

52A

293



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIFERENCIACION Y REGULACION DE LA ACTIVIDAD
ENDOCRINA DEL OVARIO XY.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
SILVIA GUERRERO RAMIREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1994



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.



EXAMENE DE LICENCIATURA EN
FAB. DE BOLSAS DE PAPEL

Jurado asignado

Presidente	M. en C. Raúl Genaro Aguilar Caballero
Vocal	Dra. María Irma Villalpando-Fierro
Secretario	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
1er. suplente	Prof. Arturo Victor Rosales Olivares
2do. suplente	Profr. Manuel Miranda Anaya

Asesor del tema

María Irma Villalpando-Fierro

Sustentante

Silvia Guerrero Ramírez

Este trabajo se realizó en el departamento de biología celular en el laboratorio de embriología molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María Irma Villalpando-Fierro.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a DGAPA por el donativo IN20-4193 otorgado a la Dra. María Irma Villalpando Fierro que sirvió para apoyar parcialmente el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. María Irma Villalpando Fierro por su confianza y valiosa asesoría, parte sustancial de este manuscrito.

Al Biólogo Horacio Villafán Monroy, por su valioso apoyo en la cuantificación del AMP cíclico y por la ayuda en la técnica de dot hybridization.

Al fotógrafo Jorge Juárez Hernández, por las fotografías de los dibujos y tablas de este trabajo.

Al dibujante Rafael Avila Maturano, por su ayuda en la elaboración de los dibujos y esquemas de esta tesis.

Al pasante de Q.F.B David Pérez Vantine por su apoyo en la realización de la técnica de dot hibridization.

DEDICATORIA

A Dios

Esperanza y Fortaleza Mía

A mi Familia

Por Brindarme su Apoyo y Amor en Todos los Momentos de mi Vida

A mis Maestros

Por sus Conocimientos Compartidos

A mis Amigos y Compañeros

Que aún sin Nombrarlos, Están Conmigo

Al Q.F.B. Luis V. Peredo Cervantes

Por Contar Siempre con su Valiosa Ayuda

El Principio de la Sabiduría es el Temor a Dios

Proverbio 1.7

ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	3
II.	INTRODUCCIÓN.....	4
1.	Determinación del sexo genético.....	4
1.1.	Aspectos genéticos y características del ratón B6.Y ^{POS}	5
1.2.	Desarrollo y diferenciación sexual de la gónada.....	5-6
1.3.	Colonización de la cresta genital.....	7-8
2.	Gónada indiferenciada.....	8
2.1	Diferenciación del testículo.....	8-9
2.2.	Diferenciación del ovario.....	9-10
2.3.	Meiosis.....	10-11
3.	Foliculogénesis.....	11-12
3. 1.	Formación del tejido esteroideogénico.....	13-14
3.2.	Papel de las gonadotropinas en el ovario.....	14-16
3.3.	Expresión de filamentos intermediarios en gónadas postnatales.....	17
	a). Citoqueratinas.....	17-18
	b). Vimentina.....	18-19
4.	Expresión de laminina.....	19
	a). Gónada Indiferenciada.....	19
	b). Ovario.....	20
	c). Testículo.....	20

III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
IV.	OBJETIVOS.....	22
V.	MATERIAL Y MÉTODOS	
1.	Identificación del sexo genético.....	23
	a). Prehibridación.....	23
	b). Hibridación.....	24
1.1	Determinación de la actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.....	25-26
1.2.	Inmunocitoquímica.....	27
1.3	Distribución de laminina.....	28
	a). Fijación.....	28
	b). Deshidratación e inclusión.....	28
	c). Corte.....	28
	d). Inmunodetección.....	29
2.	Cuantificación de AMP cíclico	29
2.1.	Preparación de la curva estándar.....	30
2.2.	Radioinmunoensayo.....	30-32
VI.	RESULTADOS	
1.	Ubicación del tejido esteroidogénico.....	33- 34
1.1.	Distribución de laminina en el ovario.....	35-36
1.2	Determinación de vimentina.....	37-38
1.3	Expresión de citoqueratina 8 y 19.....	39-41

2.	Cuantificación de AMP cíclico.....	40-44
VII.	DISCUSIÓN.....	45-52
VIII.	CONCLUSIONES.....	53
IX.	REFERENCIAS.....	54-59
X.	APÉNDICE.....	60-62

I. RESUMEN

En la presente investigación se estudió el tejido productor de hormonas esteroides en el ovario infantil XY a los 14 días postpartum (d.p.p.), por histoquímica para detectar la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD). Asimismo, se cuantificó los niveles de AMP cíclico (AMPc) endógeno en el ovario infantil XY a los 14 y 35 d.p.p., por radioinmunoensayo (RIA). Se determinó a los 14 d.p.p. la expresión de filamentos intermediarios para queratina 8, 19, vimentina y la distribución de laminina (componente de la unidad folicular), con técnicas inmunocitoquímicas. La actividad de la enzima 3β -HSD se detectó en el ovario XY de las células foliculares y tecales en la región cortical, y se observó que las células de la zona medular están fuertemente marcadas. No se observaron diferencias en la producción de AMPc en el ovario XY a los 14 y 35 d.p.p., comparado con el ovario XX. La queratina 19 se localizó en las células intersticiales y foliculares de la corteza. La distribución de queratina 8 se detectó en el intersticio y estuvo ausente de los cordones epiteliales de la médula. La vimentina se encuentra distribuida alrededor de los folículos en la corteza y en los cordones estériles medulares. Se observó que la laminina esta delimitando los folículos de la corteza y los cordones medulares estériles en el ovario XY. El cromosoma "Y" no parece influir en la organización del tejido esteroideogénico del ovario infantil.

I. INTRODUCCION

La diferenciación sexual es una serie de eventos morfo- fisiológicos que se inician en la etapa embrionaria y continúan en la vida postnatal, parte de ésta comprende la determinación del sexo genético, la diferenciación sexual de la gónada y la diferenciación interna y externa de los genitales; lo cual determina las características fenotípicas y funcionales en los individuos en la vida adulta.

1. Determinación del sexo genético

La determinación del sexo genético se establece durante la fertilización. En el ovario de la hembra normalmente se desarrollan gametos (ovocitos) con un sólo tipo de cromosoma sexual "X", mientras que el testículo del macho produce gametos (espermatozoides) con dos tipos diferentes de cromosomas "X" e "Y". De acuerdo al tipo de espermatozoide que fertilice al ovocito los individuos serán "XX" (hembra) o "XY" (machos) Austin y col., (1972). Células germinales y fertilización. La Prensa Médica Mexicana.

Se sabe que el cromosoma "Y" es el que determina el sexo genético debido a que éste contiene un gen presente en una copia en las células somáticas que induce la diferenciación sexual del testículo (Berta y col., 1990 y Koopman y col., 1991) el cual es conocido como SRY en el humano y su homólogo en otros vertebrados como Sry (Tiersch y col., 1991). En el ovario hasta el presente no se ha demostrado que existan genes que participen en este proceso.

1.1 Aspectos genéticos y características del ratón B6Y^{POS}

Se ha visto que la presencia del cromosoma "Y" induce la diferenciación testicular, sin embargo, cuando el cromosoma "Y" del ratón Mus musculus poschiavinus se cruza con la cepa Mus musculus musculus, la mitad de la progenie XY (B6Y^{POS}) desarrolla ovarios bilaterales y genitales femeninos internos y externos (Nagamine y col., 1987 a, b). Esto sugiere que el cromosoma "Y" necesita interactuar con algún gen presente en los autosoma(s) para inducir la diferenciación testicular completa (Eicher y Col., 1982; Eicher y Washburn, 1983, 1986). La hembra XY tiene un ciclo estral irregular y no puede llevar a término la preñez (Taketo y colaboradores, 1989). Asimismo, produce niveles bajos de esteroides gonadales como progesterona, testosterona y 17 β -estradiol (Villalpando y col., 1993). La hipófisis de la hembra XY aparentemente es normal ya que el trasplante de ovarios XX en hembras XY no impide la ciclicidad en ésta. Sin embargo, los ovarios XY transplantados a hembras XX, no responden a la acción de las gonadotropinas, lo cual sugiere que el problema de esterilidad y la falta de ciclicidad parece residir en el ovario XY.

1.2. Desarrollo y diferenciación sexual de la gónada

En la morfogénesis de la gónada se observan tres etapas: la primera comprende la colonización del primordio gonadal o cresta genital por las células

germinales primordiales (CGP), la segunda corresponde a la organización del primordio gonadal en gónada indiferenciada y en la tercera se lleva a cabo la diferenciación sexual de la gónada indiferenciada en ovarios y testículos (Merchant-Larios, 1976; Merchant-Larios y Centeno, 1979 y Merchant-Larios, 1984).

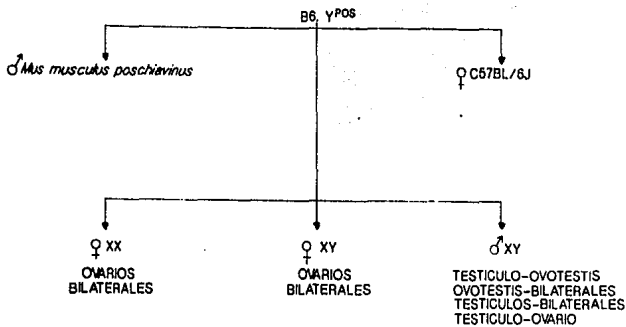


Figura. 1. Se observan los genotipos y la diferenciación sexual de los individuos que se obtienen de la cruce entre el macho *Mus musculus poschiavinus* y la hembra *Mus musculus musculus* o C57BL/6J.

1.3.Colonización de la cresta genital

La diferenciación de cada una de las líneas celulares en los vertebrados se realiza durante el desarrollo embrionario en diferentes tiempos. Las células germinales primordiales (CGP) precursoras de los gametos son determinadas muy temprano. Estas se detectan a los 7.5 y 8 días de gestación (d.g) en el extremo caudal del endodermo del saco vitelino y en la base del alantoides (Chiquone,1954). Las CGP tienen características propias que las distinguen de las demás células, como la presencia de núcleos grandes, nucleolos prominentes, granulos de glucogéno y enzimas como la fosfatasa alcalina y estereasas (Células Germinales y Fertilización, Austin y Short, 1972. La prensa Médica Mexicana). A los 10 d.g. en la región ventral del mesonefros se observa la formación de la cresta genital como un engrosamiento del epitelio celómico, las CGP colonizan esta región por un movimiento pasivo y otro activo. En el primero estas células son translocadas del endodermo del intestino primitivo posterior al interior del embrión. A los 10 d.g las CGP migran del intestino por el mesenterio dorsal hasta las crestas genitales (Merchant, 1984). Para explicar el mecanismo a través del cual las CGP llegan a la cresta genital Wistchi en 1951, sugirió que las CGP eran guiadas por un gradiente de una sustancia sintetizada por las células del primordio gonadal. Investigaciones realizadas en las aves apoyan la existencia de un factor quimiotáctico (Kuwana y col., 1986). Por otra parte, se ha propuesto que la fibronectina (glicoproteína de la matriz

extracelular) es empleada por las CGP como sustrato en la migración (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986).

