



107
2-8

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estudio sobre la Estereidogenesis durante la
Diferenciación de la Gonada en el
Embrión de Bovino.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
MARIA VERONICA LOPEZ VALENCIA

FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue investigar en qué momento del desarrollo, es posible detectar biosíntesis de hormonas esteroides en gónadas indiferenciadas de feto de bovino (*Bos indicus*), utilizando una técnica muy sensible como es la de transformación isotópica.

Se estudiaron 38 fetos de bovino, cuyas medidas de longitud C-R (coronolla- rabadilla) está entre 1.0 y 3.4 cm. De 1.0 a 2.0 cm de long. C-R del feto el primordio gonadal se encuentra en la etapa de cresta genital y de 2.8 cm en adelante, ya es posible reconocer morfológicamente a las gónadas. En todos los casos, el diagnóstico del sexo se realizó en base al cariotipo de células hepáticas. Para evaluar la biosíntesis, una suspensión celular obtenida por digestión enzimática de la gónada, se incubó durante una hora en medio Dulbecco en presencia de 0.1μ Ci de, ($1,2,6,7$ 3 H) androstenediona. En el caso de las crestas genitales, en lugar de la digestión enzimática, éstas se incubaron en fragmentos. Al final de la incubación se extrajeron los esteroides y se separaron por cromatografía de placa fina (diclotometano - acetato de etilo 8:2 y eter - hexano 3:1). Los productos obtenidos fueron testosterona en machos y 17β - estradiol y estrona en hembras.

En gónadas de 1.0 a 1.5 cm de long. C-R no se observó síntesis de esteroides; a partir de 1.8 cm de long. C-R se cuantificó biosíntesis de los tres productos ya mencionados y esta se incrementa considerablemente conforme aumenta la edad.

Los resultados demuestran que la presencia de actividad enzimática de 17β - hidroxisteroide deshidrogenasa en machos y aromatasa y 17β - hidroxisteroide deshidrogenasa en hembras es un fenómeno muy precoz en la diferenciación gonadal y precede a la diferenciación morfológica.

INDICE

	Página
INTRODUCCION -----	4 - 16
OBJETIVO -----	17
MATERIALES Y METODOS -----	18 - 25
RESULTADOS -----	26 - 36
DISCUSION Y CONCLUSIONES -----	37 - 40
BIBLIOGRAFIA -----	41 - 46

INTRODUCCION

La diferenciación sexual, es un proceso secuencial que se origina a partir del establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fertilización, e involucra una serie de eventos que poseen un alto grado de precisión, siendo igualmente complejos los mecanismos que los regulan. El dimorfismo sexual presenta diferentes etapas durante el desarrollo de los organismos. Estas etapas son las siguientes: a) etapa cromosómica, b) etapa gonadal, c) etapa fenotípica y d) etapa psicosocial.

Sexo Cromosómico

La naturaleza de la información sexual fue durante mucho tiempo un enigma. El trabajo que abrió la primera brecha en este campo fué el realizado en *Drosophila*, cuyos resultados sugirieron que el sexo estaba determinado por el número de cromosomas X presentes en los organismos. Así se tenía que las moscas con un sólo cromosoma X eran machos y que la presencia de dos o más cromosomas X confería a los organismos de un fenotipo femenino (Vogel y Motulsky, 1979). En 1957, Stern propuso que en los mamíferos, el cromosoma Y era un cromosoma que aparentemente poseía poca o ninguna información genética, con la posible excepción de algún factor que promovía la fertilidad en los machos. Sin embargo, con el desarrollo de las técnicas para determinar el cariotipo de los cromosomas a principios de la década de los años sesentas, fué posible establecer que el cromosoma Y en el humano y en otras especies de mamíferos es

determinante en el desarrollo de los testiculos (George y Wilson, 1988).

De ésta manera queda establecido que el dimorfismo sexual en los mamíferos se da cuando un espermatozoide que posee un cromosoma X ó Y fertiliza a un óvulo que únicamente presenta un cromosoma X. Siendo característico el hecho de que las hembras posean un complemento cromosómico sexual XX y los machos uno XY. Los eventos subsecuentes de diferenciación dependerán en gran medida de los factores determinantes de la feminización o de la masculinización, los cuales se localizan en autosomas y cromosomas sexuales.

La participación del cromosoma X en la determinación gonadal y gametogénica en ambos sexos es fundamental. Esto se debe a que dicho cromosoma posee genes que controlan mecanismos importantes, como el gen que regula la expresión del receptor intracelular para andrógenos y otro que contribuye en la espermatogénesis normal. Un fenómeno importante es que la inactivación de un cromosoma X en los individuos femeninos mantiene el equilibrio génico en ambos sexos al igualar el contenido de ADN cromosómico activo (Lyon, 1974) (Gartler, 1973).

Diferenciación Gonadal

La diferenciación gonadal en el humano se evidencia a partir de la 6a ó 7a semana de desarrollo embrionario (Jirasek, 1971; Witschi, 1956). Desde el punto de vista embriológico la gónada se forma de dos tipos de células: las células somáticas de

origen mesodérmico y las células germinales primordiales (CGP).

Las CGP se reconocen tempranamente en el desarrollo ontogénico debido a que son de mayor tamaño que las células somáticas, su citoplasma es claro, con núcleos grandes y redondos y con un contenido alto en glucógeno y fosfatasa alcalina (Mackey y cols., 1953). Tienen un origen extragonadal y se les reconoce por primera vez en el endodermo del saco vitelino cerca de la alantoides, poseen la capacidad de migrar y de establecer contacto con células somáticas, y pueden proliferar fácilmente. Debido a su capacidad migratoria, las células germinales primitivas abandonan el epitelio del intestino posterior sitio al que se desplazaron a partir del saco vitelino, moviéndose lateralmente hacia las regiones urogenitales. A pesar de que se desconocen los factores que estimulan y guían a las CGP hasta su destino, es evidente que las células somáticas ubicadas en la región donde se formarán las futuras crestas gonadales emiten y / o manifiestan señales específicas que atraen y retienen a las células germinales.

Después de que las CGP llegan a la región urogenital, comienzan un activo proceso de proliferación que coincide cronológicamente con la proliferación de las células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico que bordea esta región. El conjunto de estos eventos da origen al blastema gonadal que se sitúa en la parte ventral del mesonefros. El blastema gonadal se organiza en dos diferentes tipos de tejido: a) el tejido que contiene a las CGP formado por las células somáticas precursoras de las células de Sertoli o de la granulosa y b) el tejido estromático que dará origen al tejido conectivo, vasos sanguíneos

y al tejido intersticial esteroidogénico (representado este último por células de Leydig o por células intersticiales del ovario.

Morfológicamente el primer signo de dimorfismo gonadal es el desarrollo de las células de Sertoli primordiales y su agregación en el interior de los cordones espermatogénicos en el testículo fetal, así mismo se produce una condensación de tejido conectivo en la zona periférica que va a constituir la túnica albugínea (Jost, 1984). En contraste con el testículo fetal, el ovario no muestra eventos que lo caractericen histológicamente en las primeras etapas de su desarrollo embriológico, por lo que su identificación se lleva a cabo por exclusión.

El papel que juegan las CGP en el desarrollo gonadal y la diferenciación es muy importante pues de la presencia de estas y su migración al epitelio celómico depende que se lleven a cabo normalmente los eventos de diferenciación y desarrollo.

