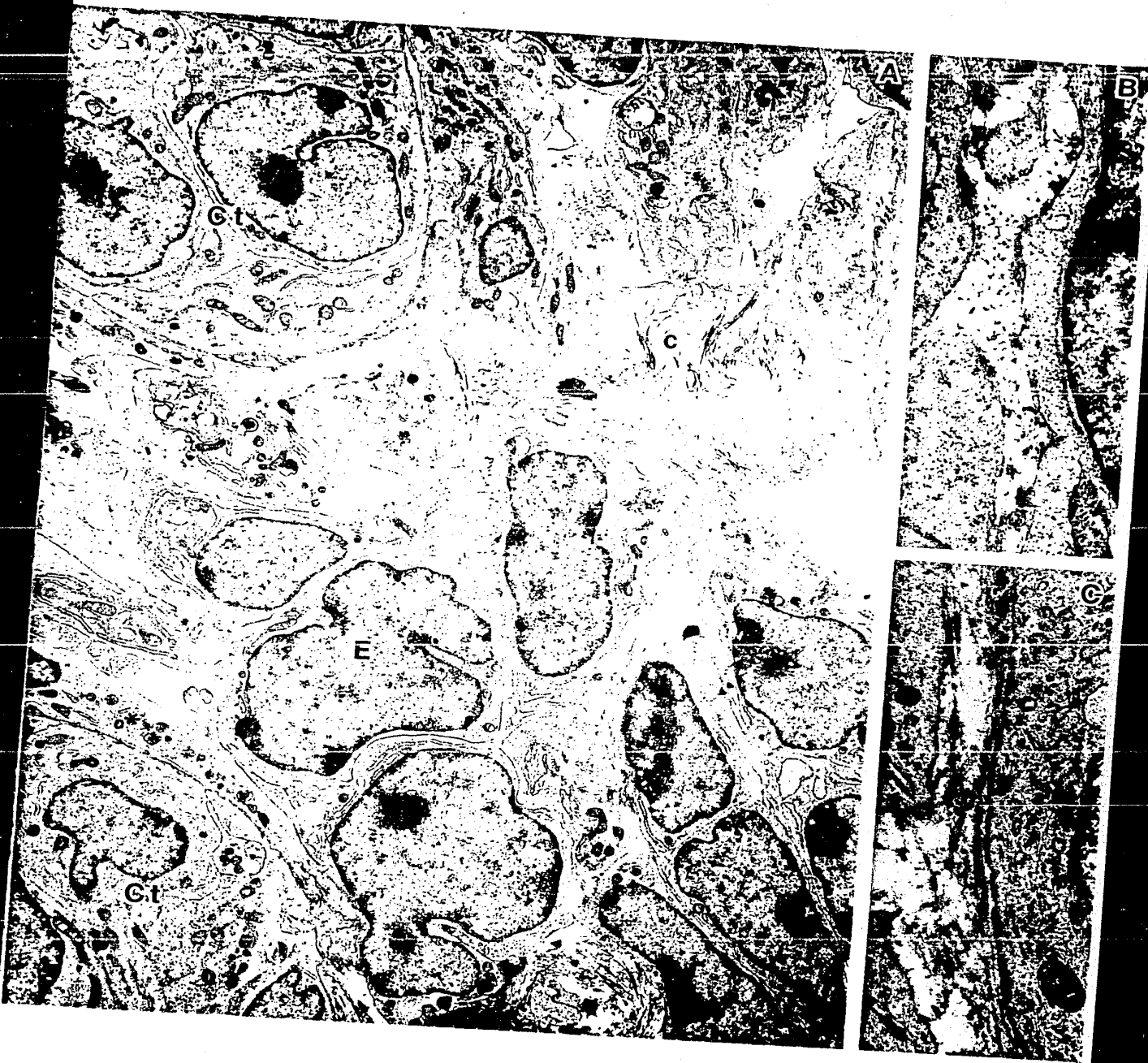


Lámina 5

Fig.5A Micrografía electrónica de un reagregado de células de testículos de 15 dg cultivado con MA. Se muestran algunas proespermatogonias (Pe) que se encuentran incluidas en el compartimiento estromático (E). Algunas células tipo mioides (*) rodean a un cordón testicular (Ct) (7,800x).

Fig.5B Micrografía de luz del estroma de un reagregado de células de testículos de 17 dg cultivado con MSA. Gran número de proespermatogonias (las células redondeadas de citoplasma claro y núcleo esférico) se encuentran incluidas en este compartimiento. Se muestra también una célula de Leydig indicada por una flecha (→) (312x).

Lamina 5

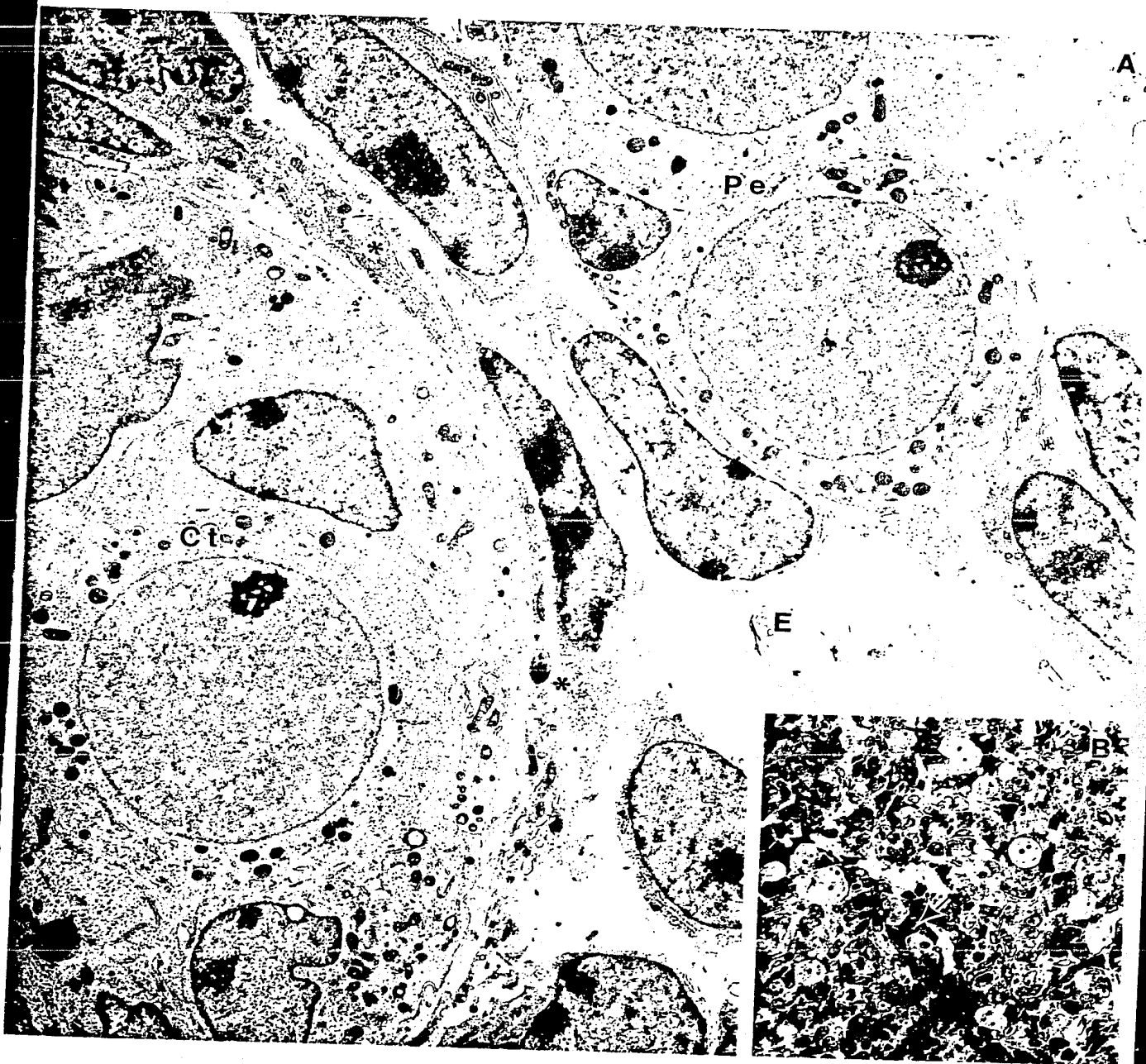


Lámina 6

Fig.6A Micrografía electrónica que muestra la interacción directa entre una célula de Leydig (L) y una proespermatogonia (Pe) (7,800x).

Fig.6B Micrografía electrónica de una célula de Leydig. Se muestra el gran número de mitocondrias con crestas tubulares (mi), así como inclusiones de lípidos (li) (15,000x).