2. Gónada indiferenciada

La diferenciación sexual del ovario y del testículo se inicia con la gónada indiferenciada, esta etapa es común a ambos sexos, es decir es independiente del sexo genético del individuo. La gónada indiferenciada es un órgano bilateral localizado en la región ventral del mesonefros y está formada por tejido epitelial, mesenquimático y las CGP (Brambell, 1927). La etapa de gónada indiferenciada morfológicamente corresponde a la de la colonización de la cresta genital por las CGP y a la proliferación de las células somáticas (precursoras de las células foliculares y de las células intersticiales) las cuales originan los cordones sexuales y el tejido estromático que constituyen los precursores del ovario y del testículo (Merchant-Larios, 1976; Merchant-Larios, 1984).

2.1. Diferenciación del testículo

La diferenciación morfológica del testículo se inicia con la separación del epitelio celómico por invasión de mesénquima y vasos sanguíneos procedentes del mesonefros. Los cordones sexuales están formados por dos tipos celulares: las células de Sertoli y las CGP precursoras de los gametos. Las células que se encuentran alrededor de los cordones se diferencian para formar

varios tipos celulares como células mioideas, endoteliales, fibroblastos y de Leydig (Merchant-Larios, 1976). Estas últimas producen testosterona que induce el desarrollo de los conductos de Wolff y dan origen a los genitales internos. La formación de los genitales externos requieren de la transformación de la testosterona a 5α dihidrotestosterona. Las células de Sertoli secretan la hormona inhibidora de los conductos Müllermanos (Behringer y col., 1990; Magre y col., 1980 y Josso y Picard, 1986). Estas células forman un epitelio de tipo columnar y emiten prolongaciones citoplásmicas que rodean a las CGP. Las células germinales en el testículo infantil reciben el nombre de proespermatogonias (Hillscher and Hillscher, 1978) y se mantienen en un periodo de reposo hasta la pubertad. Las CGP poseen puentes citoplásmicos que se originan por una división llamada citogénesis incompleta, éstos puentes son y desaparecen cuando las espermatogonias se diferencian en espermatozoides (Gondos, 1984).

2.2. Diferenciación del ovario

El ovario cambia poco comparado con la gónada indiferenciada, a los 12.5 d.g., se observa que éste crece debido a la proliferación de células somáticas y germinales. Su diferenciación morfológica es posterior a la del testículo. A los 14 d.g el ovario inicia la meiosis, las ovogonias presentan puentes citoplásmicos que son muy importantes en la sincronización de éste proceso

(Gondos, 1984) y éstos desaparecen con la formación de los folículos primarios. En esta fase los ovocitos se encuentran en la fase de cigoteno y paquiteno, en ésta última se observan los complejos sinaptinémicos formados por el acoplamiento de los cromosomas homólogos, (Células Germinales y Fertilización, Austin y Short, 1972. La prensa Médica Mexicana) durante estas etapas ocurre la degeneración de algunos ovocitos. Se ha sugerido que el inicio de la meiosis esta controlada por un factor que proviene del mesonefros o riñón embrionario (Byskov,1978). Algunos investigadores han cuestionado la existencia de éste (Upadhay y Zamboni, 1982) y proponen que la meiosis es un proceso espontáneo que se da en un momento crítico del desarrollo. En el ratón ocurren tres eventos importantes después del nacimiento.

- Detención de la meiosis en la etapa del diploteno de la profase de la primera división meiótica.
- La foliculogénesis o formación de folículos.
- Diferenciación del tejido esteroideogénico.

2.3. Meiosis

En el ratón la meiosis empieza después de la diferenciación sexual gonadal, debido a lo cual se ha definido como meiosis inmediata (Byskov, 1978). Se ha visto que entre los 13 y 14 d.g. se observan en los núcleos de los ovocitos las primeras etapas de la profase de la primera división meiótica (Brambell, 1927). En

el ratón en la etapa del diploteno de la profase de la primera división meiótica, se lleva a cabo el entrecruzamiento de los cromosomas homólogos. Byskov en 1978 sugirió que existe un factor inhibidor de la meiosis el cual es secretado por las células foliculares. Sin embargo, se necesitan evidencias para apoyar o refutar esta hipótesis.

3. Foliculogénesis

Una vez iniciada la meiosis comienza la foliculogénesis que se define como la formación de folículos en el ovario de los mamíferos. En este proceso los ovocitos son separados por células epiteliales precursoras de las células foliculares y una lámina basal (Merchant-Larios 1976 y 1984). La individualización y formación de los folículos se lleva a cabo a partir de los cordones sexuales ováricos u ovigeros (Brambell, 1927). La foliculogénesis se ha dividido en tres etapas (Merchant-Larios y Chimal -Monroy, 1989).

- Etapa I.

Los ovocitos están agrupados en contacto directo entre sí en el interior de los cordones sexuales.

- Etapa II

- Los ovocitos son separados dentro de los cordones por células epiteliales.

- Etapa III.

Los ovocitos y las células epiteliales prefoliculares rodeadas por una lámina basal son separadas por células del estroma (mesenquimáticas) y este proceso es dependiente de ovocitos. La ausencia de éstos impide que los folículos se formen en el ovario (Merchant, 1976; Merchant-Larios y col., 1979). Se ha propuesto que la foliculogénesis es un problema de interacción entre los ovocitos y las células somáticas para que se lleve a cabo la compartimentalización de los cordones sexuales (Gruenwald, 1942 y Paranko, 1987).

Durante el desarrollo del ovario al ir creciendo los folículos primordiales se diferencian varios tipos celulares, células mesenquimáticas tipo fibroblasto, éstas dan origen a las células intersticiales o de la teca; la primera en diferenciarse es la teca interna y posteriormente se desarrolla la teca externa (Turner y Bagnara, 1971; Guraya, 1973). La mayor parte de los folículos que sufren atresia parecen jugar un papel importante en la formación del tejido intersticial del ovario, conocido como glándula intersticial. La atresia folicular puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo de un individuo. En el caso del ovario algunas células que rodean al epitelio folicular se hipertrofian y forman acúmulos celulares en el estroma. Se ha planteado que esta glándula se forma en el momento que los ovocitos mueren y las células de la teca se hipertrofian y producen fundamentalmente androgénos (Turner y Bagnara, 1971; Guraya, 1973 y Erickson, 1989).

3. 1. Formación del tejido esteroideogénico

En el ratón la formación del tejido esteroideogénico depende de la formación de folículos y por consiguiente de la presencia de células germinales (Merchant, 1976). Las primeras células que poseen características de células esteroideogénicas se detectan pocos días después del nacimiento (Pehleman y Lombard, 1978). Estudios realizados en ratas tratadas por busulfán sugieren que la atresia folicular, es de gran importancia para la diferenciación del tejido intersticial esteroideogénico (Merchant, 1976 y Merchant y col., 1979). En los roedores se ha visto que en las primeras etapas de la vida postnatal, el estroma se caracteriza por presentar células mesenquimáticas, algunas se diferencian hacia células precursoras de la glándula intersticial (Turner y Bagara, 1971). Al inicio de la vida postnatal ésta se conoce como glándula intersticial primaria y en etapas posteriores del desarrollo del ovario es desplazada por otro tipo de tejido intersticial al que se le conoce como tejido intersticial secundario. En el ratón se ha sugerido que éste se origina a partir de células de la teca interna de folículos atrésicos (Mori y Matsumoto, 1970; Guraya, 1973; Merchant, 1979; Merchant y Centeno, 1981). Se ha demostrado que la diferenciación así como la función de las células que integran el tejido intersticial glandular del ovario y del testículo, están relacionadas con la producción de esteroides y dependen de la acción de las gonadotropinas; debido a que su acción la ejercen sobre las gónadas. Estas

hormonas son la hormona estimulante del folículo (FSH) y la luteinizante (LH) (Peluso, 1989).

3.2. Papel de las gonadotropinas

La FSH y LH juegan un papel importante en la función ovárica y testicular y se sabe que éstas son producidas en células de la hipófisis anterior (Peluso, 1989). El órgano blanco de la FSH en el ovario son las células de la granulosa (Richards y col., 1976), mientras que la LH tiene varios sitios de acción como; la teca interna, células intersticiales secundarias y células de la granulosa de folículos preovulatorios (Erickson y col., 1989). Se ha demostrado que la teca y las células intersticiales del ovario producen andrógenos (Erickson y col., 1989) y las células de la granulosa convierten los andrógenos a estrógenos a través del sistema enzimático aromatasas (Richards, y col., 1976).

Asimismo, se ha visto que las gonadotropinas ejercen su acción a través de receptores (Hsueh y col., 1977 y Sokka y Huhtaniemi, 1990) localizados en las membranas de las células blanco. Se ha planteado que el complejo hormona-receptor se une a la subunidad alfa de la proteína G quien a su vez activa el sistema adenil ciclasa. Estas enzimas convierten el trifosfato de adenosina en AMP cíclico, también llamado segundo mensajero quien estimula a las proteínas cinasas, las cuales inducen la síntesis de enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides (Gathei y col., 1993).

Por otra parte, se sabe que los esteroides son producidos en el ovario a partir del colesterol obtenido de las proteínas de baja densidad, de gotas de grasa almacenadas como ésteres de colesterol en las células esteroideogénicas y de la síntesis de novo. Los esteroides gonadales pueden ser sintetizados a partir del colesterol a través de dos vías metabólicas denominadas la vía de los delta 4 y delta 5 respectivamente, figura 2. Cada una de éstas culminan en la formación de andrógenos y estrógenos en el ovario, (Rawm, 1989. Bioquímica Tomo I.).

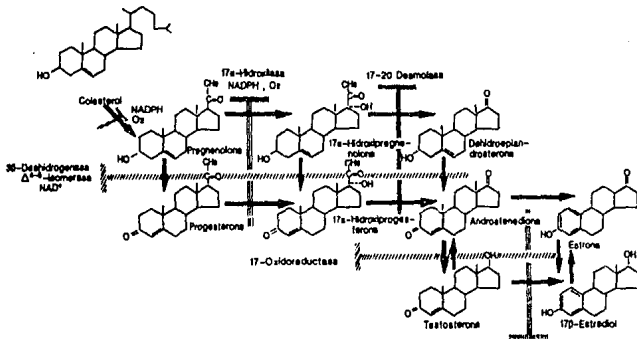


Figura. 2. Biosíntesis de andrógenos y estrógenos en el ovario de los mamíferos a partir de la vía de los delta 4 y delta 5. Modificado a partir de Rawm, 1989. Bioquímica tomo I.