Teorías Sobre la Formación de las Gónadas

La formación, desarrollo y diferenciación gonadal fueron descritas inicialmente por Waldeyer (1870), quien propuso que las masas ó cúmulos celulares centrales de las gónadas (blastema gonadal ó médula) se originaban a partir del mesonefros. Desde entonces, en los siguientes 100 años se postularon numerosas teorías acerca del origen de las gónadas, algunas de las cuales actualmente han quedado descartadas (por ej. la teoría que postula que las CGP se originan a partir del epitelio germinal).

Algunos autores propusieron que los diferentes tipos celulares que forman las gónadas tienen su origen en el tejido mesenquimatoso (Allen y cols., 1904). Jirasek (1968, 1971), quien estudió las gónadas fetales de humano, concluyó que tanto las células mesenquimatosas de las crestas mesonefricas y las células mesenquimatosas de origen mesodérmico dan origen a las gónadas.

Witschi (1931, 1948), trabajando con gónadas de anfibio, llegó a la conclusión de que las gónadas están constituidas por dos diferentes tipos de tejido: la corteza que se deriva a partir del epitelio celómico, y la medula formada por células del tejido mesonefrico.

Burns (1961) describió un modelo diferente de diferenciación gonadal en amniotas, él propone que los cordones sexuales primarios proliferan a partir del epitelio celómico (primera proliferación) y forman los cordones medulares. En el testículo estos cordones se desarrollan dando origen a los cordones testiculares. En el ovario, se lleva a cabo una segunda proliferación del epitelio germinal formando los cordones sexuales secundarios, al mismo tiempo que los cordones primarios son desplazados hacia la médula donde degeneran.

Al estudiar ovarios de fetos de humano y de bovino, Pinkerton (1961); Gropp, y Ohno (1966) propusieron un modelo en el cual el blastema gonadal tiene su origen en el mesonefros. En el feto de bovino, cuyo mesonefros es un órgano muy prominente, se observan sólidas masas celulares con una fuerte reacción de fosfatasa alcalina las cuales se extienden a partir

del glomérulo mesonefrico hacia el área gonadal mezclándose con las células germinales y el mesenquima. Posteriormente durante los eventos de diferenciación gonadal, estas sólidas masas de células darán origen a los cordones sexuales.

Finalmente Byskov y cols. (1977) propusieron que las células somáticas de las gónadas derivan del mesonefros y son determinantes en la diferenciación gonadal, mientras que el epitelio celómico juega un papel menor aunque no puede ser excluido; estos autores consideran que no se presentan proliferaciones primarias y secundarias.

Funcionamiento Endócrino del Ovario y el Testículo Fetales

En la mayoría de las especies animales, la diferenciación endócrina del ovario fetal se manifiesta por la aparente capacidad de sintetizar estrógenos, la cual ocurre simultáneamente con la habilidad del testículo de sintetizar testosterona durante su desarrollo (Fredrick y Wilson, 1979).

Al parecer la formación de estrógeno no es esencial para el desarrollo normal del fenotipo femenino en etapas tempranas del desarrollo embrionario (Jost, 1953). No obstante se asume que el ovario fetal posee la capacidad, aunque pequeña, de sintetizar estrógenos durante su desarrollo embrionario (Bloch, 1964) (Schindler y Friedrich, 1985).

Recientemente se reportó que la capacidad de sintetizar estrógenos, a partir de un precursor radiactivo (andrógeno) por el ovario del conejo y el humano es similar a la que tiene el testículo de sintetizar testosterona en las mismas especies. Este evento en el ovario se manifiesta antes de que se observe una

diferenciación histológica (Milewich, George y Wilson; 1977 y 1978).

En el bovino la primera producción de hormonas esteroideas ha sido demostrada en el blastocisto y al parecer esta primera síntesis podría servir para mantener la preñez (Shemesh y Hansel, 1983). Shemesh (1983), muestra en el bovino que el ovario fetal produce 17β - estradiol a los 42 días de edad gestacional (3.3 - 4.5 cm de long. C-R (coronilla-rabadilla) y esta producción desaparece después de los 90 días de gestación. En una etapa posterior, el ovario tiene la capacidad de producir 17β - estradiol en respuesta a estímulos externos como por ejemplo el agregado de testosterona exógena, pero ésta actividad se mantiene latente si no existe tal estímulo. En el bovino, la diferenciación sexual gonadal se observa en el día 41 de edad gestacional aproximadamente (3.0 cm de long. CR) (Gier y Marion ; 1970).

Dufour (1967), estudia la actividad endócrina en las gónadas fetales de cerdo cuya edad está en el intervalo de 25 a 40 días gestacionales (2.0 - 5.2 cm de long. C-R). En su estudio se procesó el tejido gonadal con técnicas histoquímicas para 3β y 17β - hidroxisteroide- deshidrogenasa, interpretando las zonas que se tiñeron más positivamente con las regiones de mayor actividad endócrina, siendo las gónadas pertenecientes a fetos de 2.5 cm CR las más activas. Esto fue corroborado en trabajos posteriores en los cuáles se realizó un análisis histoquímico con el mismo tipo de gónadas además de un análisis histológico a nivel de microscopía de luz (Moon y Raeside, 1972) (Moon y Hardy, 1973). En dichos trabajos, se observó que el pico de

actividad esteroidogénica se presenta antes de que se lleve a cabo la diferenciación de las células de Leydig en el testículo y antes de que haya una diferenciación histológica en el ovario.

Mauleon et. al. (1977) demostraron que el ovario de la oveja cuya edad gestacional estaba entre 31 - 47 días post coito, podía sintetizar 17β - estradiol antes que el testículo comenzara a secretar testosterona. La secreción de 17β - estradiol en el ovario empieza aproximadamente en el día 31 de edad gestacional periodo en el que se está llevando a cabo la diferenciación sexual (31 - 47 días). En cambio, en el testículo la producción de testosterona es baja durante la diferenciación y aumenta considerablemente con la edad gestacional (47 - 62 días).

En estos estudios la secreción de 17β - estradiol y testosterona fué estimada a partir de la diferencia que se obtuvo entre las cantidades secretadas al medio por las gónadas después de dos días de cultivo, comparadas con el medio de cultivo fresco.

En el conejo, George y Wilson (1978) encontraron que las gónadas en estado fetal sintetizan 17β - estradiol y testosterona y que la producción de 17β - estradiol en el ovario es mayor en los días 17 y 18 de edad gestacional.

En la rata, se describe que la síntesis de estrógenos se inicia unos días después del nacimiento (Lamprecht y cols. ,1976). Sin embargo, Picon y cols. (1985) han reportado que si los ovarios son tratados con dibutyryl cAMP (dcAMP) tienen la capacidad de sintetizar 17β - estradiol in vitro a los 14.5 días de edad gestacional.

Terada y cols. (1984) trabajaron con ovario fetal y neonatal de raton . En ausencia de FSH los ovarios de 18 dias de gestación y de un dia de nacidos no mostraron actividad de aromatasas; sin embargo, en presencia de FSH la actividad de aromatasas en el ovario pudo ser detectada al dia 17 y 18 de gestacion y la actividad se incrementa después de dicha edad.

Con respecto al testículo fetal, la información bibliográfica es más abundante y coincidente, ya en 1904, Allen trabajando con gónadas de cerdo, describio claramente el patrón de desarrollo de las células de Leydig en etapas fetales del testículo utilizando técnicas de microscopia de luz, aunque la primera evidencia aportada acerca de la función endócrina del testículo fetal ya había sido dada por Bouin y Ancel en 1903.