Lamina 6

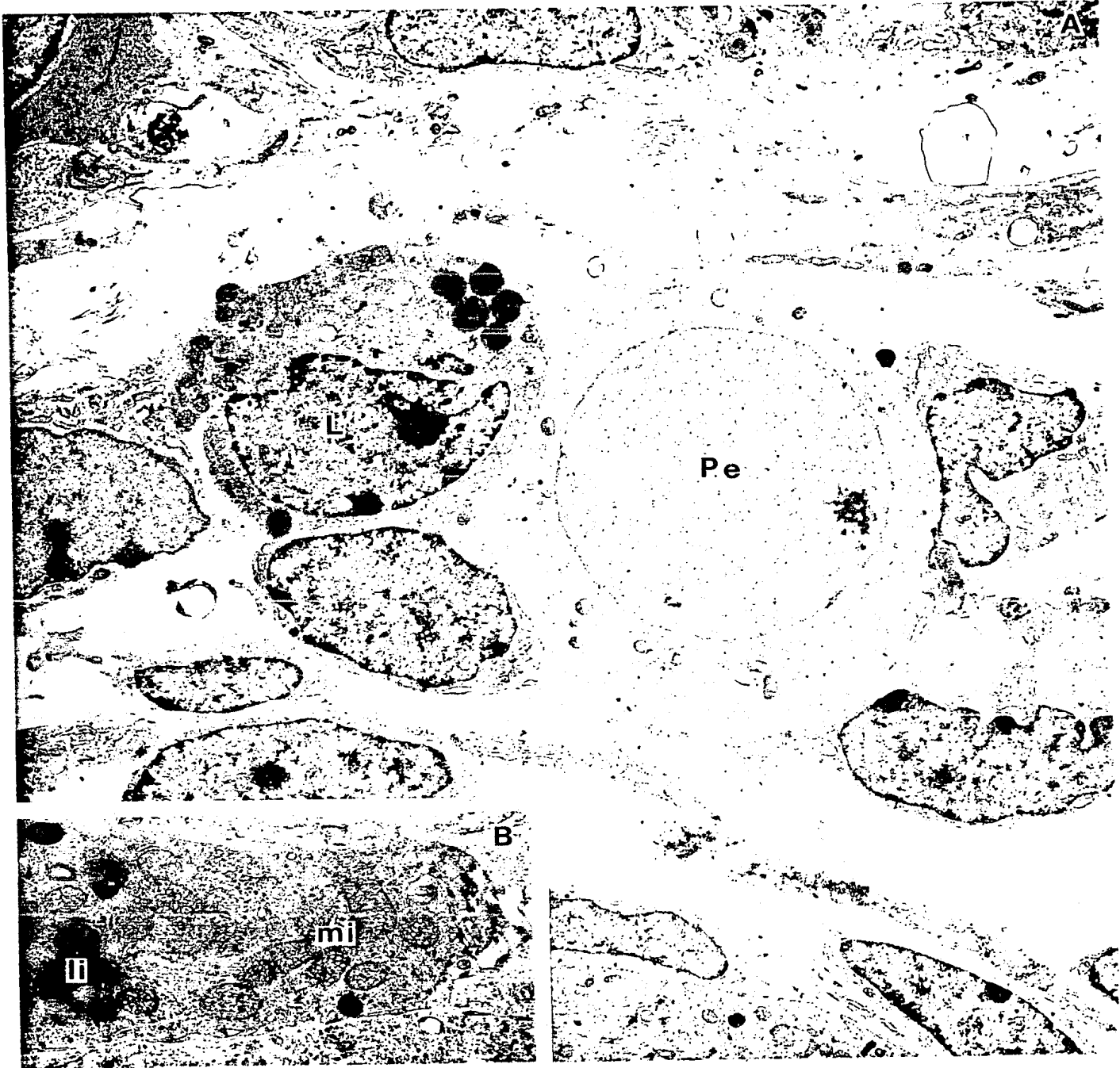


Lámina 7

Fig.7A Micrografía de luz de un reagregado de células de ovarios de 12 dg cultivado con MSA. Se muestran cordones ováricos (Co) y estroma (E). Los cordones ováricos se encuentran formados por células epiteliales y ovogonias (320x).

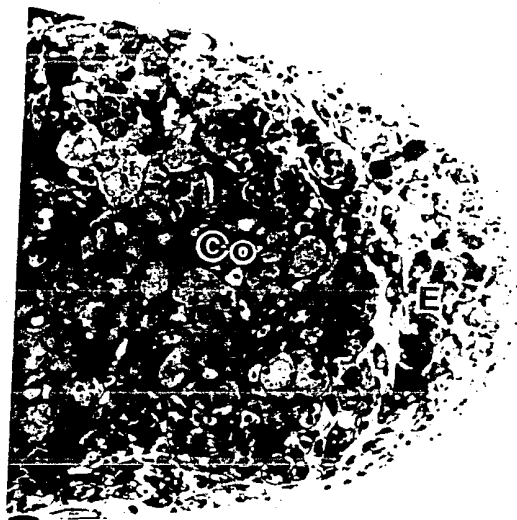
Fig.7B Micrografía de luz de un reagregado de células de ovarios de 14 dg cultivado con MA. Los cordones ováricos (Co) se hacen un poco más evidentes por la mayor cantidad de tejido estromático (E) que se encuentra entre ellos (320x).

Fig.7C Micrografía de luz de un reagregado de células de ovarios de 1 dpp cultivado con MSA. No se observa una formación clara de cordones ováricos. Las células grandes, claras y redondeadas son ovocitos en diferentes estados de maduración (200x).

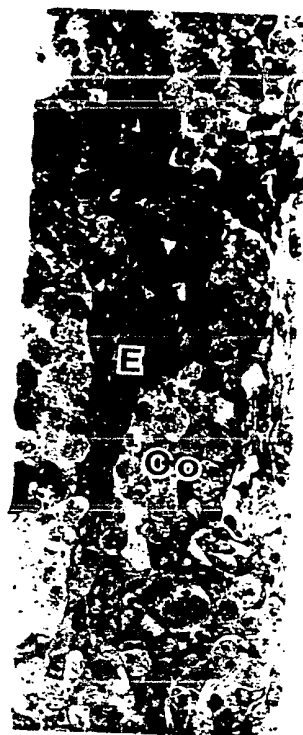
Fig.7D Micrografía de luz de un reagregado de células de ovarios de 1 dpp cultivado con MA. Nótese que es un reagregado aplanado y de constitución laxa. No se observa una clara formación de cordones ováricos. También se observan varios ovocitos en diferentes estados de maduración (200x).

Lamina 7

A



B



C



D



Lámina 8

Fig.8A Micrografía electrónica de un reagregado de células de ovarios de 16 dg cultivado con MSA. Se observa un cordón ovárico (Co) separado del estroma (E) por una lámina basal continua (+). En el espacio extracelular del estroma se observa gran cantidad de fibras de colágena (c) (7,800x).

Fig.8B Micrografía electrónica de una zona de transición en la que se observan numerosas interdigitaciones (+) entre las células epiteliales (s) y las del estroma (E), éstas interrumpen la lámina basal (30,000x).

Lámina 9

Fig.9A Micrografía electrónica de un reagregado de células de ovarios de 12 dg cultivado con MSA. Se muestran algunas ovogonias (Og) en mitosis (7,800x).

Fig.9B Micrografía electrónica de un reagregado de células de ovarios de 15 dg cultivado con MSA. Ovocitos en meiosis: se observan en un ovocito (Ov) tres complejos sinapteinémicos (cs) característicos. Se muestra también restos de una célula muerta en el reagregado (*) (7,800x).