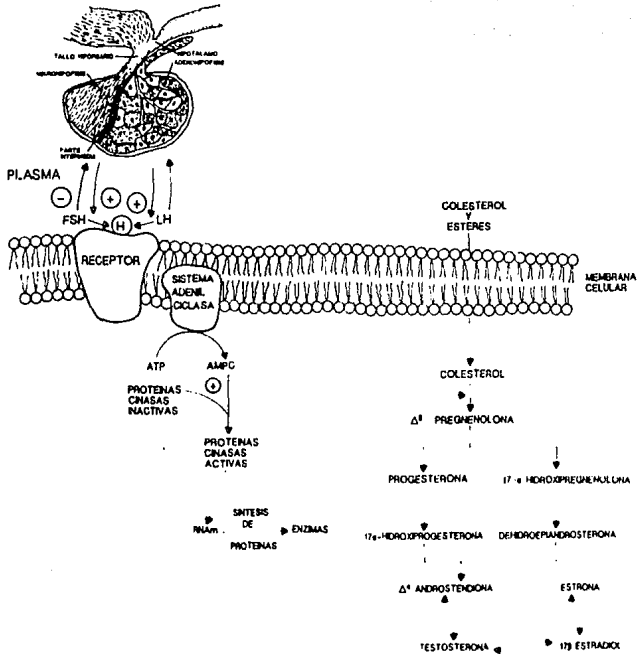


Figura. 3. Mecanismo de acción de las gonadotropinas propuesto a través de la activación del AMP cíclico y la estimulación del sistema de las proteínas cinasas en las células esteroidogénicas. Modificado a partir de Bioquímica Tomo I, Rawn, 1989.

3.3.. Expresión de filamentos intermediarios en gónadas embrionarias y postnatales.

Los filamentos intermediarios son proteínas que se han utilizado como marcadores para identificar el origen endodérmico, mesodérmico y ectodérmico de los tejidos y se clasifican en cuatro diferentes grupos (Van Mujien y col., 1987).

- Citoqueratinas

Marcador específico para células de origen epitelial

- Vimentina

Presente en células mesenquimáticas

- Desmina

Se localiza en células musculares

- Neurofilamentos

Se ubican en células de tejido nervioso

a). Citoqueratinas.

Las citoqueratinas (CKs) son la clase más grande de proteínas que forman los filamentos intermediarios (FI) y representa un grupo muy importante de 20 proteínas diferentes que se dividen en dos grandes grupos de acuerdo a sus propiedades bioquímicas e inmunológicas (Franke y col., 1981). Su peso

molecular varía desde 40,000 a 55, 000. Las citoqueratinas se dividen en dos grandes grupos.

- TIPO I. Comprende a las citoqueratinas ácidas y está representada por las CK-9 a la CK-20.
- TIPO II. Agrupa las citoqueratinas básicas o neutras, entre las cuales están las CK-1 a la CK-8

La expresión de un tipo de CKs es necesaria para la formación de la estructura tetramérica que es la unidad básica de las CKs (Franke, 1981). En la embriogénesis las CKs son las primeras proteínas de los FI que se detectan (Stosiek y col., 1990). Se ha observado su presencia a partir de la etapa de 4 y 8 células (Lehntonen y col., 1988). La expresión de las CKs 8,18 y 19 varía en la embriogénesis hasta la segunda semana después del nacimiento. En la rata las CKs 8 y 19 son detectadas en la gónada indiferenciada y en los cordones ovígeros (ováricos) en el folículo primario.

En el testículo las CKs 8, 18 y 19 se localizan más tarde a los 13 d.g., en los cordones sexuales. Sin embargo, la expresión de la CK 19 disminuye y no se observa después de los 18.5 a 19.5 d.g. (Fridmacher y col., 1992).

b). Vimentina

Después de las citoqueratinas, existe un segundo grupo de FI en importancia que es la vimentina, cuyo peso molecular es 57,000 (Osborn y col.,1984). Durante

el desarrollo embrionario la vimentina se expresa en las células del mesodermo diferenciándose tempranamente a los 8.d.g. en el ratón (Franke, 1978). En el testículo adulto las células de Sertoli contienen F1 a vimentina, pero no citoqueratinas (Franke, 1981).

4. Expresión de laminina durante el desarrollo de la gónada

La laminina es una glicoproteína que se encuentra constituida por tres cadenas polipeptídicas la A, B1 y B2 unidas por puentes disulfuro, cuyo peso molecular son de 400, 000, 215,000 y 205,000 respectivamente. Su composición ácida y grupos amino la hacen ser altamente inmunogénica y normalmente está presente en la membrana basal de los tejidos separando diferentes tipos celulares o compartimentos epiteliales (Timpl y col., 1979; Timpl y Dziadek; Martin y Timpl, 1987 y Klein y col., 1988).

a). Gónada indiferenciada

La laminina aparentemente se expresa en la gónada indiferenciada, en esta etapa se encuentra distribuida entre las células de este órgano y está ausente de las células del tejido mesenquimático del mesonefros. Sin embargo, se encuentra presente bordeando la superficie y en la membrana basal alrededor del conducto de Wolff y los túbulos mesonéricos (Fridmacher y col., 1992).

b). Ovario

En los ovarios de rata a los 13 d.g. no se visualiza ninguna organización epitelial y no se observa ninguna membrana basal continua. Sin embargo, la laminina se encuentra distribuída a los 14.5 d.g en toda la gónada y los cordones ovígeros se encuentran delimitados por esta glicoproteína. A los 18 d.g. y después del nacimiento se marca totalmente la membrana basal del ovario (Fridmacher y col., 1992).

c). Testículo

A los 13.5 d.g. los túbulos seminíferos de rata son negativos a laminina y fibronectina, pero a los 14 d.g y después del nacimiento éstos se encuentran bien marcados por estas glicoproteínas (Fridmacher y col., 1992).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cromosoma "Y" se asocia con la diferenciación sexual del testículo y en ausencia de éste se diferencia un ovario. Sin embargo, cuando se cruza la cepa del ratón Mus musculus poschiavinus con la Mus musculus musculus o C57 BL/6J la mitad de la progenie XY (B6.Y^{POS}) desarrolla ovarios bilaterales y genitales femeninos internos y externos. El desarrollo del ovario XY es similar al ovario XX (control) hasta los 16 d.g. A los 17 d.g. el ovario XY empieza a perder los ovocitos en la región medular. La pérdida prenatal de éstos impide que se desarrollen folículos en esta región y únicamente los ovocitos de la corteza sobreviven y más tarde forman folículos. Por otro lado, hasta el presente no se ha demostrado cuales son los mecanismos intragonadales y extragonadales que inician la diferenciación de las células esteroidogénicas durante el desarrollo normal del ovario. Se ha planteado que la interacción entre los ovocitos y las células somáticas (foliculares y de la teca) es necesaria para el desarrollo normal del tejido esteroidogénico. La ausencia de los ovocitos en el área central o medular del ovario "XY" induce una diferenciación anormal del tejido productor de hormonas esteroides, de manera que la actividad de la enzima 3 β -HSD en el ovario XY se localiza en los cordones medulares estériles. Sin embargo, no sabemos si el tipo celular positivo a la 3 β -HSD es de origen epitelial o mesenquimático. Por otra parte, la diferenciación anormal del tejido esteroidogénico, afecta la síntesis de esteroides gonadales y por consiguiente los niveles de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol son bajas. No sabemos si la baja producción de esteroides gonadales se deba a que el AMP cíclico se produzca en menor cantidad en los ovarios infantiles a los 14 d.p.p. y púberes (35 d.p.p.) de la hembra XY. Con base en los antecedentes y razones expuestas anteriormente se plantearon las siguientes objetivos.

IV. OBJETIVOS

- 1. Determinar la localización de la actividad de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en el ovario infantil de la hembra XY a los 14 d.p.p.**
- 2. Detectar con técnicas inmunológicas la distribución de laminina y la expresión de filamentos intermediarios en células epiteliales y mesenquimáticas para identificar el tipo celular positivo a la enzima 3β -HSD a los 14 d.p.p.**
- 3. Cuantificar los niveles endógenos de AMP cíclico en el ovario de la hembra XY a los 14 y 35 d.p.p.**

V. MATERIAL Y METODOS

1. Identificación del sexo genético

a). Prehibridación

La identificación de las hembras XX normales de las XY se realizó con la prueba de hibridación puntual. Se obtuvieron 3 μ l de sangre de la cola de ratones B6Y^{POS} de 14 y 35 d.p.p, se colocaron en la membrana (Gene Screen Plus Membrane de Dupont) y se horneó 2 horas a 80 °C al vacío. La membrana se desnaturizó en NaOH 0.3 M y NaCl 0.5 N 1 hora, se neutralizó en buffer tris 1 M pH 7.0 a temperatura ambiente y se prehibridó en 10 ml de solución de hibridación. La hibridación se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Nishioka, 1968 y 1986, ver descripción abajo. Todas las soluciones empleadas en este estudio se describen en el apéndice (página 60).

b). Hibridación

La sonda se marcó con ³²P-dCTP por el método de secuencias al azar de acuerdo al protocolo descrito en el Kit de (GIBCO-BRL). La sonda se desnaturizó 10 minutos a 90 °C y se enfrió a 4 °C. Asimismo, se desnaturizó esperma de salmón a una concentración de 10 mg/ml e inmediatamente se puso en hielo en escarcha. Se agregaron 1x10⁶ cuentas por minuto de la sonda marcada y el esperma de salmón a 10 ml de la solución de hibridación y se incubó a 42 °C 18 horas. Se lavó con SSC 1X y SDS al 0.5% 60 °C, 20 minutos 2

veces. La membrana se expuso a una película X-O-MAT de Kodak en un cassette con una placa intensificadora y se incubó a -70°C 3 días. Se reveló con un revelador D-76 de Kodak 5 minutos, se enjuagó 5 minutos, se fijó y se enjuagó con agua corriente. Únicamente los individuos que tienen las secuencias repetidas del cromosoma "Y" fueron positivas a esta prueba.

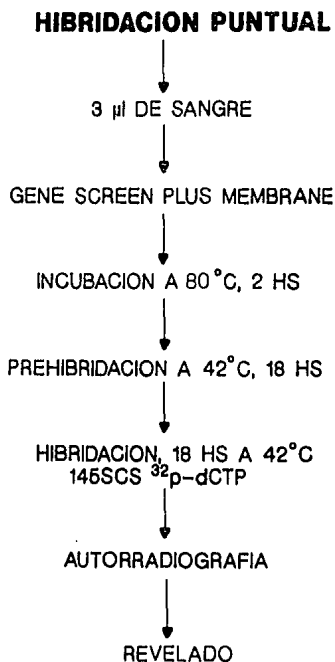


Figura 4. Diagrama que muestra la técnica empleada para determinar el sexo genético en las hembras XY.