En el cerdo, la primera producción de testosterona fue detectada en gónadas de fetos cuyo tamaño era de 2.0 cm CR y la mayor producción se detecto en fetos menores a los 3.5 cm de longitud CR (25 - 35 dias de gestacion). Esto muestra que en el cerdo la producción de testosterona por el testículo se inicia muy tempranamente durante su desarrollo embriológico (Raeside, 1985).

George y Wilson (1978) a partir de una serie de estudios realizados en el testículo fetal del conejo, encontraron que la función endócrina en éstos se inicia entre los dias 16 y 17 de gestación, pero la producción de hormonas es casi imperceptible.

Es probable que factores hormonales induzcan y regulen la actividad de enzimas específicas responsables de que se inicie la síntesis de testosterona en el testículo fetal. Sin embargo, la presencia de un perfil enzimático en el testículo fetal durante

etapas críticas de la embriogénesis sugiere una programación genética inherente de las células de Leydig fetales; en consecuencia, la iniciación de la síntesis y la secreción de testosterona en el testículo fetal del conejo sería independiente del control hormonal externo (George y Wilson, 1978). Ahluwalia (1974) y Sanyal (1977), proponen que en la rata y en el humano, las gonadotropinas juegan un papel importante durante el desarrollo embriológico, no obstante, los factores que regulan la secreción de testosterona durante el periodo crítico del desarrollo del fenotipo masculino no está bien establecido.

Tomando en cuenta todos los antecedentes ya mencionados podemos decir que las gónadas de ambos sexos son capaces de sintetizar hormonas esteroideas en etapas muy tempranas de su desarrollo fetal.

Biosíntesis de hormonas esteroideas

El colesterol es un esteroide que modula la fluidez de las membranas de los eucariontes, además es precursor de las hormonas esteroideas como la progesterona, testosterona y 17β -estradiol entre otras.

Es una molécula que posee 27 átomos de carbono provenientes de acetil Co A, además de dos grupos metilo ubicados en los carbonos 10 y 13 en posición beta (por encima del plano) ó cis.

Acetato ---- Mevalonato ---- Isopentenilpirofosfato ----
Escualeno ---- Colesterol

En la conversión del colesterol en hormonas esteroideas las

reacciones de hidroxilación juegan un papel muy importante, para que estas se lleven a cabo es indispensable la presencia de Oxígeno y NADPH.



Es necesaria en estas hidroxilaciones la activación del oxígeno la cual se consigue con ayuda del citocromo P450, componente terminal de una cadena de transportadores de electrones que son aportados por el NADPH.

Las hormonas esteroides formadas a partir del colesterol poseen como máximo 21 átomos de carbono. La primera etapa en la síntesis de las hormonas esteroides es la eliminación de una unidad C₆ de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona. La cadena lateral de la molécula del colesterol se hidroxila en C - 20 y después en C - 22, a esto sigue la ruptura del enlace entre C - 20 y C - 22. La última reacción está catalizada por una desmolasa y en todas se utiliza NADPH y O₂.

La síntesis de andrógenos comienza con la hidroxilación de la progesterona (que se sintetiza a partir de la pregnenolona) en C - 17. La cadena lateral compuesta por C - 20 y C - 21, se escinde para liberar la androstenediona la cual es un andrógeno. Con la reducción del grupo 17 - ceto de la androstenediona se forma la testosterona compuesta como todos los andrógenos por 19 átomos de carbono.

Después de la síntesis de andrógenos, se lleva a cabo la síntesis de estrógenos pues estos últimos se elaboran a partir de los primeros por pérdida del grupo metilo C - 19 y la formación de un anillo aromático. Para que estas reacciones se lleven a

cabo es indispensable la presencia de NADPH y O₂ en un proceso complejo que lleva implícito tres hidroxilaciones.

La estrona es un estrógeno que se forma a partir de la androstenediona y el estradiol se sintetiza utilizando a la testosterona como sustrato ó precursor.

La síntesis de éstas últimas hormonas se lleva a cabo en las gónadas (testículos y ovarios). La testosterona es la hormona que se produce en mayor cantidad en el testículo pues es la hormona sexual masculina.

El 17 β -estradiol es el estrógeno que se produce principalmente en el ovario. Los estrógenos se producen a partir de la aromatización de los andrógenos.

En la producción de los esteroides ováricos, están involucrados dos tipos celulares: las células de la teca que son la fuente principal de la 17 α -hidroxiprogesterona y de androstenediona, el principal andrógeno sintetizado en el ovario, y las células de la granulosa que dan origen al estradiol.

Todo el proceso involucrado en la síntesis de estrógenos se produce principalmente en las mitocondrias y el retículo endoplásmico liso (REL).

El colesterol libre proveniente de la sangre ó sintetizado del acetato vía mevalonato es transportado hacia el interior de luz mitocondrial y se le escinde la cadena lateral para formar la pregnenolona que pasa al REL donde se transformará en progesterona y finalmente se sintetizarán el resto de los esteroides (Brodie, 1983 ; Granner, 1986)(Fig. 1).

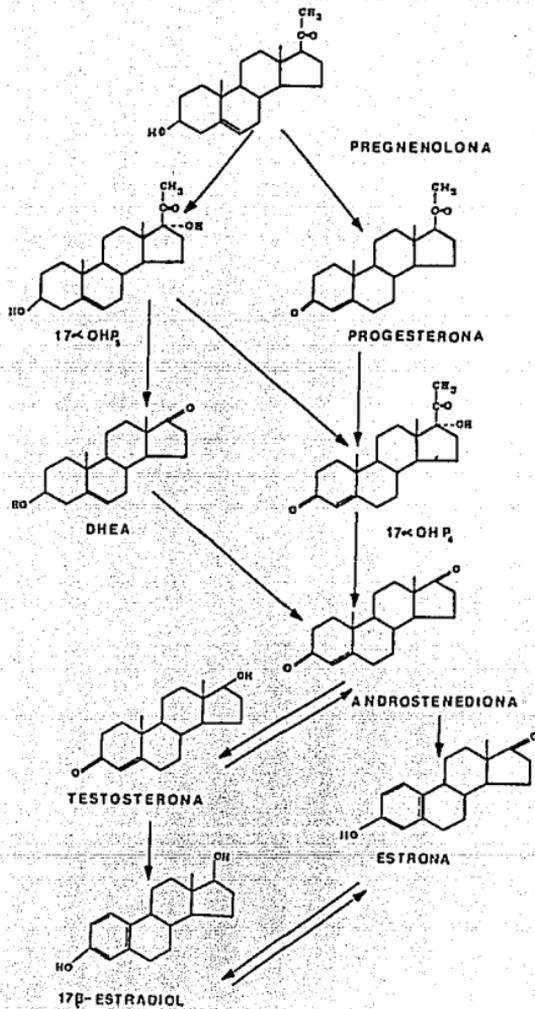


Fig.1 Biosíntesis de hormonas esteroides

OBJETIVO

El propósito que se planteó en este trabajo, fué determinar si en los embriones de bovino en los cuales el sexo gonadal no está definido (28 - 40 días de edad gestacional), existe o se manifiesta una diferenciación sexual a nivel bioquímico. Se tomará como parámetro la producción de hormonas esteroides sintetizadas por las gónadas a partir de un precursor marcado radiactivamente (androstenediona).

MATERIALES Y METODOS

Material

El material químico utilizado en el presente trabajo se obtuvo en los siguientes lugares: 4 -androstén 3,17 -diona ³H fue comprada a New England Nuclear (Boston, MA); tripsina y medio Dulbecco (DMEM) se obtuvieron en Grand Island Biological Co. (Grand Island NY). El inhibidor de tripsina, 5 α androsterona, estrona, 17 β - estradiol y testosterona fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo), y las placas de sílica gel 60 254 - sobre base de aluminio utilizadas en la cromatografía en placa fina en Merck (México).