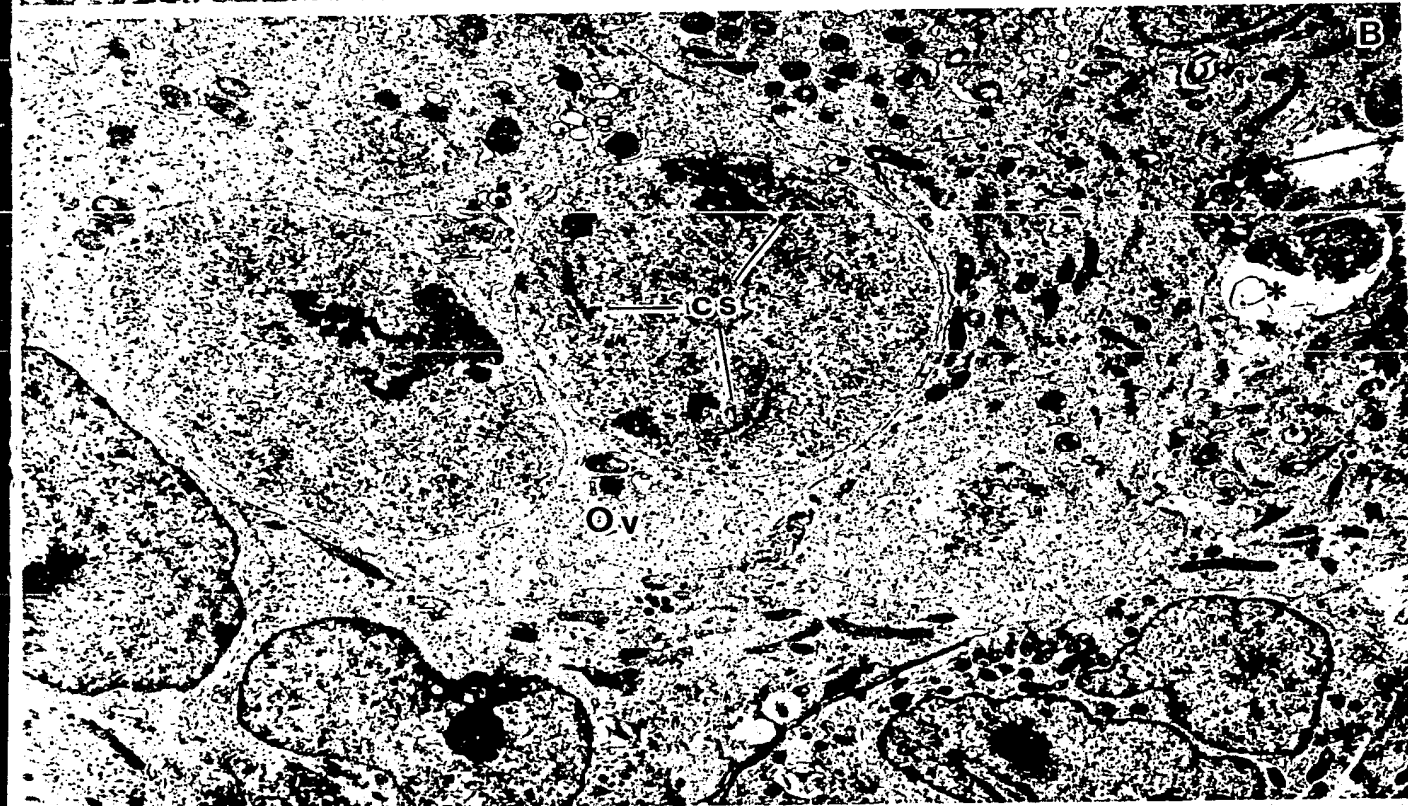
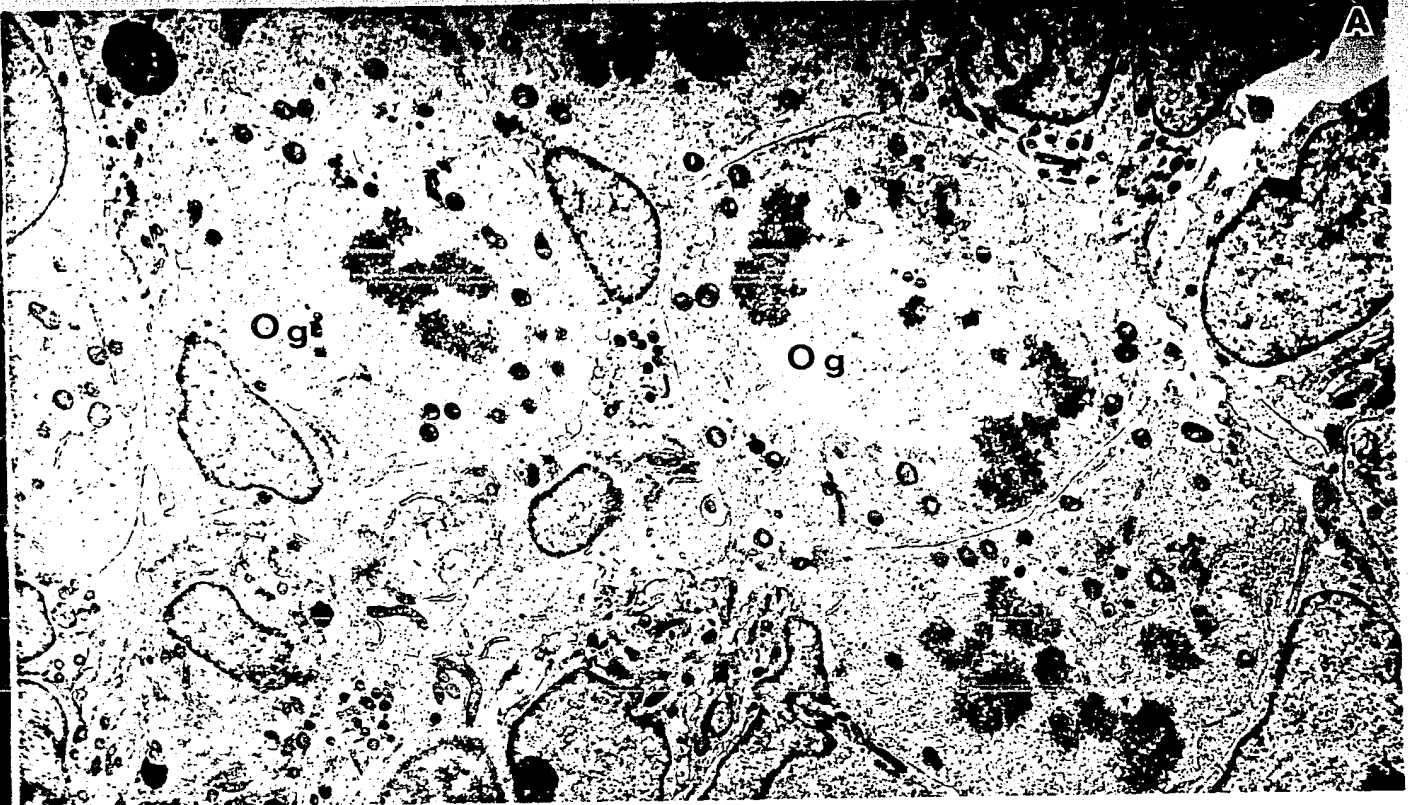