1.1. Determinación de la actividad de la enzima 3 β -HSD.

La ubicación del tejido esteroideogénico se hizo de acuerdo a la técnica empleada por Levy y colaboradores en 1959. Se aislaron gónadas de ratones B6Y^{POS} de 12-14 d.p.p., se incluyeron en tissue tek, se guardaron a -20 °C. Se obtuvieron cortes de 10-12 μ m en un criostato de American Optical CRIO-CUT (Microtome), se montaron en laminillas tratadas con vectabón y se guardaron a -20 °C. Se preparó un medio de incubación para localizar el tejido esteroideogénico que contiene un cofactor como la β -Nicotinamida Adenina Dinucleotido (NAD⁺), el colorante azul de tetrazolio (NBT) y el andrógeno que se emplea como sustrato para la enzima. Se emplearon cortes para el control de la reacción utilizando la solución anterior sin la hormona. Los cortes se incubaron 1 hora a 37 °C, se lavaron con agua destilada brevemente, se fijaron con formalina neutra y se enjuagaron tres veces con PBS 0.05M pH 7.4, 10 minutos en cada cambio. Los cortes se montaron en glicerol, se observaron y se fotografiaron en un microscopio Nikon modelo HFX-II A. La localización del tejido productor de hormonas esteroides se lleva a cabo a través de una reacción de oxidoreducción en la que la enzima 3 β -HSD deshidrogena el anillo "A" de la posición 3 del ciclopentanoperhidrofenantreno y lo transfiere al NAD⁺, éste a su vez se oxida y se lo dona al NBT quien al aceptarlo se reduce y forma un precipitado morado insoluble en las células esteroideogénicas (figura 5).

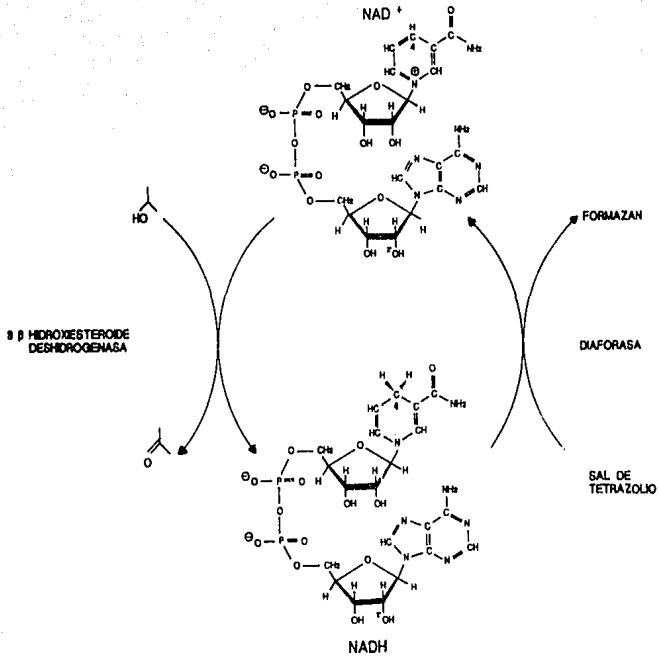


Figura. 5. Esquema que muestra la reacción histoquímica de oxido reducción que se empleó para detectar la actividad de la enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

1.2. Inmuncitoquímica de filamentos intermediarios

la detección de filamentos intermediarios se realizó de acuerdo al protocolo empleado por Fridmacher y col., en (1992) con modificaciones. Se aislaron gónadas de ratones B6Y^{POS} de 14 d.p.p. y se incluyeron en tissue-tek, se congelaron en nitrógeno líquido -70 °C y se guardaron a -20 °C, 18 horas. Se obtuvieron cortes de 10 µm en un criostato modelo American Optical Crio-Cut (Microtome), se montaron en laminillas tratadas con vectabón y se almacenaron a -20 °C. Las laminillas se dejaron 2 horas a temperatura ambiente y después se hidrataron con PBS 0.05M y NaCl 0.9% pH 7.3, 10 minutos. Posteriormente se eliminó el amortiguador y se les agregó el fijador respectivo (acetona absoluta para queratina 19 y vimentina, y acetona al 50% en etanol para queratina 8), se fijaron a -20 °C , 10 minutos. Se enjuagaron cuatro veces con PBS 5 minutos en cada cambio. Inmediatamente se incubaron con tritón al 1 % en amortiguador 20 minutos a temperatura ambiente. Después se eliminó el exceso y se incubó con albúmina al 6% en PBS, 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con el anticuerpo primario para queratina 19, 1:25, queratina 8,1:25 y vimentina 1:15, 18 horas a °C. Los cortes se lavaron con PBS 0,05 M pH 7.4 cuatro veces, 10 minutos en cada cambio y se incubaron con el anticuerpo secundario rodaminado o fluoresceinado 1:100 en albúmina al 6% en PBS, 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Las laminillas se lavaron cuatro veces 10

minutos en cada cambio con PBS al 0.05M pH 7.3, se montaron con glicerol pH 8.7 , se observaron y fotografiaron en un microscopio Nikon modelo HFX-II A.

1.3. Distribución de laminina

La inmunodetección de laminina se realizó de acuerdo al método descrito por Timpl y Dziadek (1986) con ligeras modificaciones.

a). Fijación

Se aislaron gónadas de ratón B6Y^{POS} de 14 d.p.p., se fijaron durante 4 horas a 4 °C con fijador de ácido pícrico-formaldehído. El tejido se enjuagó 10 minutos con PBS y se dejó en sacarosa al 7 % en PBS toda la noche a 4 °C.

b). Deshidratación

El tejido se lavó con buffer fosfatos 0.1 M, pH 7.4 y se deshidrató con polietilenglicol (PEG) de peso molecular (PM) 400. A partir de éste se prepararon soluciones al 25%, 50%, 75% y 95% en agua destilada y el tejido se deshidrató 30 minutos a temperatura ambiente en cada una de éstas. Posteriormente las muestras se pasaron a PEG de PM 1000, se deshidrató 60 minutos, se realizaron 4 cambios. El tejido se puso en PEG de PM 1450, 20 minutos.

c). Inclusión y corte

Los ovarios se incluyeron en PEG de PM 1450 en moldes de aluminio y se almacenaron 4C. Posteriormente se obtuvieron cortes de 10 μ en un microtomo de parafina.

d). Inmunodetección

Los cortes se enjuagaron con agua destilada y se pasaron a microcápsulas para realizar la inmunocitoquímica por flotación. El tejido se enjuagó tres veces con PBS 0.05 M, pH 7.4, 10 minutos en cada cambio y se incubó con tritón 0.2 % 15 minutos. Inmediatamente se incubó con metanol al 50% en PBS y peróxido de hidrógeno al 0.3 % y 30 minutos. Después se enjuagó con amortiguador y se agregó albúmina al 4% en PBS . Se incubó con el anticuerpo antilaminina 1:1000 18 horas a 4 °C. Los cortes se lavaron tres veces con amortiguador , 10 minutos en cada cambio. Posteriormente se incubó con un anticuerpo biotinilado 1:200 con suero normal de cabra, se enjuagaron con PBS 4 veces, 5 minutos en cada cambio. El tejido se incubó con diaminobencidina tetraclorada y peróxido de hidrógeno al 0.3%, 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El tejido se lavó cuatro veces en PBS, 10 minutos en cada cambio. Los cortes se montaron en glicerol pH 7.4, se observaron y fotografiaron en un microscopio Nikon Modelo HFX-IIA.

2. Cuantificación de AMP cíclico

La extracción y cuantificación de los niveles de AMPc se realizaron de acuerdo al protocolo publicado por Steiner y col., (1972, 1979). Se aislaron gónadas de 14 y 35 d.p.p. del ratón B6Y^{POS}, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C en un ultracongelador. El tejido se homogenizó con ácido tricloroacético al 6% a 4 °C las muestras se centrifugaron a 5000 g 30 minutos a 4 °C en una centrifuga GS-GR de Beckman. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se lavó cuatro veces con 5 volúmenes de éter dietílico saturado con agua y el precipitado se desechó. El extracto acuoso se liofilizó en una liofilizadora en 50 militorrs a 60 °C, (figura 3).

2.1. Preparación de la curva estándar

Se prepararon soluciones estándares frescas de 2 a 128 fmol, por diluciones seriadas en tubos de polipropileno y las muestras se resuspendieron en 10 ml de buffer de acetatos al 0.05 M pH 5.8.

2.2. Radioinmunoensayo.

Los niveles de AMPc se cuantificaron de acuerdo a la técnica descrita por Stainer y Col., (1972,1979). Se tomaron 500 µl de las muestras resuspendidas y de los estándares e inmediatamente se agregaron 25 µl del reactivo de acetilación a todos los tubos y se mezclaron en el vortex. Se tomaron dos

exceso de radioactividad. La radiactividad se cuantificó en un contador de centelleo GAMA modelo 5500 B de Beckman.

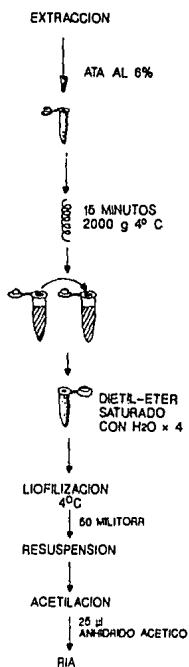


Figura 6. Esquema que resume el método empleado para la extracción de AMP cíclico.

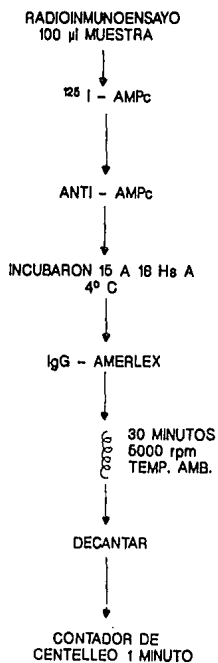


Figura. 7. Técnica de doble inmunodetección utilizada en la cuantificación de AMP cíclico endógeno en los ovarios infantiles y prepúberes de la hembra XY.

VI. RESULTADOS

1. Ubicación del tejido esteroideogénico

En el ovario XX a los 14 d.p.p., la distribución de la enzima 3 β -HSD se detectó en las células foliculares y de la teca de los folículos en diferentes etapas de desarrollo en todo el ovario y se observó que las células de la teca están más marcadas (figura 8a). En el ovario XY la actividad de la enzima fue moderada en las células foliculares y en las de la teca de la región cortical. Sin embargo, la reacción es más fuerte en las células epiteliales y las de la teca de los cordones medulares (figura 8b).

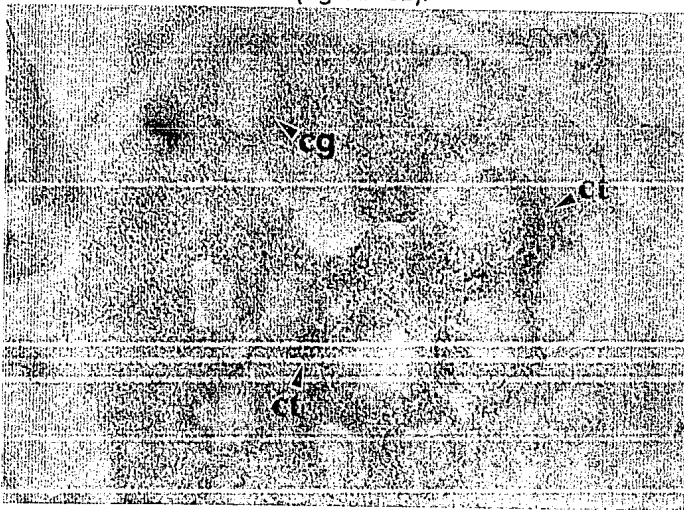


Figura . 8a. Corte transversal de un ovario XX (control) de 14 d.p.p. Las cabezas de flecha indican la localización de los gránulos de formazán en las células de la teca (ct) y de la granulosa (c.g). 100 X.