Metodología

Se trabajó con embriones de bovino de la cepa cebú (Bos indicus), entre 1 y 3 cm de longitud CR (coronilla -rabadilla) pertenecientes al primer tercio de edad gestacional (entre 28 y 40 días post coito), mismos que fueron proporcionados por Industrial de Abastos (IDA) (Fig 2).

Se estudiaron en total 38 embriones, mismos que se colectaron 30 min después de que se sacrificaron los animales. Los embriones se depositaron en viales que contenían medio de cultivo DMEM + Albúmina al 0.1% . Aproximadamente dos horas después, en el laboratorio, se extrajo el mesonefros junto con la región gonadal y con ayuda de un microscopio de disección y agujas de punta muy fina se separó la región gonadal del mesonefros. La región gonadal de los embriones mayores de 2.0 cm se depositó en

matraces de Erlenmeyer de 10 ml los cuales contenían 1ml de tripsina al 0.25% p/v disuelta en solución salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} y se incubaron durante 10 min. en baño de agitación (90 ciclos/ min.) a 37°C .

Después de la incubación, se detuvo la actividad de la enzima agregando a los matraces inhibidor de tripsina (0.25 %) en un volumen dos veces mayor que el de la tripsina (2ml). Con ayuda de pipetas Pasteur, previamente flameadas, se disgregaron por completo las gonadas y se depositaron en tubos de centrifuga. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular adicionando medio Dulbecco - Albúmina, y nuevamente se centrifugó. Al concluir la segunda centrifugación, se tiró el sobrenadante y con 100 μl del medio se resuspendió el botón celular; la suspensión celular final se sembró en viales que contenían 900 μl de medio, 10 μl de marca ó sustrato, androstenediona marcada ^3H (0.1 μCi disuelto en 10 μl de etanol).

Las gonadas de los embriones de 2.0 cm de long. CR ó menos, unicamente se fragmentaron con ayuda de agujas de punta muy fina. En estas no se llevó a cabo disgregación celular y todos los fragmentos se sembraron de la misma manera que las gonadas mayores de 2.0 cm.

Los frascos de incubación fueron saturados con una mezcla gaseosa de 95% de aire y 5% de CO_2 ; se incubaron en baño de agitación (90 ciclos / min.) a 37°C durante una hora. Finalmente la reacción se detuvo agregando 10 ml de eter etílico frío.

Con el fin de recuperar los esteroides sintetizados en nuestra siembra, se llevaron a cabo tres extracciones con 10 ml de éter frío para un volumen total de 30 ml, agitando cada vial por separado en un vórtex después de cada adición del éter. Para separar la fase acuosa de la etérea, se congelaba la fase acuosa utilizando acetona enfriada con hielo seco, la fase etérea se volcó en viales nuevos y se evaporó utilizando el baño de agitación a 30⁰C.

Al concluirse las extracciones, para identificar a los metabolitos obtenidos se realizaron una serie de cromatografías en capa fina de sílica - gel / aluminio (TLC) (Fig 3a y 3b). Las muestras se aplicaron en la placa de la siguiente manera : primero se resuspendieron las muestras utilizando 100 µl de etanol, se tomaron alícuotas de 40 µl y se sembraron en dos placas diferentes junto con una serie de 7 muestras patrón que sirvieron como acarreadores; las muestras patrón también se sembraron por separado en la misma placa para compararlas con las muestras problema al finalizar la cromatografía. Las muestras patrón utilizadas fueron testosterona (T), androstenediona (Δ^4), androsterona (5 α), estradiol (E₂), estrona (E₁), dehidroepiandrostenediona (DHEA) y dihidrotestosterona (DHT); se utilizaron dos sistemas de solventes diferentes para llevar a cabo la separación de las muestras : diclorometano : acetato de etilo 8:2 v/v y éter etílico : hexano 3:1 v/v . Para cada sistema de solventes se utilizó una placa con las mismas muestras.

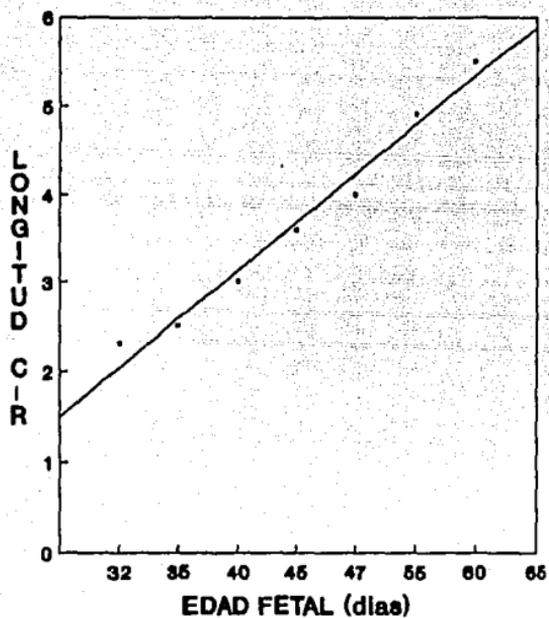
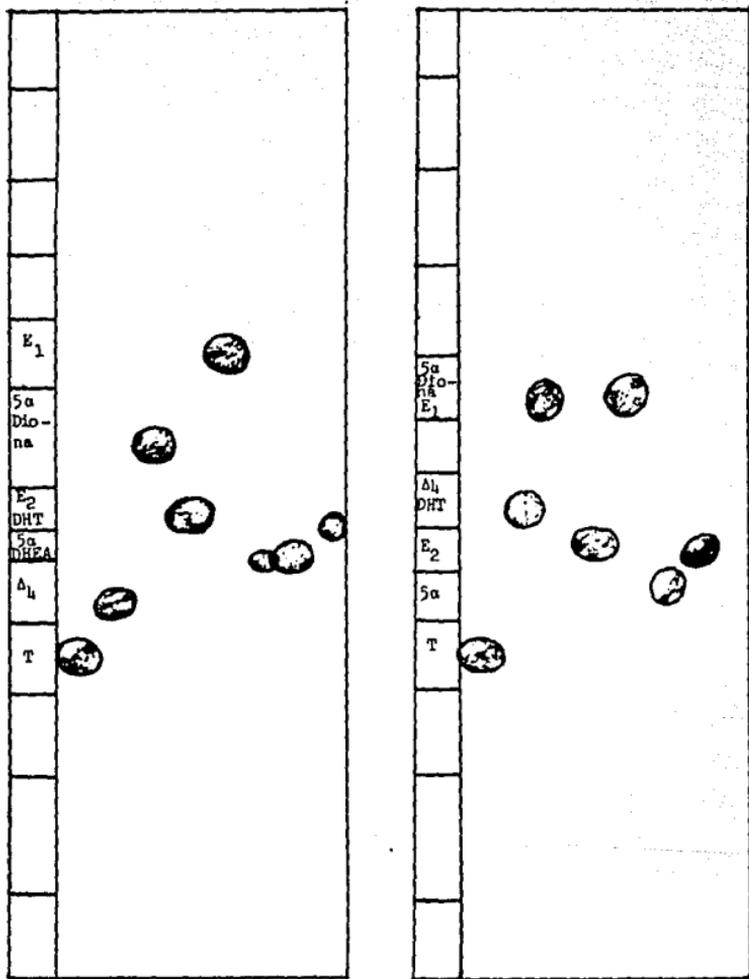


Fig.2 Relación entre la edad gestacional de fetos de bovino y la longitud C-R. Tomado de Shemesh (1983).



a

b

Fig.3 Desplazamiento de los diferentes esteroides sobre placas para cromatografía utilizando dos diferentes sistemas de solventes: a) Eter - Hexano y b) Diclorometano - Acetato de Etilo.