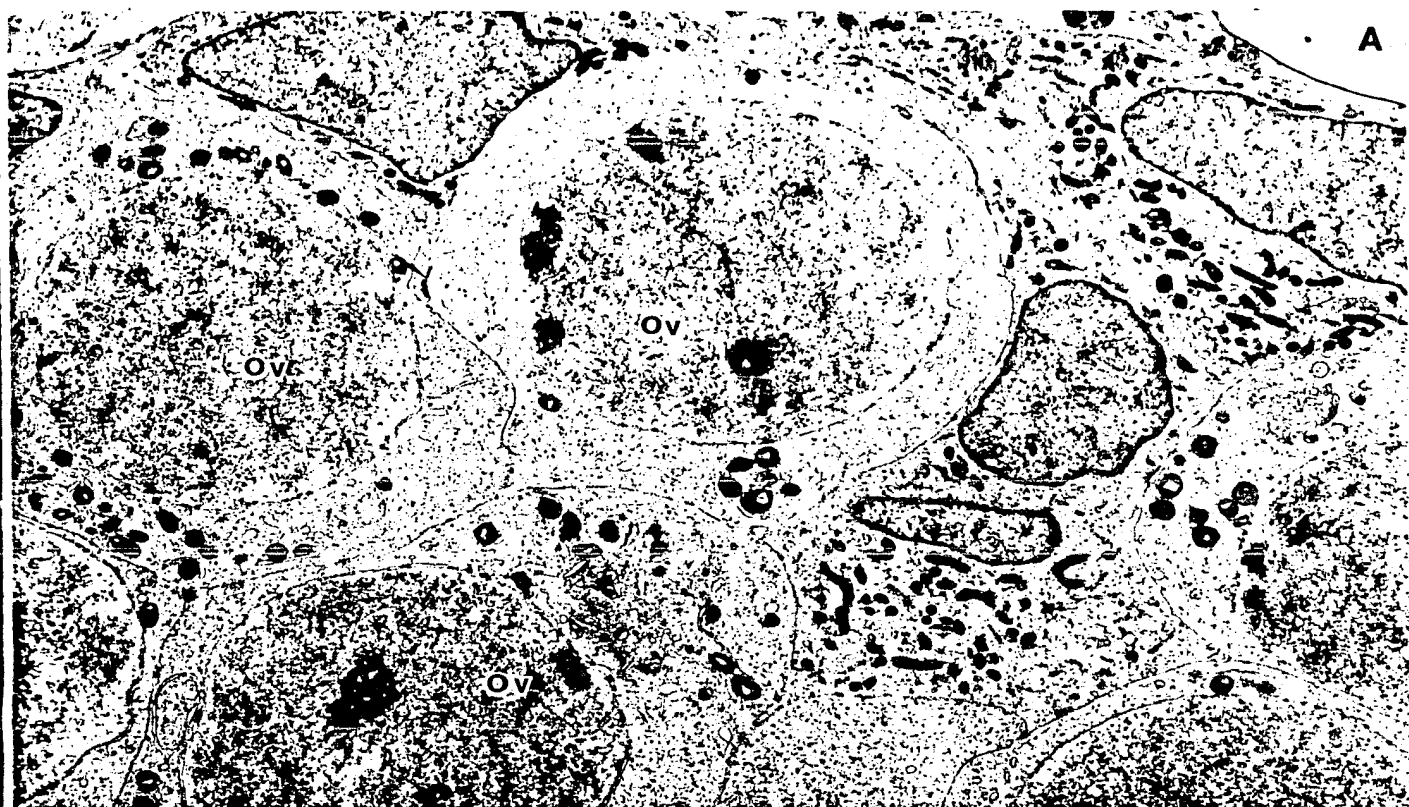
Lámina 10

Fig.10A Micrografía electrónica de un reagregado de células de ovarios de 14 dg cultivado con MA. Nótese como varios ovocitos (Ov) se encuentran íntimamente unidos, membrana con membrana. También se muestra una unión intercelular establecida entre una célula epitelial y un ovocito (→) (7,800x).

Fig.10B Micrografía electrónica de un reagregado de células de ovarios de 1 dpp cultivado con MSA. Se observa una estructura similar a un folículo primordial (F), formado por un ovocito que está rodeado por una ración de células epiteliales. Se observa en la parte superior de esta estructura una célula del estroma que parece abrirse camino entre dos células epiteliales (→) (3,900x).

Fig.10C Micrografía electrónica de un reagregado de ovarios de 1 dpp cultivado con MSA. Se observa como dos ovocitos (Ov) están separados por prolongaciones citoplásmicas de células prefoliculares (Pf). Se muestra el establecimiento de uniones intercelulares entre dichas prolongaciones (→)(30,000x).

Lamina 10



V. DISCUSION

1. Métodos de disgregación-reagregación.

En la literatura se han citado varios métodos de reagregación de suspensiones celulares.

La mayoría de los trabajos realizados con este enfoque experimental utilizan el sistema de agregación por rotación desarrollado por Moscona (1961) o modificaciones de éste (Zenzes et al, 1978a; Zenzes et al, 1978b). En esencia, consiste en colocar en matraces de cultivo la suspensión celular deseada; se ponen en un agitador rotatorio a una velocidad controlada y en condiciones de temperatura, humedad y atmósfera controlada. El tiempo de cultivo en estas condiciones puede ser de 12 a 24 hr. Con este sistema de rotación se controla el número de colisiones entre las células de modo que sea óptimo para que se establezcan contactos entre las células, lo cual depende de sus afinidades y capacidades de adhesión.

Otro método utilizado se basa en la formación de colonias o nódulos de células en cultivos primarios. Davis, en 1978, observó que, en cultivos en monocapa de células disociadas de testículos de rata fetal. después de 4 días, se forman estructuras que recuerdan la histología del tejido no disociado.

Un último método se basa en el cultivo en forma organotípica, de botones celulares de tejido disociado (O y Baker, 1978; Regenass et al, 1982). Los botones celulares obtenidos por centrifugación, se colocan sobre bloques de agar o rejillas metálicas cubiertas de agar previamente equilibrados con el medio de cultivo, por lapsos de 1 a 5 días. La ventaja que presenta este método es que se puede trabajar con cantidades pequeñas de tejido y las distancias entre las células disociadas

es menor, lo que aumenta la posibilidad de encuentro y reconocimineto entre éstas.

El sistema de reagregación tipo Moscona se ha utilizado frecuentemente en experimentos de reagregación de gónadas de ratas y ratones recién nacidos. Sin embargo, la cantidad de tejido necesario para cada experimento es muy elevada en comparación con la necesaria para la formación de reagregados por cultivo en forma organotípica (Grund et al, 1986; Zenzes y Engel, 1981, Zenzes, 1981; Urban et al, 1981; Zenzes et al, 1980; Muller et al, 1982).

El sistema de reagregación empleado en el presente trabajo es una modificación del método descrito para reagregados por cultivo en forma organotípica. Este fue el método de elección debido a las cantidades de tejido que se obtiene de gónadas embrionarias y fetales, así como para reducir el número de gónadas empleadas en etapas postnatales. La principal modificación realizada fue el cultivo de los botones celulares, sobre filtros de porosidad determinada que flotan sobre medio de cultivo. Algunos estudios realizados en nuestro laboratorio (Lab. de Diferenciación Sexual, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) demostraron que las gónadas fetales de rata y ratón conservan la capacidad de continuar la morfogénesis en estas condiciones de cultivo por lo que se consideró como referencia para el cultivo de botones celulares.

Los cultivos se mantuvieron durante 24 hr, ya que es este el tiempo promedio en el que se reporta ocurre la morfogénesis de las suspensiones celulares de gónadas de ratas recién nacidas (Grund et al, 1986; Zenzes y Engel, 1981, Zenzes, 1981; Urban et al, 1981; Zenzes et al, 1980; Muller et al, 1982). Los

resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que después de este tiempo de cultivo en los reagregados obtenidos se llevaron a cabo eventos morfogénéticos que originaron la reconstrucción de patrones histotípicos similares a los originales.

El papel del suero en el medio de cultivo ha sido considerado por algunos autores. Moscona y Moscona (1966) realizaron un estudio de agregación por rotación de células embrionarias de retina de pollo en medio de cultivo suplementado con y sin suero de caballo para ver los efectos de éste en la agregación de suspensiones celulares. Sus resultados muestran que, en ambos casos, la organización histotípica de los reagregados es similar. Grund et al (1986) reportaron que la presencia de suero de bovino fetal en el medio de cultivo era indispensable para la reagregación de suspensiones celulares de testículos de rata recién nacida.

En el presente trabajo se observó que la histogénesis de los reagregados de ambos sexos no difiere básicamente en cultivos suplementados con y sin suero bovino fetal. Sin embargo, se detectaron algunas diferencias: a) Los reagregados cultivados sin suero son muy aplanados a diferencia de los que fueron cultivados con él. b) En varios reagregados de ovarios cultivados sin suero se observó que la cantidad de fibras de colágena depositadas en el espacio extracelular del estroma era menor; además de que la constitución general de estos reagregados era muy laxa. Probablemente, esta aparente deficiencia en la restitución de los componentes de la matriz extracelular en cultivos sin suero esté relacionada con la falta de volumen que presentan todos los reagregados cultivados

en éstas condiciones. Magre et al (1980) postularon que el suero bovino fetal puede contener algunos factores que inhiben la síntesis de los componentes que constituyen la lámina basal. Sin embargo, en este caso parece necesario realizar más estudios con la finalidad de establecer claramente el efecto del suero bovino fetal sobre la síntesis de colágena y su posible mecanismo de acción.

El método enzimático más empleado en la disociación de gónadas fetales o neonatales es la incubación en una solución de tripsina. La concentración y tiempo de incubación en presencia de esta enzima son muy variados y depende las características y edad del tejido. En algunos estudios la disociación de gónadas se realiza mediante una combinación entre la concentración de la enzima y el tiempo de incubación en la misma (Zenses, 1981; Grund et al, 1986). En el presente estudio se utilizó una concentración fija de la enzima (0.25 %) y se varió el tiempo de incubación de las gónadas hasta obtener suspensiones de células disociadas.

El aumento progresivo del tiempo requerido para incubación enzimática parece estar relacionado con cambios en la cantidad o tipo de constituyentes de la matriz extracelular. Se sabe que durante el desarrollo embrionario ocurre este tipo de cambios sobre dicha matriz. Se ha observado en algunos tejidos embrionarios de etapas tardías que la cantidad de fibras de colágena aumenta conforme avanza el desarrollo y, en virtud de que la colágena no es degradada eficientemente por la tripsina, es más difícil lograr una eficiente disociación del tejido conforme avanza el desarrollo (Moscona et al, 1965).

Los estudios detallados sobre los cambios en los

constituyentes de la matriz extracelular realizados en rata se pueden correlacionar, de buena manera, con los eventos que ocurren durante el desarrollo gonadal del ratón. Paranko, en 1986, realizó un estudio sistemático de los constituyentes de la matriz extracelular durante la morfogénesis gonadal de la rata por medio de la técnica de inmunocitoquímica. En éstos, observó la aparición e incremento en las cantidades de colágenas tipo I y III en el estroma durante el desarrollo de ambas gónadas.