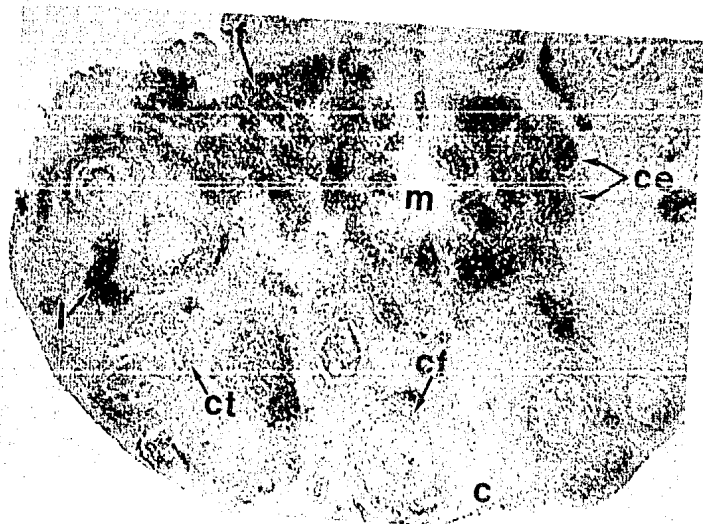


Figura. 8b. Corte transversal de un ovario XY de 14 d.p.p., se observa que la actividad de la enzima es débil en las células de la teca (ct), foliculares (cf) y en el intersticio (I) de los folículos ubicados en la corteza (c). Mientras que en la zona medular (m) el depósito de formazán (f) es muy fuerte en los cordones estériles (ce). 100X.

1.1 Distribución de laminina en el ovario

En el ovario XX a los 14 d.p.p., la laminina se encuentra separando las células foliculares y de la teca en los folículos, en diversas etapas de desarrollo en todo el ovario (figura 9a). En el ovario XY de la misma edad esta glicoproteína está delimitando los folículos en diferentes etapas de desarrollo ubicados en la corteza y alrededor de los cordones medulares estériles de diferente tamaño que constituyen esta región (figura 9b).

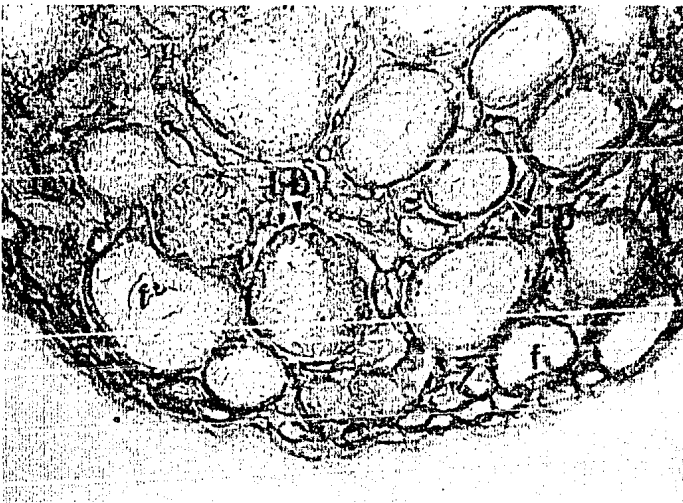


Figura. 9a. Corte transversal de un ovario XX de 14 d.p.p., las cabezas de flecha muestran la laminina rodeando a los folículos (f) en diferentes etapas del desarrollo. En algunos de ellos la lamina basal (Lb) esta teñida parcialmente. 200 X.

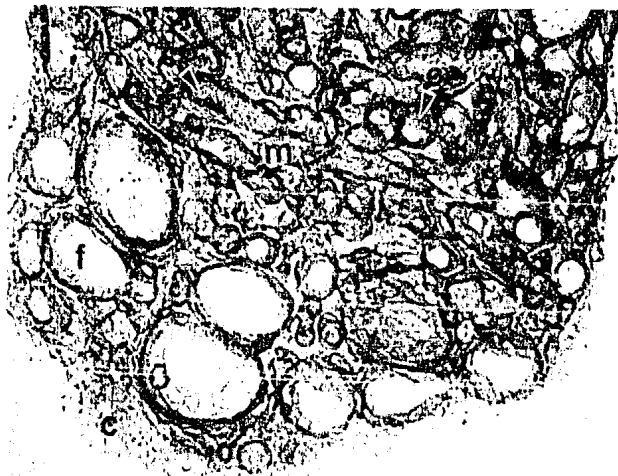


Figura. 9b. Corte transversal de ovario XY de 14 d.p.p, se observa la laminina localizada alrededor de los folículos (f) en la corteza (c). La cabezas de flechas indican la localización de la laminina en los cordones estériles (ce) de la médula (m).

1.2. Determinación de vimentina

En el ovario XX a los 14 d.p.p., la vimentina se localizó alrededor de las células de la teca y en el intersticio (figura 10a). En el ovario XY este filamento se ubica en las células de la teca de la corteza y en algunas células de los cordones estériles medulares, algunos de éstos están más marcados. Tanto las células foliculares de la corteza como las epiteliales que integran los cordones estériles son negativas. (figura 10 b).

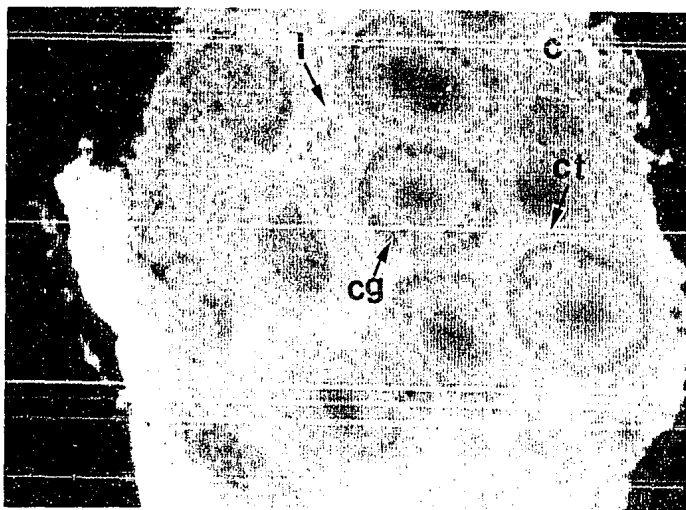


Figura . 10 a. En el ovario XX a los 14 d.p.p., la vimentina se expresa en el área de la corteza (c) en las células de la teca (ct), intersticiales (l). Las células de la granulosa (cg) son negativas. 200 X.

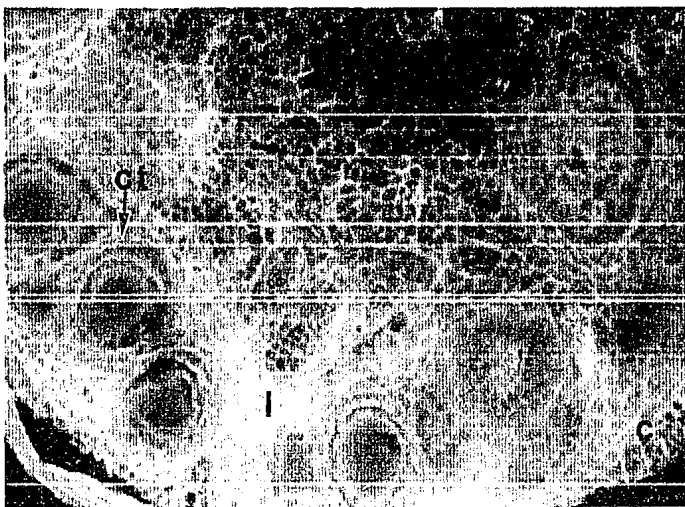


Figura. 10b. Se muestra la localización de la vimentina en el ovario XY a los 14 d.p.p. en las células de la teca (ct), en el intersticio (l) en la corteza (c) y alrededor de algunos cordones de la médula (m). 200 X.

1.3. Expresión de citoqueratina 8 y 19

La expresión de citoqueratina 8 se localizó en el ovario XX control a los 14 d.p.p., en el intersticio y en las células foliculares proximales al área donde se ubica al ovocito (figura 11a). En el ovario XY la expresión de la citoqueratina 8 se encuentra alrededor de las células de la teca en el intersticio; las células epiteliales que forman los cordones estériles son negativas. Sin embargo, algunas células foliculares se observa una reacción débil con esta tinción (figura 11b).

La queratina 19 se localizó en el ovario XX en las células de la teca fuertemente marcadas y así como en las células foliculares cercanas al ovocito. (figura 12a). En el ovario XY este filamento se expresa en las células de la teca y de los folículos de la corteza y en las células epiteliales en forma moderada. En los cordones medulares del ovario XY se observa poca reacción. Sin embargo, algunos de éstos están fuertemente marcados (12b).

2. Cuantificación de AMPcíclico

No se encontraron diferencias en la producción de AMPc endógeno del ovario XX y XY a los 14 d.p.p. y 35 d.p.p. Los datos fueron analizados con la prueba estadística de T de student.

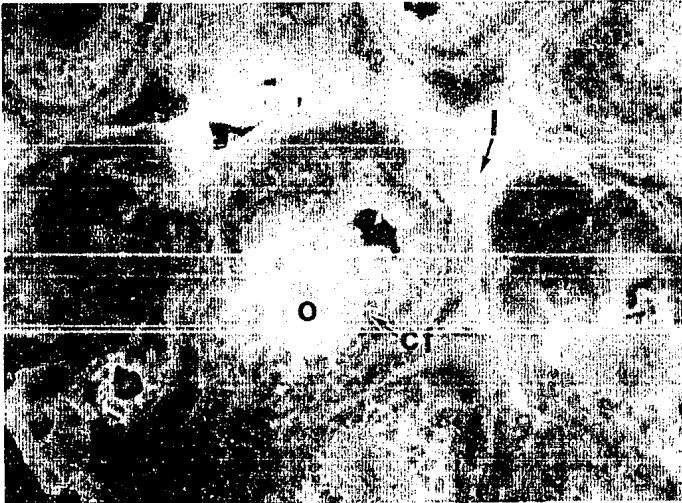


Figura. 11a. La expresión de la citoqueratina 8, en el ovario XX a los 14 d.p.p., se localiza en el intersticio (I) y las células foliculares (cf) más cercanas al ovocito (o). están fuertemente marcadas. 200X.