Después de haberse corrido la cromatografía, la placa se reveló con luz ultravioleta y se cortó la zona de las muestras problema, la zona de los esteroides patrón se reveló con una solución de ácido sulfúrico al 25% calentado a 250 °C con el fin de observar el desplazamiento de los esteroides. La región donde fueron sembradas las muestras problema se dividió en zonas que corresponden a cada compuesto y se cortaron depositando las fracciones en viales a los que se les agregaron 5 ml de líquido de centelleo para después colocarlos al espectómetro (Packard tri - carb 3255). En base a las cuentas por minuto (cpm) obtenidas, se calculó el % de transformación de las hormonas esteroides sintetizadas por cada par de gónadas. Esto se realizó de la siguiente manera:

$$\text{cpm (netas)} - (40) = \text{cpm corregidas}$$

La Σ de las cpm corregidas de todas las fracciones nos da el % de transformación total de los esteroides.

El % de transformación de cada esteroide se obtiene multiplicando x 100 las cpm de cada esteroide y dividiendo entre las cpm totales.

Simultaneamente, se realizaron los cariotipos de cada uno de los embriones con los que se trabajó. Se obtuvo el hígado de los embriones, se colocó en un matraz que contenía solución salina libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} para después disgregarlo mecánicamente a través de una malla de nylon y obtener una suspensión celular. Las células se sembraron en viales a los que se les agregó 10 ml de medio de cultivo (Dulbeco - Albúmina) dos ml de la suspensión celular y 2 μg de colchicina (ésta última se

utilizó para detener a las células en la metafase de la mitosis), los viales se agitaron suavemente y se incubaron durante dos hrs a 37°C.

Para llevar a cabo la cosecha, se resuspendió el botón celular utilizando una pipeta Pasteur, se pasó a tubos de centrifuga de 15 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min, se volcó el sobrenadante y se agregaron 4 ml de solución libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} a 37°C, se resuspendió nuevamente y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min.

El botón celular obtenido a partir de esta centrifugación fue resuspendido adicionando 3 ml de una solución hipotónica. Los tubos se incubaron a 37°C durante 30 min y después se centrifugaron a 1500 rpm por espacio de 5 min; se deshechó el sobrenadante se resuspendieron las células y se le agregaron 4 ml de fijador (metanol - ác. acético glacial 3:1).

La suspensión celular con fijador se dejó reposar 20 min para después centrifugar a 1500 r/min durante 5 min; finalmente se vierte el sobrenadante y se adicionan 3 ml de fijador, se resuspende y se guarda en el cuarto frío.

Para montar las preparaciones se utilizaron portaobjetos nuevos los cuales se introdujeron en un cristalizador que contenía ác. clorhídrico al 5% y alcohol etílico al 95%; los portaobjetos se limpiaron e introdujeron en alcohol al 70%.

A los portaobjetos limpios, se les depositaron dos gotas de suspensión celular y se flamearon sobre un mechero encendido, soplando sobre el portaobjetos para dispersar los cromosomas.

En 36 ml de agua destilada se agregaron 3 ml de Geimsa y un ml de Leishman ; la solución fué vertida en un vaso de Koplín donde previamente se habían colocado los portaobjetos que contenían los cromosomas; se dejaron durante 20 min, se sacaron los portaobjetos y se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. En esta etapa los cromosomas están listos para ser observados al microscopio.

RESULTADOS

La identificación de los cariotipos se llevó a cabo haciendo un recuento del número de cromosomas presentes en cada mitosis observada (aprox. 15 - 20 mitosis por cada caso). En el bovino el número de cromosomas es de 66 en total (64 autosomas y 2 cromosomas sexuales).

En las hembras los cromosomas sexuales son dos cromosomas X grandes y submetacéntricos fácilmente distinguibles; en los machos, los cromosomas sexuales son diferentes, el cromosoma X es submetacéntrico y el cromosoma Y acrocéntrico y pequeño.

Esto se observa claramente en las figuras 4a y 4b, donde se muestran los cariotipos de un macho y una hembra de bovino.

De los cariotipos de cada embrión estudiado, se obtuvieron los siguientes resultados: 17 embriones de un total de 38 resultaron ser machos el resto fueron hembras . Esto se aprecia en las tablas (1 y 2) en las que se indica la longitud CR correspondiente a cada individuo.

Los resultados obtenidos al cuantificar la síntesis de esteroides producidos por las gónadas, fueron separados en base al sexo cromosómico determinado por el cariotipo.

La producción de testosterona, 17β - estradiol y estrona a partir de la androstenediona ^3H se expresaron como % de transformación al final de una hora de incubación por par de gónadas.



a



b

Fig.4a Cariograma perteneciente a un macho

Fig.4b Cariograma de una hembra de bovino

Tabla 1 Porcentaje de transformación de androstenediona (A₄) a Testosterona, 17 β - estradiol y Estrona en fetos de cariotipo XY de diferentes edades gestacionales determinado por la longitud C-R..pa

CARIOTIPO MACHO				
valores corregidos				
fecha	long.C-R (cm)	Et.Ac.	Hx/Et	
		% T	% E ₂	% E ₁
16/10/89	1.10	0.17	0.1	0.00
13/09/89	1.50	0.03	0.17	0.00
30/10/89	1.50	0.03	0.00	0.00
30/10/89	1.80	3.28	0.00	0.00
30/10/89	1.80	3.28	0.00	0.00
03/07/89	2.00	5.15	0.14	0.17
10/07/89	2.10	2.18	0.00	0.07
24/07/89	2.10	0.92	0.00	0.15
25/07/89	2.10	0.18	0.00	0.57
26/07/89 A	2.20	7.65	0.00	0.24
26/07/89 B	2.20	12.23	0.00	0.23
17/07/89	2.70	52.50	0.00	0.86
03/07/89	2.80	41.89	0.00	0.18
03/07/89	2.80	24.15	0.00	0.11
03/07/89	3.40	80.49	0.00	0.12
03/07/89	3.40	66.41	0.00	0.05
03/07/89	3.40	65.09	0.00	0.01
03/07/89	3.40	77.85	0.00	0.01

Tabla 2 Valores del porcentaje de transformación de A₄ a Testosterona, 17 β - estradiol y Estrona en fetos con cariotipo hembra de diferentes edades gestacionales determinadas a partir de la long. C-R.