Al extrapolar estos resultados a lo que ocurre en la morfogénesis gonadal del ratón se puede comprender el porque se requirió mayor tiempo de incubación de tripsina conforme avanzó el desarrollo embrionario, fetal y neonatal de las gónadas de ambos sexos; así mismo, ésta puede ser la explicación al hecho de haber encontrado, en algunos disgregados, gran cantidad de fibras de colágena.

Otro factor de importancia que puede influir en el tiempo requerido para la disgregación por la acción enzimática es la estructura propia de los órganos. El ovario es un órgano muy compacto y la asociación entre las células que lo integran parece ser muy íntima. Existe una estrecha relación de las células epiteliales entre sí y con los ovocitos durante la foliculogénesis temprana. Durante la fase de separación de los ovocitos por la células epiteliales se forma gran número de uniones intercelulares entre las prolongaciones citoplasmáticas de las células epiteliales que se insinúan entre los ovocitos íntimamente unidos (Chimal, 1987). De igual manera, se forman gran cantidad de uniones comunicantes durante esta fase de la foliculogénesis y aumentan conforme avanza el desarrollo. (Mitchel y Burghardt, 1986).

Probablemente, un tratamiento enzimático con una combinación de enzimas sea el más indicado en la disociación del tejido ovarico.

2. Morfogénesis de los reagregados.

El primer evento que ocurre dirigido hacia la reagregación del tejido gonadal está representado por la gran cantidad de prolongaciones citoplásmicas producidas por las células disociadas. Estas prolongaciones hacen las veces de "sensores" y sitios de anclaje entre las células disociadas. Varios estudios de reagregación morfogénética realizados en otros tejidos embrionarios han demostrado que la unión entre las células disociadas es, inicialmente de forma azarosa, mediada por las prolongaciones citoplasmáticas producidas por éstas (Ben-Shaul y Moscona, 1975a y b). Este evento lleva a la formación de agregados celulares de células mezcladas. El siguiente paso en la reagregación morfogénética corresponde al reconocimiento y segregación de tipos celulares afines que dan origen al reensamblaje y reconstitución de estructuras. Estos eventos se realizan de manera similar a como ocurre durante la morfogénesis normal de los órganos y tejidos.

En los reagregados obtenidos en este estudio, los eventos de reconocimiento segregación y reensamblaje de estructuras llevó a la segregación del tejido epitelial y del estromático, a la reconstitución de epitelios y al subsecuente desarrollo de láminas basales. Los patrones de agregación celular (sólo de las células somáticas en el caso del testículo) tienen características similares al patrón histotípico de las gónadas normales.

La progresión de los eventos estructurales registrados en

los cultivos se pueden analogar, en gran medida, con lo que ocurre durante la morfogénesis normal de las gónadas. Esto implica la formación de: a) los llamados cordones sexuales que forman el compartimiento epitelial y b) un compartimiento estromático. Ambos compartimientos tisulares están separados por una lámina basal. Este proceso de segregación epitelio-mesénquima y la formación de láminas basales tiene lugar en el primordio gonadal desde la etapa indiferenciada en varios mamíferos (Merchant, 1975 en rata ; Pelliniemi, 1976 en cerdo).

La presencia de zonas de segregación epitelio-mesénquima incompletas en los reagregados sugiere que las 24 hr de cultivo utilizadas en el presente estudio no son suficientes para que dicho proceso se lleve a cabo completamente. Se han descrito, en estudios realizados durante la morfogénesis temprana de la gónada de la rata, zonas en las que la lámina basal es incompleta, es decir, hay contacto directo entre células epiteliales y mesenquimáticas. Se ha interpretado, este hecho, como zonas de transición que apoyan la hipótesis de que los cordones sexuales se forman a partir de un blastema gonadal (Merchant, 1975).

Magre y Jost (1983) sugirieron que la presencia de un citoesqueleto, desarrollado en la región basal de las células epiteliales, tiene la función de dar un contorno liso y definido a la células durante la morfogéneis temprana del testículo de la rata. En los reagregados de testículos y ovarios se puede observar, de igual manera, como gran cantidad de microfilamentos se encuentran en la región basal de las células epiteliales.

Merchant en 1975 mostró que las células germinales no son

necesarias para la morfogénesis testicular temprana de la rata. En dicho trabajo observó que el hecho de matar selectivamente a las células germinales con busulfán, en una etapa del desarrollo en la que aún no se diferencia la gónada, no impide la diferenciación de los cordones testiculares y del compartimiento estromático. De igual manera, en un estudio realizado en ratones mutantes estériles, este mismo autor observó que la diferenciación testicular ocurre en ausencia de las células germinales (Merchant y Centeno, 1981). Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran, en cierta medida, las observaciones realizadas por estos autores. En los reagregados de testículos de 15 dg a 2 dpp, donde muy pocas o casi ninguna de las células germinales queda en posiciones intracordonaes, la restitución de los cordones testiculares es similar a como ocurre in vivo en gónadas privadas de células germinales.

Otro criterio importante de réorganización es el de la presencia de uniones intercelulares entre las células epiteliales.

Durante el desarrollo normal del testículo, se han descrito tres tipos de contactos entre las células (Magre y Jost, 1983). Uno es el que se establece entre las células de Sertoli, que forman uniones adherentes tipo desmosoma y uniones estrechas incompletas. El segundo es el que se establece entre las células epiteliales y las del estroma antes del término del depósito de la lámina basal. Por último, el que se establece entre células de Sertoli y las células germinales. De los tres tipos de contacto mencionados, los dos primeros se registraron en los reagregados de suspensiones celulares de testículos. En los reagregados, la

presencia de uniones adherentes entre las células de Sertoli indica la reconstitución de un tejido epitelial estabilizado.

En reagregados de ovarios de edades entre 12 dg y 2 dpp se observó que entre las células epiteliales existían uniones tipo desmosoma. Es posible que algunas de las uniones encontradas entre las células epiteliales estuvieran en el botón celular antes del cultivo, como lo sugiere la disgregación incompleta de algunas de estas células, de manera, que en el presente trabajo no se puede garantizar un 100% de separación de la unidades celulares del ovario.

No se observaron uniones comunicantes entre células epiteliales y entre éstas y los ovocitos, probablemente porque el tiempo requerido para la formación de este tipo de uniones intercelulares requiera de un tiempo mayor a 24 hr.

El patrón de agregación de los reagregados de testículos de las edades trabajadas asemeja al de testículos normales de etapas tempranas del desarrollo. Sin embargo, aparecen (según la edad de gestación del reagregado) características semejantes a las encontradas en testículos de desarrollo más avanzado: la presencia de células similares a las mioides y de células de Leydig, y la entrada a reposo mitótico por parte de las proespermatogonias. Las observaciones anteriores concuerdan con las realizadas por Grund et al (1986). Estos autores encontraron que el patrón de agregación de suspensiones celulares de testículos de ratas recién nacidas se asemeja a gónadas en desarrollo.

En cuanto a los patrones de agregación encontrados en reagregados de células de ovario, parece que son más parecidos a

como ocurre en el desarrollo normal del ovario, esto por encontrar estructuras en diferentes fases de la foliculogénesis temprana. Sin embargo, en este estudio no se puede establecer si la presencia de estas estructuras fué producto de eventos morfogenéticos durante la reagregación o si estas estructuras se encontraban previamente en los botones celulares antes del cultivo. Sin embargo, reflejan los eventos que ocurren durante la foliculogénesis normal del ovario del ratón.

Moscona (1965) y Zenzes y Engel (1981) describieron la importancia de la edad del tejido a reagregar en función de sus capacidades de reagregación. El hecho de que la cantidad de zonas de segregación incompleta entre el compartimiento epitelial y el estromático sea mayor conforme avanza la edad de las gónadas disgregadas, sugiere que la mayor especialización de las células acarrea una pérdida en su capacidad morfogenética. Sin embargo, es posible que con tiempos de cultivo mayores a 24 horas, estas zonas de segregación incompleta no se encontraran e incluso sería de esperar que las láminas basales fueran continuas.

Magre et al (1981) postularon que el cultivo de testículos embrionarios de rata en un medio suplementado con suero bovino fetal tiene un efecto de desorganización de los cordones testiculares. En el ratón existen antecedentes similares pero no ocasionados por el cultivo con suero bovino fetal sino por la adición al cultivo de análogos del AMPc (Taketo et al, 1984). Los resultados obtenidos en este estudio se contraponen con los resultados obtenidos por Magre et al (1981). En ninguno de los casos de cultivo en presencia de suero bovino fetal, se observó

que los cordones testiculares no se formaran. Probablemente el efecto de desorganización de cordones testiculares sea específico para la gónada de la rata y/o que el suero empleado por estos autores contiene factores que no están presentes en el utilizado en el presente trabajo.