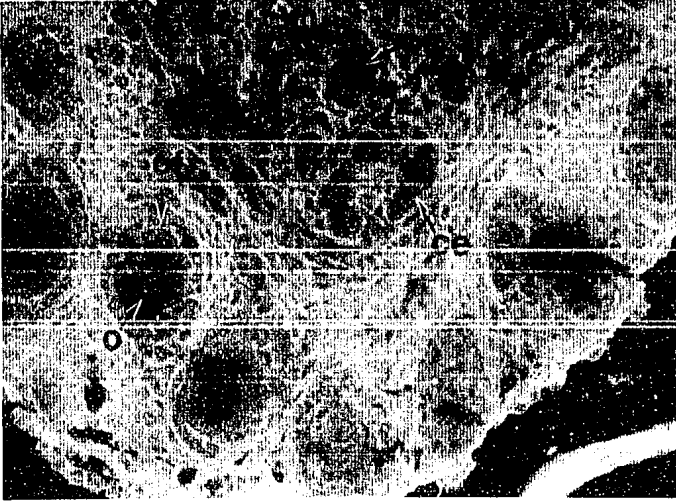


Figura. 11b. El ovario XY a los 14 d.p.p, expresa la citoqueratina 8 en las células de la teca (ct), en el intersticio y en las células foliculares (cf) cercanas al ovocito (o) en la corteza (c). En la región medular (m) la citoqueratina 8 se haya dispuesta alrededor de los cordones estériles (ce) y las células epiteliales localizadas en éstos son negativas. 200X.

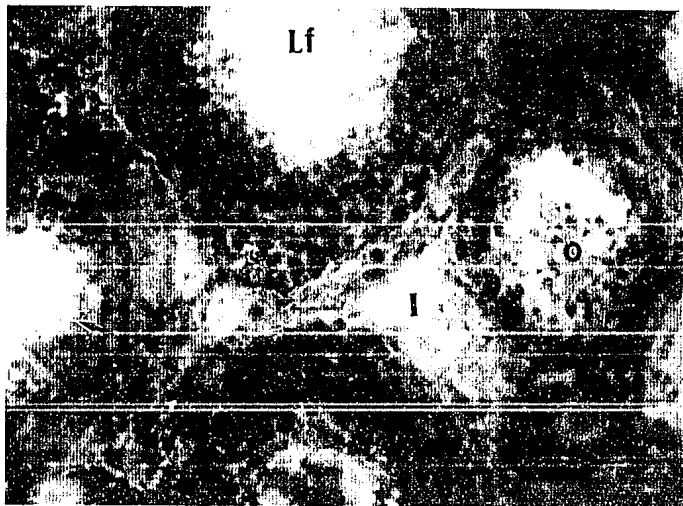


Figura .12a. En el ovario XX a los 14 d.p.p., la queratina 19 se encuentra distribuída en el intersticio (I) y en las células foliculares (cf) que se ubican cerca del ovocito (o) están muy marcadas. Además la positividad a este filamento se aprecia en el líquido folicular (Lf). 200X

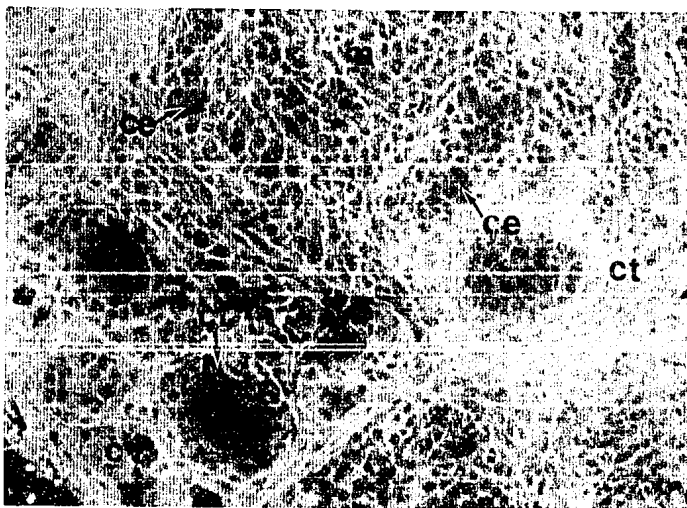


Figura. 12b. El ovario XY a los 14 d.p.p., la citoqueratina 19 se localiza en la corteza (c) en las células de la teca (ct) y en algunas células foliculares (cf) están marcadas debilmente. En la zona medular (m) algunos cordones estériles (ce) son negativos. 200X.

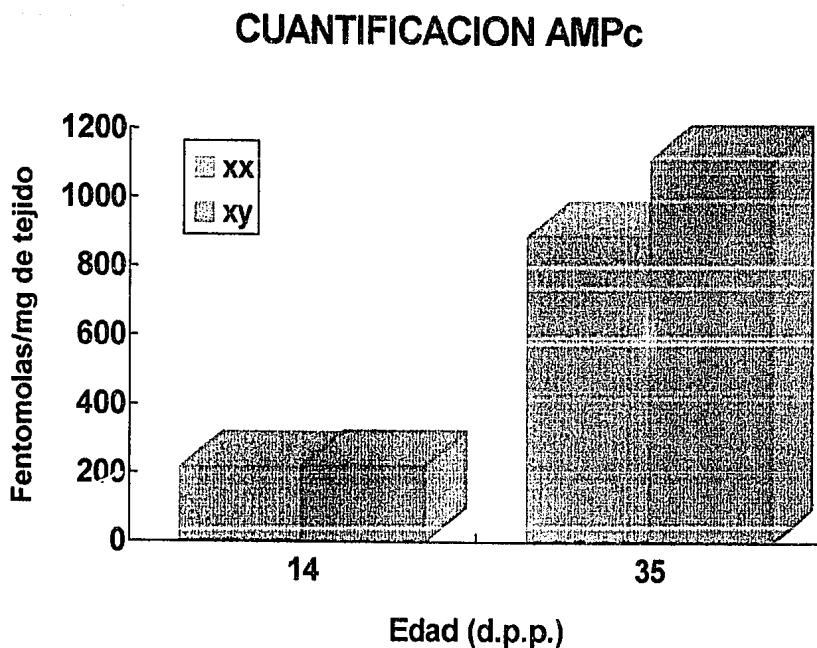


Figura. 13. Gráfica que ilustra los valores promedio obtenidos de 5 cuantificaciones de AMPc realizadas por separado en el ovario XX y XY a los 14 y 35 d.p.p., En el eje de las abcisas se muestran las edades evaluadas y en el eje de las ordenadas los fentomolas /mg de tejido.

VII. DISCUSION

El mecanismo(s) que controlan la diferenciación del tejido esteroideogénico, se conocen poco en la actualidad, uno de estos aspectos en este proceso(s) parece depender de la interacción del componente estromático y del epitelial.

En estudios previos con fetos de rata se ha sugerido que el establecimiento y diferenciación sexual de la gónada embrionaria puede llevarse a cabo en ausencia de células germinales primordiales después de la destrucción citotóxica de éstas con busulfán. Sin embargo, el desarrollo postnatal del ovario es afectado por la destrucción masiva de los ovocitos, de tal forma que no hay citodiferenciación de las células esteroideogénicas (Merchant-Larios y Coello, 1979). En el ovario XX la diferenciación del primer tejido esteroideogénico aparece en el intersticio en la región medular; a los 10 d.p.p., en esta zona las células foliculares muestran una leve positividad. Algunos de los folículos que forman esta zona son los primeros que sufren el proceso de atresia y contribuyen a la formación del tejido esteroideogénico (Merchant-Larios y col., 1979).

En nuestra investigación observamos que en el ovario XY la actividad de la enzima 3β -HSD se localiza fuertemente en los cordones estériles de la región medular, las células del intersticio de la corteza son fuertemente positivas y las foliculares de la misma área tienen una actividad débil. La fuerte actividad de la enzima 3β -HSD en los cordones medulares estériles plantea la

posibilidad de que estas células estén funcionando como una glándula intersticial y/o como un cuerpo lúteo. La glándula intersticial se desarrolla en la segunda semana de vida postnatal y es muy importante para la diferenciación del tejido esteroidogénico (Quatropani, 1973). Durante el desarrollo del ovario la muerte celular es importante para la diferenciación del tejido productor de esteroides, la ausencia del ovocito, induce la hipertrofia de las células de la teca y éstas empiezan a producir andrógenos (Peheleman y Lombard, 1978).

En investigaciones previas demostramos que el ovario XY produce niveles bajos de testosterona comparado con el ovario XX. Los niveles de androstendiona en el ovario XX y XY a los 14 y 35 d.p.p son similares (Villalpando y col., 1993). A pesar de que no haya diferencias en la producción de androstendiona que aparentemente es el andrógeno dominante en el ratón, no se descarta la posibilidad de que en el ovario XY se produzca(n) otro(s) metabolito(s) que hasta el momento desconocemos. La segunda posibilidad en la diferenciación del tejido esteroidogénico es que los cordones epiteliales estériles del ovario XY estén funcionando como un cuerpo lúteo. Con la técnica histoquímica de la 3 β -HSD se detectan tres sustratos de la enzima, cada uno de éstos es un metabolito importante para el metabolismo de esteroides gonadales. La actividad de la enzima involucra la deshidrogenación de la 17 α hidroxipregnenolona a progesterona, pregnenolona a progesterona y dehidroepiandrosterona a androstendiona. Cada uno de

éstos es importante en la biosíntesis de esteroides. De estudios previos sabemos que el ovario XY produce progesterona en menor cantidad que el ovario XX (Villalpando y col., 1993). La combinación de la técnica de la enzima 3 β -HSD con la laminina mostró que tanto las células fuera de los cordones estériles como las ubicadas dentro de los mismos son positivos a la actividad de esta enzima (datos no mostrados). Sería interesante estudiar el metabolismo de esteroides en el ovario infantil y prepúber en la hembra XY; para determinar que tipo de esteroides además de los que ya sabemos produce este ovario.

Durante el desarrollo fetal del ovario el componente epitelial y estromático desempeña un papel muy importante en la formación de los folículos primordiales. En la vida postnatal estas unidades están sujetas a cambios estructurales y funcionales drásticos, que originan al tejido esteroideogénico.

En esta investigación observamos que los cordones estériles a nivel ultraestructural están formados por células semejantes a las epiteliales con citoplasma claro e inclusiones lipídicas, retículo endoplásmico liso y núcleos muy grandes con varios acúmulos de heterocromatina. Las células que están por fuera de los cordones medulares tienen núcleos de forma muy variada y algunas de éstas, las más cercanas a la lámina basal poseen la ultraestructura típica de células esteroideogénicas (Villalpando y col., 1994, datos sin publicar).

Por inmunocitoquímica demostramos que los cordones en el ovario XY están bien delimitados por la laminina que es un componente de la lámina basal

(Martin y Timpl, 1987 y Klein y col., 1988). La distribución de esta glicoproteína permite analizar el proceso de compartimentalización en las regiones cortical y medular del ovario. Esta observación así como la ultraestructural sugiere que estos dos componentes están segregados en el ovario XY a los 14 d.p.p.