CARIOTIPO HEMBRA				
valores corregidos				
fecha	long. C-R (cm)	Et.Ac.	Hx/Et	
		% T	% E ₂	% E ₁
24/07/89	1.00	0.60	0.43	0.11
26/07/89	1.00	0.00	0.13	0.10
30/10/89	1.20	0.00	0.02	0.00
13/09/89	1.40	0.00	0.50	0.00
30/10/89	1.40	0.01	0.00	0.00
24/07/89	1.50	0.00	0.46	0.00
13/09/89	1.60	0.00	1.33	0.00
26/07/89	1.70	0.04	0.00	0.14
30/10/89	1.70	0.02	0.00	0.00
30/08/89	2.20	0.03	1.26	0.32
13/09/89	2.20	0.30	1.56	0.36
30/10/89 A	2.30	0.10	3.95	4.35
30/10/89 B	2.30	0.12	2.62	1.81
10/07/89	2.40	0.27	0.00	2.22
24/07/89	2.40	0.33	0.45	1.60
24/07/89	2.50	0.65	0.17	6.41
30/10/89 A	2.50	0.33	1.21	1.02
30/10/89 B	2.50	0.25	4.47	2.68
03/07/89	2.80	0.86	0.00	8.88
30/10/89	2.90	0.45	9.66	7.80
03/07/89	3.20	0.82	3.41	16.64

Dentro del grupo de embriones cuyo cariotipo pertenece al sexo femenino, observamos que la producción de estradiol y estrona se inicia a edades gestacionales muy tempranas (35 días de gestación aprox., 2.2 cm de long CR), aumentando ésta producción progresivamente conforme aumenta la edad (fig. 5 y 6). En estos mismos embriones se observa que la síntesis de testosterona posee valores por debajo del 1% (fig 7). Sin embargo, el patrón de incremento es muy similar al observado para E_1 y E_2 (Fig.5 y 6).

En los machos, la hormona que predomina es la testosterona. Los valores de esta hormona pueden apreciarse en la fig. 8 . Se observa que a partir de los 2.0 cm. de long. CR hay una síntesis de testosterona que aumenta notablemente para llegar al 80.4% en gónadas de 3.4 cm.

La síntesis de testosterona es menor al 1% en las gónadas de los embriones de menos de 1.5 cm de long. CR. En estos fetos la secreción de E_1 y E_2 es prácticamente indetectable (menos del 0.5%) y no se observa ninguna tendencia de incremento con la edad por lo que suponemos que son sólo variaciones alrededor del 0 .

Cuando se compara la secreción de testosterona en los machos con la de estrógenos en las hembras, se ve que en éstas la actividad enzimática es menor pero no deja de ser igualmente importante (fig. 8 y 9).

Los porcentajes de conversión se calcularon en los dos sistemas de solventes que utilizamos y los mismos fueron coincidentes para T y E_2 . Sin embargo, a fines de la

presentación , los valores de 17β - estradiol se obtuvieron del s.s. eter : hexano debido a que en este sistema el RF de 17β estradiol es mayor que el de la androstenediona, lo que permite descartar una contaminación a partir del precursor.

CARIOTIPO XX

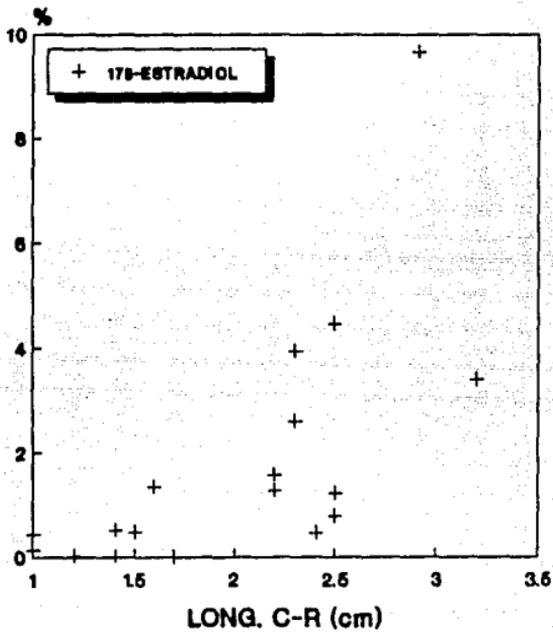


Fig.5 síntesis de 17β - estradiol graficada en relación a la long. C-R en gónadas indiferenciadas con cariotipo femenino. Los resultados están expresados en porcentaje de transformación.

CARIOTIPO XX

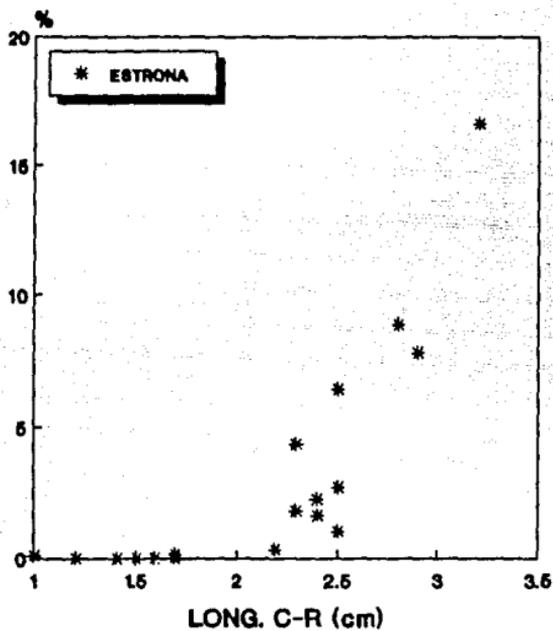


Fig.6 Síntesis de Estrona expresada en porcentaje de transformación en función de la long. C-R en gónadas indiferenciadas con cariotipo hembra.

CARIOTIPO XX

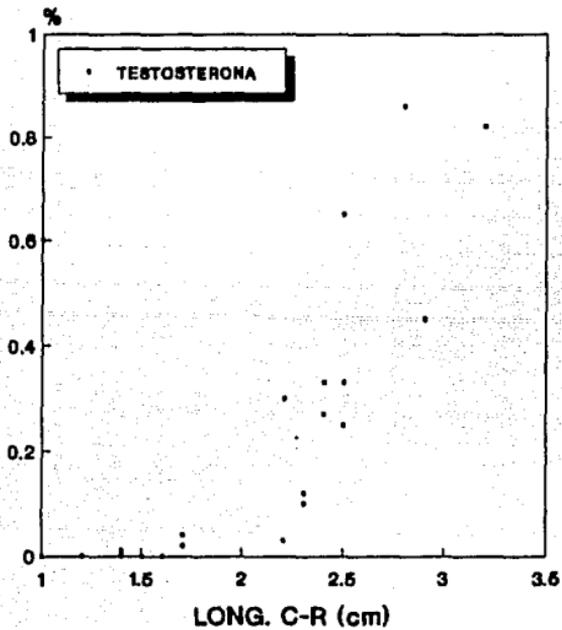


Fig.7 Porcentaje de transformación de Testosterona representado en las ordenadas en relación con la long. C-R de las gónadas cuyo cariotipo es hembra.

CARIOTIPO XY

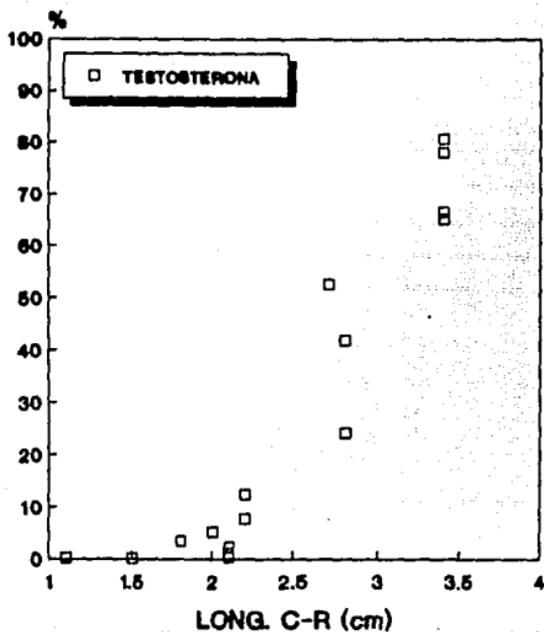


Fig.8 Síntesis de Testosterona en gónadas con cariotipo macho. Los resultados se expresan en porcentaje de transformación (ordenadas) en relación con la long. C-R (absisas).