3. Células con desarrollo programado.

3.1. Las células de Leydig.

En los reagregados de testículos de 13 dg, las células de Leydig se diferencian ultraestructuralmente, tal como ocurre in vivo en las siguientes 24 hr. Esto indica que una vez determinadas para diferenciarse como células productoras de andrógenos siguen un patrón de desarrollo cronológicamente determinado. Esta observación está de acuerdo con los resultados obtenidos por Patsavoudi et al (1985), en donde observan que la citodiferenciación endócrina de las células de Leydig es independiente de la organogénesis testicular. Los estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la manipulación de la disgregación-reagregación en nuestras condiciones, no afecta la capacidad esteroidogénica de las células de Leydig (datos no publicados).

En los reagregados de testículos algunas de las células germinales que quedaban en posición extracordonal estaban en contacto directo con células de Leydig. Al parecer dicha interacción no tuvo ningún efecto sobre las proespermatogonias. El significado de esta interacción se puede interpretar en términos de el origen de las células de Leydig. Se han postulado varios orígenes de las células de Leydig. Mientras

algunos autores postulan un origen epitelial, otros lo postulan estromático. El hecho de que las células de Leydig mantengan afinidad por las CG después de la reagregación sugiere que las primeras tienen un origen estromático, ya que si tuvieran un origen epitelial sería de esperar que dicha interacción no ocurriera puesto que las células germinales en posición extracordonal han perdido afinidad por las células de Sertoli y la conservan con las células mesenquimáticas.

3.2. Las células germinales.

En reagregados de ambos sexos, las células germinales muestran indicios de poseer un programa de desarrollo preestablecido o predeterminado que aparentemente no se ve afectado por la disgregación del tejido. Esto lo sugiere la conservación del período de proliferación por el que pasan las células germinales de ambos sexos: las proespermatogonias antes de entrar en reposo mitótico y las ovogonias antes de iniciar la meiosis embrionaria.

Sobre este punto es de gran interés el conocer si las proespermatogonias entran en reposo mitótico por la acción de un factor inhibidor de la meiosis, o bien, si éstas poseen un programa de diferenciación intrínseco en cuanto a el inicio de la meiosis. Byskov (1978) y Upadhyay y Zamboni (1982) proponen la existencia de una factor que inhibe el inicio de la meiosis embrionaria en los machos genéticos. Las observaciones realizadas por dichos autores indican que cuando las proespermatogonias están fuera de la influencia directa de las células de Sertoli, aquellas inician la meiosis. Byskov, por su parte, sostiene que la meiosis se inicia por la acción de un

factor inductor que proviene del mesonefros. Por otro lado Upadhyay y Zamboni postulan que la meiosis se inicia espontáneamente sólo por estar fuera de la influencia de un factor inhibidor sintetizado por las células de Sertoli.

En los reagregados de testículos, gran número de proespermatogonias quedan fuera de la influencia directa de las células de Sertoli y, sólo en ocasiones extraordinarias, se observó después de 24 hr de cultivo que éstas iniciaron la meiosis (datos no presentados). Estos resultados pueden interpretarse de la siguiente manera: en el ovario de ratón in vivo, entre los días 13 y 14 de la gestación, los ovocitos muestran los primeros indicios de condensación de la cromatina correspondientes al inicio de la profase de la primera división meiótica (Brambell, 1927) y es hasta el día 15 de la gestación que se observan, al microscopio electrónico, complejos sinaptinémicos, estructuras que sin lugar a dudas demuestran que los ovocitos han iniciado la meiosis. Es precisamente entre los 13 y 15 dg que Byskov (1978) observó que algunas proespermatogonias presentan una cierta condensación de la cromatina que sugiere el inicio de la meiosis. En el presente estudio, en los reagregados de testículos provenientes de gónadas disgregadas entre los 13 y los 15 dg, muy rara vez se observó que alguna de las proespermatogonias en posición extracordonal iniciara la meiosis. Estos resultados sugieren varias posibilidades: a) que las proespermatogonias siguen un patrón de desarrollo predeterminado y que sólo algunas inician la meiosis espontáneamente; b) que una vez inhibidas por un factor no es necesaria la interacción directa y continua con las células de Sertoli; y c) que por la manipulación que implica la

presente técnica se pierda el factor inductor de la meiosis, ya que los reagregados se hicieron en ausencia del mesonefros.

En cuanto a los ovocitos, parece que la meiosis una vez iniciada, sigue un patrón de desarrollo cronológico predeterminado. Esto se ve apoyado por los resultados correspondientes al grado de avance de la meiosis de los ovocitos de reagregados de ovarios en comparación con los de desarrollo normal. En los primeros se observa que el grado de avance de la meiosis corresponde a la edad del órgano más 24 horas (tiempo de cultivo): el preleptoteno y el leptoteno son etapas de condensación de la cromatina que en el ovario normal se encuentran en ovocitos de 13 y 14 dg. Estas etapas de la meiosis se encontraron en ovocitos de reagregados de ovarios de 12 y 13 dg. De igual manera, el grado de avance de la meiosis en ovocitos de reagregados de otras edades siempre correspondió a la edad que tenía in vivo más las 24 hr que se mantuvieron en cultivo.

4. Cambio en la afinidad entre las células germinales (CG) y de Sertoli (CS).

En la literatura existen algunos antecedentes que sugieren un cambio en la afinidad entre las CG y las CS durante el desarrollo de la gónada de la rata. Estos trabajos se realizaron por medio del método experimental de reagregación de suspensiones celulares.

Erickson et al (1980) trabajaron con testículos de 15 dg de rata. El método de agregación que utilizaron fue el propuesto por Davis (1978), pero encontraron que según la densidad de

células sembradas en cada monocapa, se formaban dos tipos de agregados: esféricos cuando la densidad celular era baja y tubulares si la densidad era muy alta. En ambos tipos de agregados, pero principalmente en los esféricos, las células que identificaron como células germinales se encontraban en el borde de los reagregados. Este borde estaba constituido principalmente por células tipo miofibroblásticas. En este caso, los autores adjudican esta posición a la técnica de agregación empleada.

Grund et al (1986) por otra parte, trabajaron con testículos neonatales de rata y emplearon un sistema de reagregación por rotación. Aunque encuentran una restitución histológica similar a la observada in vivo, muestran que varias proespermatogonias quedan incluidas en el estroma de sus reagregados. Así mismo, no realizaron ningún estudio cuantitativo del porcentaje de células geminales encontradas en posiciones intra y extracordonaes y, además, no discuten acerca de la posible causa de encontrarlas en posiciones anormales.

En algunos otros trabajos realizados con testículos de ratas recién nacidas y con el sistema de agregación por rotación, mencionan que las proespermatogonias se encuentran en posiciones intracordonaes; sin embargo, parece que la proporción entre proespermatogonias y células de Sertoli no corresponde a la de testículos intactos (Zenzes, 1981; Zenzes y Engel, 1981).

Los resultados cuantitativos del porcentaje de proespermatogonias en posiciones intracordonaes y extracordonaes en reagregados de testículos de 12 a 15 dg sugieren una pérdida gradual de la afinidad celular entre ambos tipos celulares. Entre los 15 dg y 1 dpp, el porcentaje de células conservadas en posición intracordonaal es muy bajo.

Es probable que este cambio de afinidad se deba a cambios en la superficie celular de alguno de los dos tipos celulares o de ambos. Durante el desarrollo se han detectado estructuras específicas de carbohidratos en glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular que aparecen y desaparecen en diversos tipos celulares (eritrocitos, células del endodermo, células intestinales, neuroectodermo) (revisado en Feizi, 1985). Estos de alguna manera, juegan un papel muy importante en el reconocimiento celular. Estos carbohidratos de estructura definida pueden estar en relación estrecha con ciertas moléculas que intervienen en la adhesión celular como las "moléculas de adhesión celular" (MAC) (Edelman, 1983) o "los factores de agregación celular" (Hausman y Moscona, 1975). Es posible que los cambios en el comportamiento distributivo de las células germinales en los reagregados puedan interpretarse en términos de algún cambio en la glucosilación de proteínas de superficie durante la gonadogénesis en alguno o en ambos tipos celulares. Lo anterior podría redundar en la no identificación y adhesión celular entre estos tipos celulares, razón por la cual, las células germinales quedan excluidas de los cordones testiculares de los reagregados.

5. Consideraciones finales

El presente trabajo propone la utilización de un modelo experimental que ayude al conocimiento de las interacciones y asociaciones celulares específicas que se dan durante la morfogénesis de la gónada de los mamíferos.

El haber realizado un estudio sistemático de los patrones de reagregación de gónadas en diferentes edades del desarrollo nos

dió idea de las variaciones en las afinidades celulares durante el desarrollo gonadal, tal y como lo sugiere la falta gradual de incorporación de las células germinales dentro de los cordones testiculares de los reagregados de testículos. En este sentido, se abre un campo de estudio en cuanto al conocimiento de las interacciones celulares y asociación específica entre las células germinales y las células de Sertoli durante el desarrollo testicular.