Por otro lado, se sabe que la expresión de muchos genes en los eucariontes es controlada por diferentes tipos de hormonas, entre éstas se encuentran las hipofisarias como la FSH y la LH que ejercen su función biológica a través de la interacción con un receptor membranal presente en las células blanco (Hsueh y col., 1977). El complejo hormona receptor se une a la subunidad alfa de la proteína G que activa el sistema adenilato ciclasa y convierte el ATP en AMPc (Habener,1990), hasta este nivel de regulación el ovario XY aparentemente es normal. En el presente estudio no se detectaron diferencias en la producción de AMP cíclico en el ovario infantil a los 14 d.p.p. y en el prepúber a los 35 d.p.p. Esta observación plantea que la baja capacidad de síntesis de esteroides gonadales en la hembra XY, no es mediada por una deficiencia en la producción de este segundo mensajero. Es probable que la producción de estas hormonas en el ovario XY sea regulada más adelante en las cascada de eventos genéticos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en el ovario XY haya alguna interacción inapropiada con los genes que sintetizan los mensajeros que intervienen en la síntesis de enzimas clave en la biosíntesis de esteroides gonadales.

Asimismo, la baja capacidad de síntesis de esteroides en el ovario XY pudiera estar relacionada con un menor número de receptores a gonadotropinas presentes en las células de la teca y de la granulosa. Debido a que el ovario XY pierde los ovocitos de la región medular en la etapa prenatal y su tamaño es mucho menor (Taketo y col., 1989). Hasta el momento no hemos cuantificado el número de receptores a FSH y LH en el ovario infantil y prepúber el la hembra XX y XY y desconocemos si existen diferencias entre ambos.

La distribución de vimentina en el ovario XX se localizó en las células de la teca, en el tejido intersticial, en las células más cercanas al ovocito y alrededor de algunos cordones en el área medular, lo cual sugiere que estas células tienen un origen mesenquimático. Los resultados obtenidos en la presente investigación en el ovario XX y XY están de acuerdo con los demostrados por Paranko y col., (1986) y Stasiek y col., (1990). En el testículo en la vida fetal y neonatal temprana de este órgano se ha visto que las células de Sertoli coexpresan vimentina y citoqueratina 8 y 18 en el ovario de rata (Paranko y col., 1990); la queratina 18 no parece estar asociada con la diferenciación de las células del ovario (Fridmacher y col., 1992).

En este estudio observamos que en el ovario XY a los 14 d.p.p., la queratina 19 se localiza en la corteza, en las células de la teca, algunas foliculares están marcadas débilmente. En los cordones estériles las células epiteliales son negativas. Nuestros resultados difieren de los reportados en la rata por

(Fridmachery col., 1993) quienes encontraron que esta filamento esta presentes en las células epiteliales de los folículos en crecimiento.

Por otra parte, la expresión de las queratinas en los cordones ovígeros ya se ha descrito en el ovario fetal de rata y en el ovario infantil y prepúber (Frödjman y col., 1987). La citoqueratina 8 y 19 se ha identificado en los folículos primarios y los que están en crecimiento, en éstos últimos la citoqueratina 19 desaparece progresivamente de las células de la granulosa de los folículos (Fridmacher y col., 1992). Las citoqueratinas se han demostrado en el blastema gonadal antes de que ocurra la diferenciación gonadal. Algunas células que no están organizadas en estructuras epiteliales expresan citoqueratinas y vimentina mientras que las células del mesonefros son detectadas sólo con vimentina; esta expresión inesperada de las citoqueratinas se parece a la encontrada en estructuras no epiteliales durante la embriogénesis temprana (Viebahn y col., 1988). Se ha propuesto que la citoqueratina 19 puede jugar un papel muy importante en la diferenciación de las células epiteliales de las gónadas, debido a que durante el desarrollo del testículo la queratina 19 desaparece progresivamente, mientras que la queratina 18 se empieza a expresar simultáneamente (Stasiek y col., 1990). Se ha planteado que la presencia de la queratina y vimentina no tiene relación con la organización y el origen embriológico de las células epiteliales y mesenquimáticas, sino que la expresión de la misma puede deberse a un estado de diferenciación particular de la célula

(Stosiek y col., 1990). La expresión de estos filamentos en el ovario postnatal parece variar en las diferentes especies. Las células de la granulosa del ovario humano adulto, expresan queratina 8 y 18 y la presencia de desmosomas (Czernobisky y col., 1985). Sin embargo, en el ovario de rata adulta las células de la granulosa no coexpresan citoqueratinas y el tipo de uniones intercelulares presentes son del tipo adherentes (Czernobisky y col., 1985).

Witschi en 1951, planteó en términos de su teoría corticomedular que la gónada indiferenciada está constituida por dos territorios embriológicos denominados la médula y la corteza. La primera se ubica en la región central de la gónada y produce la medularina que tiene una doble función; estimular el desarrollo de la zona medular e inhibir el desarrollo cortical. La corteza produce la cortexina que promueve el crecimiento de la corteza e inhibe el compartimento medular. Probablemente la región medular produce algún factor que es incompatible con el genoma de los ovocitos pensando que éstos fueran XX. Es posible que en esta área se inicie la morfogénesis testicular y los cordones estériles que observamos sean parecidos a los cordones testiculares (Taketo y col., 1989).

Para tratar de explicar parcialmente la citodiferenciación del tejido esteroideogénico en los cordones estériles del ovario XY se plantea la siguiente hipótesis: las células germinales primordiales que se desarrollan en la corteza del ovario XY interaccionan adecuadamente en el tiempo y el espacio para

inducir la diferenciación del tejido esteroideogénico. Esta interacción requiere del contacto directo de las células somáticas y de las células germinales primordiales quienes secretan un factor difusible que llega a la región de los cordones medulares estériles y es capaz de inducir la citodiferenciación del tejido productor de hormonas esteroides en el ovario XY. Si se hace una analogía de la diferenciación y organización del tejido esteroideogénico del ovario XY con el ovario de rata tratado con busulfán; se observa que si alguna célula germinal primordial sobrevive su presencia provoca la diferenciación del tejido esteroideogénico; más tarde los ovocitos sufren atresia y dejan en su lugar masas de tejido esteroideogénico (Merchant-Larios y Coello, 1973).

Se plantea que la presencia del cromosoma "Y" no impide la diferenciación morfológica del tejido productor de hormonas esteroides ya que se demostró que el componente epitelial y el estromático están presentes en los cordones estériles y ambos tienen actividad de la enzima 3β -HSD. Tanto el componente estromático como el epitelial parecen estar segregados uno del otro por la presencia de la lámina basal. Sin embargo, el cromosoma "Y" si parece afectar la cascada de regulación de la expresión génica de enzimas claves en la biosíntesis de esteroides gonadales.

VIII. CONCLUSIONES

- 1.- Las células de la teca y de la granulosa en el ovario XY que integran el compartimento estromático y epitelial respectivamente, están separadas como en el ovario XX en la etapa infantil.

- 2.- Los cordones estériles del ovario XY están formados por células de tipo epitelial parecidas a las de la granulosa que coexpresan filamentos intermediarios característicos de células epiteliales embrionarias.

- 3.- La actividad de la enzima 3 β -HSD se expresa en las células de la "granulosa" y en las de la "teca" de los cordones medulares del ovario XY lo cual sugiere que estas células están funcionando como una glándula intersticial y/o como un cuerpo lúteo.

- 4.- La baja producción de esteroides gonadales aparentemente no es mediada por diferencias en la producción de AMP cíclico endógeno en el ovario infantil y prepúber en la hembra XY.

- 5.- El cromosoma "Y" no parece influir en la organización del tejido esteroideogénico del ovario infantil. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que las células epiteliales y/o estromáticas pudieran tener una deficiencia en la producción de enzimas claves para la biosíntesis de esteroides gonadales.

IX. REFERENCIAS

1. Alvarez-Buylla A and Merchant-Larios H. 1986. Attraction of Chick Primordial Germ Cells by Gonadal Anlage in Vitro. *Anat. Rec.*215:403-406.
2. Austin C.R., Short R.V., Baker T.G., Monesi V and Sandlehr R:M:F:S. 1972. Células Germinales y Fertilización. La Prensa Médica Mexicana. Páginas1-237.
3. Behringer R.R., Cate R.L., Froelick G.J., Palmiter R.D and Brinster R.L. 1990. Abnormal Sexual Development in Transgenic Mice Chronically Expressing Mullerian Inhibiting Substance. *Nature.* 345:167-170.
4. Berta P., Hawkins R.J., Sinclair A.H., Tayler A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N and Fellous M. 1990. Genetic Evidence Equating SRY and the Testis Determining Factor: *Nature.* 348:448-453.
5. Brambell F.W. 1927. The Development and Morphology of the Gonads of the Mouse. Part.I. The Morphogenesis of the Indifferent Gonad and of the Ovary. *Proc. R. Soc. London. Ser. B.* 101:391-409.
6. Byskov A.G and Moore Lintern S. 1973. Follicle Formation in the Immature Mouse Ovary: The Role of the Rete Ovarii. *J. Anat.* 116(2):207-217.
7. Byskov A.G. 1978. The Meiosis Inducing Interaction Between Germ Cells in the Fetal Mouse Gonad. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 19:1251-1261.
8. Chimal J.M. 1987. El Proceso de Foliculogénesis en el Ovario del Ratón *Mus musculus*. Estudio Experimental "in vitro". Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Depto de Biología UNAM.
9. Chiquone A.D. 1954. The Identification, Origen and Migration of the Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo. *Anat. Rec.*118:135-146.
10. Czernobilnsky B., Moll R., Levy R and Franke W.W. 1985. Coexpression of cytokeratin and vimentin filaments in mesothelial, granulosa and rete ovarii of the human ovary. *Eur. J. Cell. Biol.* 37:175-190.
11. Eicher E.M., Washburn L.L. Whitney J.B and Morrow K.E. 1982. *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL-6J Murine Genome Cause Sex Reversal. *Science.* 217:235-237.

12. Eicher E.M and Washburn L.L. 1983. Inherited Sex-Reversal in Mice. Identification of a Primary Sex-Determining Gene. *J.Exp.Zool.* 228:297-304.
13. Eicher E.M and Washburn L.L. 1986. Genetic Control of Primary Sex Determination in Mice. *Ann.Reversal. Gen.* 20:337-360.
14. Erickson G.F., Magoffin D.A. Dyer C.A and Hofeditz C. 1989. The Ovarian Androgen Producing Cells: A Review of Structure and Function Relationships. *Endocr.Rev.* 6:371-399.
15. Franke W.W., Schiller D.L., Moll R., Winter S., Schimd E and Engelbrecht I. 1981. Diversity of Cytoqueratins Differentiation and Specific Expression of Cytoqueratin Polypeptides in Epithelial Cell and Tissues. *J.Mol.Biol.* 153:933-959.
16. Fridmacher V., Locquet O and Magre S. 1992. Differential Expression of Acidic Cytoqueratins 18 and 19 During Sexual Differentiation of the Rat Gonad. *Development.* 115:503-517.
17. Ghatei M.A., Takatushi K., Susuki Y., Gardiner J., Jones P.M and Bloom S.R. 1993. Distribution and Molecular Characterization of Pituitary Adenilate Cyclase-Activating Polypeptide and in Precursor Encoding Messenger RNA in Human and Rat Tissue. *J.Endocrinol.* 136:159-166.
18. Gondos B. 1984. Germ Cell Differentiation and Intercellular Bridges. En: *Ultrastructure of Reproduction.* Editions Van Baerkomon J and Motta P.M. Martinus Nijhoff Publisher, Boston. Páginas 31-45.
19. Guraya S.S. 1973. Interstitial Gland Tissue of Mammal Ovary: *Acta. Endocrinol.* 171:5-27.
20. Harper J.F and Brooker G. 1975. Femtomole Sensitive Radioimmunoassay for Cyclic AMP and Cyclic GMP After 2'0 Acetylation by Acetic Anhydride in Aqueous Solution. *J.Cyclic Nucleotide. Res.* 1:207-218.
21. Gruenwald P. 1942. The Developmt of the Sex Cords in the Gonads of Man and Mammals. *Am.J.Anat.* 70:359-397.
22. Habener J.F. 1990. Cyclic AMP Response Element Binding Proteins: A Cornucopia of Transcription Factors. *Mol. Endocrinol.* 4:1087-1094.
23. Hillscher B and Hillscher W. 1978. Some Details on the Kinetics of Oogonia and M-Proespermatogoniain NMRI Mice in Comparison to Rat and

Man.En:Development and Function of Reproductive Organs.(Eds. Byskov A.G and Peters H).Experta Médica. Amsterdam.Páginas.ent 131-139.