CARIOTIPO XX

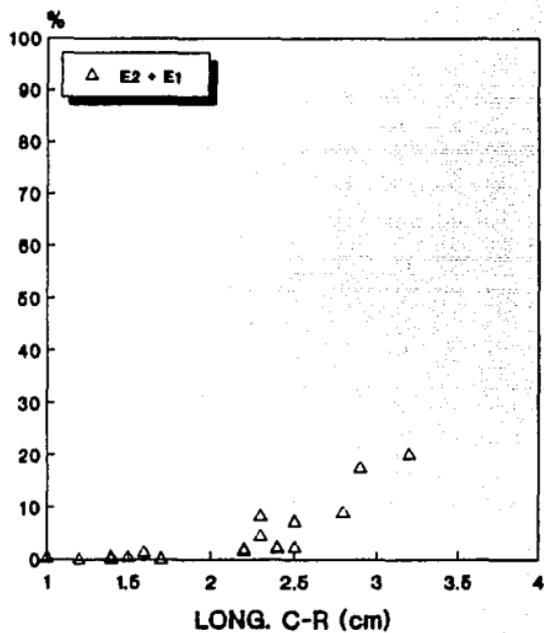


Fig.9 Porcentaje de transformación de 17 β - estradiol y Estrona en gónadas con cariotipo XX.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizó como sustrato un andrógeno marcado , la androstenediona (Δ^4 3 H) a partir de la cuál se sintetizaron 3 diferentes esteroides: testosterona, estrona y 17β -estradiol. Esto nos permite determinar que existe actividad enzimática de aromatasa y de 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) en las gónadas indiferenciadas de bovino.

Tomamos como indice de la actividad de aromatasa el porcentaje de transformación de androstenediona marcada a 17β -estradiol y estrona, tanto en machos como en hembras. Mientras que la síntesis de testosterona nos indica la actividad de la 17β - HSD. Aparte de estos compuestos, no se detectaron otros compuestos marcados, por lo que se descarta una actividad medible de otras enzimas, como la 5α reductasa por ejemplo.

La detección de síntesis de hormonas se llevó a cabo a través de un método de seguimiento isotópico debido a que las cantidades producidas eran muy pequeñas y por lo tanto era necesario utilizar una metodología que permitiera cuantificar en el orden de fentomoles.

Las técnicas de radioinmunoanálisis y la de formación de agua tritiada podrían ser otras alternativas de trabajo; sin embargo, presentan inconvenientes pues son metodologías menos sensibles y por lo tanto no permitirían cuantificar los productos sintetizados en nuestro modelo.

Shemesh (1983), muestra en su trabajo que en el ovario de bovino comienza la producción de esteroides (17β - estradiol)

a los 40 días de edad gestacional, esto corresponde a fetos cuyo tamaño se encuentra entre 3.3 - 3.5 cm de long. CR. En el testículo fetal, la producción de testosterona se da a partir de los 3.3 cm hasta los 12.4 cm de long. CR (40 - 95 días de gestación aprox.).

Analizando nuestros resultados, podemos decir que la síntesis de hormonas esteroides en gónadas indiferenciadas de bovino existe desde antes de la edad establecida por Shemesh. En las gónadas pertenecientes a embriones de 2.3 cm de long. CR se cuantificó tanto una síntesis de testosterona en machos como de estradiol y estrona en hembras.

Raeside y cols. (1972 -1973), demostraron que en el cerdo, la gónada es capaz de secretar andrógenos en etapas muy tempranas de su desarrollo, antes de que ocurra la diferenciación gonadal. Esto lo demostró en gonadas de 2.0 cm (longitud C-R), las cuales cultivó en presencia de explantes de prostata de rata, como bioindicador de actividad androgenica. Las gonadas femeninas se identificaron por la ausencia de actividad androgenica. En gónadas (machos y hembras) de 1.5 y 2.0 cm de long. CR se mostró a nivel histoquímico que existe actividad de 17β y $\Delta^5 - 3\beta$ hidroxiesteroide deshidrogenasa .

En 1976, este mismo autor encontró que las gónadas cuyo tamaño es de 2.0 a 5.2 cm long. CR (25 - 40 días de gestación), sintetizan testosterona si se cultivan in vitro. Los resultados de estos experimentos los obtuvieron a partir de radioinmunoanálisis.

Baille y cols. (1964, 1966), encontraron resultados similares a los obtenidos por Raeside a nivel histoquímico, pero en fetos de humano cuyo tamaño era de 1.4cm de long. CR.

En lo referente a la diferenciación del sexo, los resultados que se obtuvieron permiten distinguir las gónadas de machos y hembras de acuerdo a la presencia de testosterona, estradiol y estrona. Las gónadas diferenciadas en las hembras, mostraron una síntesis mayor de estradiol y estrona en comparación con la síntesis de testosterona por lo que podemos decir que la actividad de aromatasa es un índice muy precoz de diferenciación del ovario aún antes de que se distinga cualquier característica morfológica. En las hembras se activan simultáneamente la 17β -HSD y la aromatasa pero esta última es más activa aún cuando los niveles de 17β -estradiol son en promedio un 50% menor que estrona; la síntesis de testosterona es inferior al 1%.

Algo importante que se observa en los resultados es que en dos casos de gónadas femeninas, no se cuantificó síntesis de estradiol; sin embargo, la síntesis de estrona es alta. En los mismos casos, hay valores bajos en la síntesis de testosterona pero dentro de lo esperado, esto hace difícil explicar el porqué de estos resultados, pues tanto la aromatasa como 17β -HSD están presentes.

En los machos la enzima que se activa precozmente durante la diferenciación gonadal es la 17β -HSD. En este caso, no hay actividad de aromatasa. Es de hacer notar que en el caso de un embrión del fenotipo masculino de 1.8 cm CR ya se detecta actividad de 17β -HSD. Esto constituye el fenómeno más precoz de

diferenciación sexual , ya que en esa edad estamos en la etapa de cresta gonadal y bastante antes de los 3 cm de long CR que es la edad en que se empieza a reconocer el testículo desde el punto de vista morfológico (Shemesh, 1983).

El aumento de la actividad de la 17β -HSD en los machos, es mucho más marcada que la de aromatasa en las hembras y posiblemente se inicia ligeramente antes, aunque esto simplemente puede deberse a que por su mayor intensidad se detecta previamente. Podemos decir coincidiendo con George y Wilson que prácticamente la actividad enzimática es simultánea en ambos sexos, siendo la presencia de aromatasa lo distintivo de las hembras.

Nuestros resultados indican actividad enzimática pero no puede demostrarse secreción de hormonas , sin embargo no se puede descartar que se produzcan hormonas a niveles indetectables para nuestros métodos . Nuestros resultados coinciden con los estudios histoquímicos en otras especies (Raeside 1972) que demuestran la presencia de enzimas desde etapas indiferenciadas del desarrollo gonadal.

Queda aún abierta la interrogante acerca de cual es el papel de los esteroides sexuales en la diferenciación gonadal. Sin embargo el hecho de que la activación de enzimas que intervienen en su biosíntesis sea un fenómeno muy precoz en el desarrollo gonadal nos permite seguir considerando que la formación de un ovario ó de un testículo pueda depender de la producción de estrógenos en la hembra y de testosterona en el macho.