De igual manera, este trabajo nos proporcionó ciertos datos respecto a la etapa de desarrollo de la gónada en la que las diferentes líneas celulares se encuentran ya determinadas desde el punto de vista embriológico.

Finalmente, parece necesario realizar más estudios enfocados a establecer, de una manera clara, si en este sistema experimental se llevan a cabo los eventos morfogénéticos correspondientes a la foliculogénesis temprana del ovario. Sería de gran utilidad en el conocimiento de los eventos celulares que ocurren durante éste evento.

VI. CONCLUSIONES

1. Después de disgregarse y reagregarse, la morfogénesis de los testículos tomados en diferentes etapas del desarrollo es similar a la que ocurre in vivo.

2. Existe un cambio en la afinidad entre las células germinales y de Sertoli conforme avanza la diferenciación testicular.

3. Al parecer, las células de Leydig y las células germinales de ambos sexos poseen un programa de diferenciación ya determinado in vivo, que no es alterado por la manipulación experimental.

4. No existe una diferencia marcada en los patrones de reagregación histotípica entre los reagregados cultivados con y sin suero bovino fetal.

VII. APENDICES

Apéndice I

Azul de Tripano

Azul de tripano400 mg
NaCl810 mg
K ₂ HPO ₄60 mg
Metil p- hidroxibenzoato50 mg
agua bidestilada100 ml

Se disuelve el NaCl, el K₂ HPO₄ y el metil p- hidroxibenzoato en 90 ml de agua bidestilada, se le agrega el azul de tripano y se calienta hasta que hierva. Se deja enfriar y se ajusta el pH a 7.2 ó 7.3 con NaOH 1 N (unas 8 gotas). Se lleva a 100 ml con agua bidestilada.

Apéndice II

Azul de Toluidina

Azul de toluidina 5 g
Tetraborato de sodio40 g
Agua bidestilada 1 l

Se disuelve el azul de toluidina en 300 ml de agua bidestilada, se le agrega el tetraborato de sodio y se afora a un litro. Se hierve por espacio de 15 min y se filtra una vez que está frío.

Apéndice III

Citrato de plomo alcalino.

Citrato de plomo	0.03 g
Agua bidestilada	10.0 ml
NaOH 10 N	0.1 ml

Se disuelve el citrato de plomo en los diez mililitros de agua (hervida previamente por espacio de 15 min) y se le agrega el hidróxido de sodio. Se protege la solución de la luz durante y después de la preparación.

VIII. REFERENCIAS

Allen BM (1904) The embryonic development of the ovary and the testis of the mammals. Am J Anat 3: 89-153.

Alvarez-Buylla A y Merchant LH (1986) Mouse primordial germ cell use fibronectin as substrate for migration. Exp Cell Res 165: 362-368.

Baker y Neal (1974) Oogenesis in human fetal ovaries maintained in organ culture. J Anat 117(3):591-604.

Ben-Shaul y Moscona AA (1975a) Scanning electron microscopy of reaggregating embryonic neural retina cells. Exp Cell Res 95:191-204.

_____ (1975b) Scanning electron microscopy of embryonic neural retina cells surfaces. Develop Biol 44:386-393.

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

Brambell FW y Parkes SA (1927) Changes in the ovary of the mouse following exposure to X-rays: 3. Irradiation of non-purous 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.

Burns RK (1961) Role of hormones in the differentiaion of sex. En: Sex and internal secretions. (Eds. Young WC y Baltimore DM). Williams y Williams 76-160.

Byskov AG (1975) The role of the rete ovarii in meiosis and follicle formation in the cat, mink and ferret. J Reprod. Fert. 45:201-209.

_____ (1978) The meiosis inducing interaction between germ cells and rete cells in the fetal mouse gonad. Ann Biol Anim Biochem Biophys. 18: 327-334.

_____ (1979) Regulation of meiosis in mammals. Ann Biol. Anim Biochem Biophys 19: 1251-1261.

Byskov AG (1981) Gonadal sex and germ cell differentiation. En: Mechanisms of sex and differentiation in animals and man (Eds. Austin CR y Edwards RG) Academic Press London. 145-164.

_____ y Lintern-Moore S (1973) Follicle formation in the immature mouse ovary: the role of the rete ovary. J Anat 116: 207-217.

_____ Skakkebaek NE Stafanger G Peters H (1977) Influence of the ovarian surface epithelium and rete ovarii on

follicle formation. J Anat 123: 77-86.

Challoner S (1975) Studies of oogenesis and follicular development in the golden hamster. 3. The initiation of follicular growth in vitro. J Anat 119: 157-162.

Chimal MJ (1987) El proceso de foliculogénesis en el ovario de ratón (Mus musculus): Estudio experimental in vitro. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias, Depto de Biología UNAM.

Chiquoine AD (1954) The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. Anat Rec. 118: 135-146.

_____ (1960) The development of the zona pellucida of the mammalian ovum. Am J Anat. 106: 149-169.

Clark JM y Eddy EM (1975) Fine structural observations on the origins and associations of primordial germ cells in the mouse. Develop Biol 47: 136-155.

Davis JC (1978) Morphogenesis by dissociated immature rat testicular cells in primary culture. J Embryol exp Morph 44:297-302.

Eddy EM (1974) Fine structural observations on the form and distribution of Nuage in germ cells of the rat. Anat Rec 178:731-758.

Edelman GM (1983) Cell adhesion molecules. Science 219:450-457.

Erickson LA , Davis JC , Burton PR y Snyder J (1980) Correlative light and electron microscopy of dissociated immature rat testicular cells undergoing morphogenesis in vitro. J Embryol exp Morph 60:283-293.

Everett NB(1945) The present status of the germ cells problem in vertebrates. Biol Rev 20:45-55.

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

Feizi T (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. Nature 314(6006):53-57.

Fischman DA Doering JL y Frieland M (1976) Muscle development in vitro: Regulation of cell fusion and serological analysis of the myogenic cell surface. En: Tests of teratogenicity in vitro. (Eds. Ebert JD y Marois M). North Holland Pub. Co., Amsterdam 333-359.

Fischman DA y Moscona AA (1971) Reconstruction of heart tissue from suspensions of embryonic myocardial cells: Ultrastructural studies on dispersed and reaggregated cells. En: Cardiac hypertrophy. (Ed. Alpert NR). Academic Press 125-139.

Galtsoff PS (1925) Regeneration after dissociation: An experimental study on sponges. J Exp Zool 42:223-255.

Garber BB y Moscona AA (1972) Reconstitution of brain tissue from cells suspensions. 2. Specific enhancement of aggregation of embryonic cerebral cells by supernatant from homologous cell cultures. Develop Biol 27:235-243

Gillman J (1948) The development of gonads in man, with a consideration of the role of fetal endocrines and the histogenesis of ovarian tumors. Contrib Embryol Carnegie Inst Washington 32:81-83.

Goldschneider I y Moscona AA (1972) Tissue-specific cell-surface antigens in embryonic cells. J Cell Biol 53:435-439.

Gondos B (1984) Germ cell differentiation and intercellular bridges. En: Ultrastructure of Reproduction. (Eds. Van Berkorn J y Motta PM). Martinus Nijhoff Publishers, Boston 31-45.

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

Gruenwald P (1942) The development of the sex chords in the gonads of man and mammals. Amer J Anat 70: 359-397.

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

Hausman RE y Moscona AA (1975) Purification and characterization of retina-specific cell-aggregating factor. Proc Nat Acad Sci USA 72:916-920.

Hillscher B y 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. (Ed. Byskov AG y Peters H). Experta medica, Amsterdam. 131-139.

Josso W, Picard JY y Tran D (1977) The antimullerian hormone. Recent Prog Horm Res 33:117-163.

Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27: 137A.

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

Luft, J.H. (1961). Improvements in epoxy resins embedding methods. J Biophys Biochem Cytol 9:409-416.

Magre S, Angelopoulou A y Jost A (1980) Cellules de Sertoli et organogénese du testicule foetal. Ann d'Endocrinologie (Paris) 41: 531-537.

Magre S, Angelopoulou A y Jost A (1981) Action du sérum de foetus de 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 y Jost A (1983) Early stages of the differentiation of the rat testis: relations between Sertoli and germ cells. En: Current problems in germ cells differentiation. (Ed. McLaren A). Cambridge University Press 201-214.

_____ (1984) Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. Proc Natl Acad Sci USA 81: 7831-7834.

McKay DG, Hertig AT, Adams EC y Danzinger S (1953) Histochemical observations on the germ cells of human embryos. Anat Rec 117:407-408.