BIBLIOGRAFIA

Ahluwalia, B., Williams, J., y Verma, P. (1974) Effect of human chorionic gonadotrophin on testosterone secretion by fetal human testis in organ culture. J. Endocrinol. 60: 179 - 185.

Allen, B. (1904) The embryonic development of the ovary and testis in mammals. Am. J. Anat.3: 88 - 153.

Baillie, A.H., y Griffiths, K. (1964) 3 β hydroxysteroid deshydrogenase activity in the mouse Leydig cell. J. Endocrinol. 29: 9 - 17.

Baillie, A.H., Ferguson, M.M., y Hart, D.Mck. (1966) Evidence of steroid metabolism and possible biosynthesis in the human genital ridge mesenchyme. J. Clin. Endocrinol. 26: 738 - 741.

Bloch, E. (1964) Metabolism of 4 - (14 C)- progesterone by human fetal testis and ovaries. Endocrinology 37: 74 - 78.

Bouin, P., y AnceI, P. (1903) Recherches sur les cellules interstitielles du testicule des mammiferes. Arch. Zool. Exp. Gen. 1: 437 -523.

Bokhout, C.G. (1945) The development of the guinea pig ovary from sexual differentiation to maturity. J. Morphol. 77: 233 - 263.

Brodie, A.M.H. (1983) Biosynthesis, metabolism and secretion of ovarian steroid hormones. In: The ovary. (Editado por Giovan B. Serra.) Raven Press (New York) pp 1- 16.

Burns, R.K. (1961) Role of hormones in the differentiation of sex. In: Sex and Internal Secretions. edited by W.C. Young. Baltimore, MD : Williams and Wilkins, pp 76 - 160.

Byskov, A.G., Skakkebak, N.E., Stafanger, G., y Peters, H. (1977) Influence of ovarian surface epithelium and rate ovarii on follicle formation. J. Anat. 123: 77 - 86.

Dofour, J.J. (1967) Histochemical studies on steroid dehydrogenase reactions in the fetus and placenta of the pig. M. Sc. Thesis, University of Guelp, Canadá.

Franchi, L.L., Mandl, A.M., y Zuckerman, S. (1962) The development of the ovary and the process of oogenesis. In: The ovary; edited by S. Zuckerman. New York: Academic, 1: 1 - 88.

Fredrick, W.G., Evan, R.S., Leon, M., y Jean, D.W. (1979) Studies on the regulation of the on set of steroid hormone biosynthesis in fetal rabbit gonads. Endocrinology. 105: 110 - 1106.

Gartler, S.M., y Andina, R.I. (1976) Mammalian X chromosomes inactivation. In: Advances in human genetics. H. Harris. y K. Hirschhron. New York. London, Plenum Press., 7:99.

George, F.W., Milewich, L., y Wilson, J.D. (1978) Oestrogen content of the embryonic rabbit ovary. *Nature* 274: 172.

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

George, F.W., y Wilson, J.D. (1988) Sex determination and differentiation. *The Physiology Reproduction*; Raven Press, LTD., New York., pp. 3 - 26.

Gier, H.T., y Marion, G.B. (1970) Development of the mammalian testis. In the testis (Editado por A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. Vandemark). *Academic Press, New York.* pp. 1 - 46.

Granner, D.K. (1986) Hormonas de la glándula suprarrenal. En *Bioquímica de Harper*. Ed. El manual moderno. S.A. de C.V. México, D.F. 41: 579 - 595.

Gropp, A., y Ohno. (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.

Jirasek, J.E. (1976) Principles of reproductive embryology. In: *Disorders of sexual differentiation*, edited by J.L. Simpson, pp. 51 - 110. *Academic Press, New York.*

Jirasek, J.E. (1968) Morphological and histochemical analysis of the development of adrenals and gonads in man. In: *Progress in Endocrinology*. Amsterdam: Excerpta Med., pp 1100 - 1107.

- Jirasek, J.E. (1971) Development of the genital system and male pseudohermaphroditism. Baltimore MD: Johns Hopkins Univ. Press.
- Jost, A. (1953) Problems in fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. Recent Prog. Horm. Res., 8: 379 - 418.
- Jost, A. (1961) The role of fetal hormones in prenatal development. Harvey Lect.,55: 201 - 226.
- Jost, A. (1972) A new look at the mechanisms controlling sexual differentiation in mammals. Johns Hopkins Med. J., 130: 38- 53.
- Jost, A., y Magre, S. (1984) Testicular development phases and dual hormonal control of sexual organogenesis. In: Sexual differentiation: Basic and Clinical Aspects, edited by M. Serio et al.,pp. 1 - 15. Raven Press, New York.
- Lamprecht, S.A. Kohen, F., Ausher, J., Zor, U., y Lindner, H.R. (1976) Hormonal stimulation of oestradiol 17 β release from the rat ovary during early postnatal development. J. Endocr. 68: 343 - 344.
- Lyon, M.F. (1974) Mechanism and evolutionary origins of variable X - chromosome activity in mammals. Proc. R. Soc. London Ser., 187:243.
- Mackay, D.G., Hertig, A.T., Adams, E.C. y Danziger, S. (1953) : Histochemical observation on the germ cells of the human embryos. Anat. Rec., 117: 201 - 220.

Mauleon, P., Bezard, J., y Terqui, M. (1977) Very early and transient 17 β -estradiol secretion by fetal sheep ovary. In vitro study. Ann. Biol. Bioch. Biophys. 17: 399 - 401.

Milewich, L., George, F.W., y Wilson, J.D. (1977) Oestrogen formation by the ovary of the rabbit embryo. Endocrinology. 100: 187.

Moon, Y.S., y Raeside, J.I. (1972) Histochemical studies on hydrosteroid dehydrogenase activity of fetal pig testes. Biol. Reprod. 7: 278 - 287.

Moon, Y.S., y Hardy, M.H. (1973) the early differentiation of the testis and interstitial cells in the fetal pig and its duplication in organ culture. Am. J. Anat. 138: 253 - 268.

Picon, R. Pelloux, M.C., Benhaim, A., y Gloague, F. (1985) Conversion of androgen to estrogen by the rat fetal and neonatal female gonad: effects of dcAMP and FSH. J. Steroid Biochem. 23: 995 - 1000.

Pinkerton, J.H.M., Mackay, D.G., Adams, E.C., y Hertig, A.T. (1961) Development of the human ovary. A study using histochemical technics. Obstet. Gynecol. 18: 152 - 181.

Sanyal, M.K., y Villet, C.A. (1977) Stimulation of androgen biosynthesis in rat fetal testes in vitro by gonadotrophins. Biol. Reprod. 16: 174 - 181.

Schindler, A.E., y Friedrich, E. (1975) Endokrinologie. 65: 72 - 79.

Shemesh, M., y Hansel, W. (1983) hormone production by the early bovine embryo. J. Steroid Biochem. 19: 979 - 983.

Stern, C. (1957) The problem of complet Y - linkage in man. Am. J. Human Genet., 9 :147 - 165.

Terada, N., Kuroda, H., Namiki, M., Kitamura, Y., y Matsumoto, K. (1984) Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. J. Steroid Biochem. 20: 741 - 745.

Vogel, F., y Motulsky, A.G. (1979) Human Genetics. Springer Verlag, Berlin.

Waldeyer, W. (1980) Eierstock und Ei. Leipzig: Engelmann.

Witschi, J.S.D., Faiman, C., y Reyes, F. (1931) studies on sex differentiation and sex determination in anphibians. V. Range of the cortex - medulla antagonism in parabiotic twins of Ranidae and Hiladae. J. Exp. Zool. 58: 113 - 145.

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

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