Merchant LH (1975) Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. Develop Biol 41: 1-21.

_____ (1976) The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. En: Progress in differentiation research. (Ed. Müller-Bérat N) Elsevier New York. 453-462.

_____ (1979a) Origin of the somatic cells in the rat gonad: An autoradiographic approach. Ann Biol Anim Biochem Biophys 19: 1219-1229.

Merchant LH (1979b) Follicular atresia and the formation of an interstitial gland. Eur J Obstet gyn Reprod Biol 9(3):219.

_____ (1984) Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis. En: Ultrastructure of Reproduction. (Eds. Blerkom J Motta PM) Martinus Nijhoff Publishers Boston. 19-30.

_____ y Centeno UB (1981) Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse. En: Advances in the morphology of cells and tissues. (Ed Acosta VE) Alan R. Liss New York. 383-392.

_____, Popova L y Reyss-Brion M (1984) Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonefros. Develop Growth and Differ 26:403-417.

Mintz B (1958) Irradiation of primordial germ cells in mouse embryo. Anat Rec 130:341.

Mitchell PA y Burghardt RC (1986) The ontogeny of nexuses (Gap junctions) in the ovary of the fetal mouse. Anat Rec 214: 283-288.

Moscona AA (1956) Development of heterotypic combinations of dissociated embryonic chick cells. P.S.E.B.M. 92:410-416.

_____ (1961) Rotation-mediated histogenetic aggregation

of dissociated cells: A quantifiable approach to cell interactions in vitro. Exp Cell Res 22:455-475.

Moscona AA (1974) Surface specifications of embryonic cells: Lectin receptors, cell recognition and specific cell ligands. En: The cell surface in development. (Ed. Moscona AA). John Wiley and Sons, NY 67-99.

Moscona AA, Hausman RE y Moscona M (1975) Experiments on embryonic cell recognition: In search for molecular mechanism. En: Proceeding 10th FEBS meeting, Paris. (Ed. Raoul Y). North-Holland Pub. Co., Amsterdam pp245-256.

Moscona AA y Moscona M (1966) Aggregation of embryonic cells in a serum-free medium and its inhibition at suboptimal temperatures. Exp Cell Res 41:697-702.

Moscona M y Moscona AA (1965) Control of differentiation in aggregates of embryonic skin cells: Suppression of feather morphogenesis by cells from other tissues. Develop Biol 11:402-423.

Moscona AA, Trowell OA y Willmer EN (1965) Methods. En: Cells and Tissues in culture. (Ed. Willmer EN). Academic Press, NY 19-98.

Muller U, Siggh L, Grund KS y Jones WK (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.

Nagano T y Zuzuki F (1976) The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. Anat Rec 185:403-418.

Nagy F (1972) Cell division kinetics and DNA synthesis in the immature Sertoli cells of the rat testis. J Reprod Fert 28:389-395.

O WS y Baker TG (1978) Germinal and somatic cell interrelationships in gonadal sex differentiation. Ann Biol anim Bioch Biophys 18:351-357.

Odor LD y Blandau JR (1969) Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. Am J Anat 124: 163-186.

_____ (1971) Organ cultures of fetal mouse ovaries. I Ligth microscopic structure. Am J Anat 131: 387-414.

Ohno S, Nagai Y y Ciccicarese S (1978) Testicular cells lysotripped of H-Y antigen organize ovarian follicle-like aggregates. Cytogenet Cell Genet 20: 351-364.

_____ y H Iwata (1979) Testis-organizing H-Y antigen and the primary sex determinatig mechanism of mammals. Recen Prog Horm Res 35:449-478.

Ohno S y Smith JB (1964) Role of fetal follicular cells in

meiosis of mammalian oocytes. Cytogenet 3:324-333.

Paranko J (1986) Extracellular matrix and intermediate filaments in the morphogenesis of fetal rat internal genitalia. Doctoral Thesis. Turku, Finlandia.

Paranko J, Pelliniemi J, Vaheri A, Foidart JM y Lakkala-Paranko T (1983) Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads. Differentiation S23:S72-S81.

Patsavoudi E, Magre S, Castanier M, Scholler R y Jost A (1985) Dissociation between testicular morphogenesis and functional of Leydig cells. J Endocr 105: 235-238.

Pehleman FW y Lombard MN (1978) Differentiation of ovarian and testicular interstitial cells during embryonic and post-embryonic development in mice. Cell Tissue Res 188:465-480.

Pelliniemi LJ (1976) Ultrastructure of the indifferent gonad in male and female pig embryos. Tissue and Cell 8:163-174.

Peters H (1978) Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrate ovary. (Ed. Jones RE) Plenum New York. 121-144.

Pinkerton JHM, McKay D, Adams E y Hertig A (1961) Development of the human ovary. A study using histochemical techniques. Obstet Gynec 18: 152-181.

Regenass U, Friedrich DT y Stevens CL (1982) Experimental induction of testicular teratomas in dissociates-reaggregated chimaeric gonads. J Embryol exp Morph 72:153-167.

Rinaldini ML (1959) An improved method for isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp Cell Res 16:477-505.

Roseman S (1974) The biosynthesis of complex carbohydrates and their potential role in intercellular adhesion. En: The cell surface in Development. (Ed. Moscona AA). John Wiley and Sons, NY 255-272.

Roth S, McGuire ES y Roseman S (1971) Evidence for cell-surface glycosyltransferases: Their potential and role in cellular recognition. J Cell Biol 51:536-551.

Russo J y De Rosas JC (1971) Differentiation of the Leydig cell of the mouse testis during fetal period—an ultrastructural study. Am J Anat 130:461-480.

Sainmont (1906) Recherches relatives à l'organogénèse de testicule et de l'ovarie chez le chat. Arch d Biol 22:71-161.

Shimada Y, Moscona AA y Fischman DA (1974) Scanning electron microscopy of cell aggregation: cardiac and mixed retina-cardiac cell suspension. Develop Biol 36:428-446.

Simpson E (1982) Sex reversal and sex determination. Nature 300:404-406.

Silvers WK y Wachtel SS (1977) H-Y antigen: Behaviour and function. A cell surface component of vertebrate may be directly involved in primary sex determination. Science 195:956-960.

Slizynski BM (1967) Morphology changes and radiosensitivity of mouse oocytes. Curr Mol Biol 1:1-4.

Sperry RN (1963) Chemoaffinity in orderly growth of nerve fiber patterns and connections. Proc Natl Acad Sci USA 50:703-710.

Steinberg MS (1964) The problem of adhesive selectivity in cellular interactions. En: Cellular membranes in development. (Ed. Locke M). Acad. Press, NY 321-366.

Taketo T, Thau RB, Adeyemo O y Koide SS (1984) Influence of adenosine 3-5'-cyclic monophosphate analogues on testicular organization of fetal mouse gonads in vitro. Biol Reprod 30: 189-198.

Upadhyay S, Luciani JM y Zamboni L (1981) The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. En: Development and function of reproductive organs. (Eds. Byskov AG Peters H) Excerpta Medica Amsterdam. 18-27.

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

Urban E, Zenzes MT, Muller U y Wolf U (1981) Cell reorganization in vitro of heterosexual gonadal cocultures. Differentiation 18:161-168.

Wachtel SS, Ohno S, Koo GC y Boyse EA (1975) H-Y antigen and male development. En: The testis in normal and infertile men. (Ed. Troen P y Nankin RH). pp 35-43.

Weiss P (1945) Experiments on cell and axonal orientation in vitro: The role of extracellular exudates in tissue organization. J Exp Zool 100: 353-386.

Wilson HV (1907) On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. J Exp Zool 5:245-258.

Witschi E (1948) Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal fold. Contrib Embryol 32: 67-80.

Witschi E (1951) Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. Recent Prog Horm Res 6: 1-23.

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

Zamboni L y Merchant LH (1973) The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. Am J Anat 137: 299-336.

Zenzen MT (1981) H-Y antigen negative germ cells in gonadal organization in vitro. A Morphological study. Differentiation 18:169-173.

Zenzen MT y Engel W (1981) The capacity of testicular cells of the postnatal rat to reorganize into histotypic structures. Differentiation 20:157-161.

Zenzen MT, Urban U y Wolf U (1980) Mammalian cross-reactive H-Y antigen induces sex reversal in vitro in avian testis. Differentiation 17:121-126.

Zenzen Mt, Wolf U, Gunther E y Engel W (1978a) Studies on the function of H-Y antigen: Dissociation and reorganization experiment in rat gonadal tissue. Cytogenet Cell Genet 20:365.

Zenzen MT, Wolf U, Engel W (1978b) Organization in vitro of ovarian cells into testicular structures. Hum Genet 44:333.

Zetterqvist H (1956) The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Thesis Karolinska Institutet. Estocolmo, Suecia.