24. Hsueh A.J.W., Dufan M-L and Catt K.J. 1977. Gonadotropin-Induced Regulation of Lutenizing Hormone Receptors and Desentization of Testicular 3'5'Cyclic AMP and Testosterone Responses. *Cell. Biol.*74:592-598.

25. Josso and Picard. 1986.Anti-Mullerian Hormone. *Physiol.Rev.*66:1038-1090.

26. Klein G., Langedger M., Timpl R and Ekblom P. 1988. Role of Laminin A. Chain in the Development of Epithelial Cell Polarity. *Cell.*55:331-341.

27. Koopman P.,Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P and Lovell-Badge R.1991.Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry.*Nature.*351:117-121.

28. Kuwana T., Maeda-Suga H and Fujimoto T. 1986. Attraction of Chick Primordial Germ Cell by Anlage in Vitro. *Anat.Rec.* 215:403-406.

29. Lehtonen E., Ordoñez G and Reima I. 1988. Cytoesqueleton in Preimplantation Mouse Development. *Cell Differ.* 24:165-178.

30. Levy H., Deane H.W and Rubin B.L. 1959. Visualization of Steroid 3 β -ol Dehydrogenase Activity in Tissues of Intact and Hypophysectomized Rats. *Endocrinol.*65:932-943.

31. Magre S., Angelopoulou A and Jost A. 1980. Cellules de Sertoli en Organogénesis du Testicule Foetal. *Ann. Endocrinologie (Paris).* 41:531-537.

32. Martin G.R and Timpl R. 1987. Laminin and Other Basement Membranes Components.*Annu. Rev.Cell.Biol.*3:57-85.

33. Merchant-Larios H. 1976. The Role of Germ Cells in the Morphogenesis and Cytodifferentiation of the Rat Ovary. En: *Progress in Differentiation Research.*(Eds N.Müller-Bérat, C.Resenfeld, D. Tavin and D.Viza). Página 453-462.

34. Merchant-Larios H., Lobato L and Centeno B. 1979. Ontogenesis of the Ovary From the Sterile W/WV Mouse. En: *Advances in Morphology of Cells and Tissues.* (Eds.Vidrio and C.Galina). Página 383-392. New York Alan R.liss Ed.

35. Merchant -Larios and Coello J. 1979. The effect of busulfan on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. *Cell Differ.* 8:145-155.

36. Merchant -Larios and Coello J. 1979. The effect of busulfan on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. *Cell Differ.* 8:145-155.
37. Merchant-Larios H.1984. Germ and Somatic Cell Interaction During Gonadal Morphogenesis.En: *Ultrastructure of Reproduction*(Eds J.Van Blerkom and P.Pm. Motta). Netherlands: Martinus Nijhoff Publisher. Página.19-30.
38. Merchant -Larios H and Centeno B. 1981. Morphogenesis of the Ovary of the Sterile W/W^V Mouse . *Advances in the Morphology of Cells and Tissue*. N.Y. Alan R.Liss. pp. 383-392.
39. Merchant-Larios H and Chimal Monroy. 1989. The ontogeny of Primordial Follicles in the Mouse Ovary. In: *Development in Ultrastructure of Reproduction*. Página 55-63.
40. Mori and Matsumoto K.1973. Development of the Secondary Interstitial Gland in the Rabbit Ovary.*J. Anat.*116(3):417-430.
41. Nagamine C.M., Taketo T and Koo G.C. 1987a. Morphological Development of the Mouse Gonad in Td-a-1 Sex Reversal. *Differentiation*.33:214-222.
42. Nagamine C.M., Taketo T and Koo G.C. 1987b.Studies on the Genetics of Tda-1 Sex Reversal in the Mouse. *Differentiation*. 33:223-231.
- 43 . Nishioka Y. 1968. Application of the Y Chromosomal repetitive Sequences to Sexing Mouse Embryos. *Teratology*. 38:181-185.
44. Nishioka Y and Lamotte E. 1986. Isolation and Characterization of a Mouse Y Chromosomal Repetitive Sequence. *Gen.*113:417-432.
45. Obsborn M., Debus E and Weber K. 1984. Monoclonal Antibodies Specific for Vimentin. *Eur. J Cell. Biol.* 34:137-143.
46. Paranko J., Kallajoki M., Pellieniemi L.J., Lehto V.P. and Virtanen I. 1986. Transient Coexpression of Cytoqueratin and Vimentin in Differentiating Rat Sertoli Cells. *Dev.Biol.* 117:35-44.
47. Pehleman F.W and Lombard M.N. 1978. Differentiation of Ovarian and Testicular Interstitial Cells During Embryonic and Postembryonic Development in Mice. *Cell.Tissue.*188:465-480.

48. Peluso J.J. 1989. Role of the Peripubertal Pattern of FSH, LH and Prolactin Secretion in Regulating *In Vitro* Steroidogenesis and Follicular Growth Juvenil Rat Ovaries. *J. Reprod.Fertil.* 86:705-711.
49. Quatropani S.L. 1973. Morphogenesis of the ovarian interstitial tissue in the neonetal mouse. *Anat. Rec.*177:569-594.
50. Rawn J.D.1989. *Bioquímica .Tomo I. Páginas. 237-263.*
51. Richards J.J., Rao M.C., Bernath G.A., Midgley A.R and Reichter L.E.1976. Ovarian Follicular Development in the Rat: Hormone Receptor Regulation by Estradiol, Follicle Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone. *Endocrinol.*99:1562-1570.
52. Sokka T and Huhtaniemi I. 1990. Ontogeny of Gonadotrophin Receptors and Gonadotrophin Stimulated Cyclic AMP Production in the Neonatal Ovary. *Endocrinol.*127:297-303.
53. Steiner A.L., Kipnis D.M., Utiger R and Parker C. 1969. Radioimmunoassay for the Measurement of Adenosine 3'5'Cyclic Phosphate.*Biochem.*64:367-373.
54. Steiner A.L., Perker C.W and Kipnis D.M. 1972. Radioimmunoassay for Cyclic Nucleotides. *J. Biol.Chem.* 217:1106-1113.
55. Stosiek P., Kasper M and Karsten U. 1990. Expression of Cytoqueratins 8 and 18 in Human Sertoli Cells of Inmature and Atrophic Seminiferous Tubules. *Differentiation.* 43:66-70.
56. Taketo T.H., Nishioka Y., Nagamine C.M., Villalpando-I and Merchant-Larios H.1989.Development and Fertility of the Ovaries in the ESY^{POS} Sex -Reversed Female Mouse. *Development.*107:95-105.
57. Tierch T.R., Mitchell M.J and Watchell J.J.1991. Studies on the Phylogenetic Conservation of the Sry. *Human. Genet.* 87:571-573.
- 58.Timpl R., Rhode H., Robey P.G., Rennard S.I.J and Foidert J.M and Martin G.R. 1979. Laminin-A Glycoprotein From Basement Membranes. *J. Biol. Chem.* 254:9933-9937.
59. Timpl R and Dziadek M. 1986. Structure Development and Molecular Pathology of Basement Membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 29:1-42.

60. Timpl R., Rhode H., Robey P.G., Rennard S.I.J and Foidert J.M and Martin G.R. 1979. Laminin-A Glycoprotein From Basement Membranes. J. Biol. Chem. 254:9933-9937.
61. Timpl R and Dziadek M. 1986. Structure Development and Molecular Pathology of Basement Membranes. Int. Rev. Exp. Pathol. 29:1-42.
62. Turner C.D and Bengara J.T. 1971. Endocrinology of the Ovary. General Endocrinology W. B. Saunders Co, Philadelphia, London. Toronto. 399:490-543.
63. Upadhyay S and Zamboni L. 1982. Ectopic Germ Cells:Natural Model for the Study of Germ Cell Sexual Differentiation. Dev. Biol. 79:6584-6588.
64. Van Mujien G.N.P., Ruiller D.J and Warnar S.O. 1987. Coexpresion of Intermediate Filament Polypetides in Human Fetal and Adult Tissues. Lab. Inv. 57:359-369
65. Viebahn C., Lane E.B and Ramaekers F.C.S. 1988.Keratin and Vimentin Expression in Early Organogenesis of the Rabbit Embryo.
66. Villalpando I., Nishioka Y and Taketo T. 1993. Endocrine Differentiation of the XY Sex-reversed Mouse Ovary During Postnatal Development. J.Steroid.Biochem. Mol. Biol. 45:265-273.
67. Witschi. E. 1951. Embryogenesis of the Adrenal and Reproductive Gland. Recent. Prog.Horm.Res.6:1-23.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

X. APÉNDICE

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS CON VECTABÓN

Vectabón de Vector Laboratories 7 ml

Acetona Absoluta.....350 ml

Lavar las laminillas con dextrán líquido al 3%, enjuagarlas con agua destilada, dejar secar a temperatura ambiente y cubrirlas del polvo con papel aluminio. Colocarlas en un portaobjetos metálico y sumergirlas en acetona absoluta, 5 minutos 2 veces. Sacar las laminillas escurrirlas y sumergirlas 5 minutos en la solución de vectabón. Sacar los portaobjetos y enjuagarlos con agua destilada 30 segundos dos veces y colocarlos verticalmente para que se escurran. Dejar secar a temperatura ambiente e inmediatamente almacenarlas en cajas .

BUFFER SALINA DE FOSFATOS 0.05 M

Disolver 3.68 g de fosfato de sodio monobásico (0.05 M), 3.45 g de fosfato de sodio dibásico y 0.5 g de azida de sodio en 400 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.3 con NaOH 1N o HCl, aforar a 500 ml y almacenar a temperatura ambiente.

BUFFER SALINA DE FOSFATOS 0.2 M

Pesar 27.6 g de fosfato de sodio monobásico y disolverlo en agua destilada, agregar 28.39 g de fosfato de sodio dibásico y 17.52 g de NaCl. Aforar a un litro y ajustar el pH a 7.4 con HCl.

AMORTIGUADOR TRIS 0.2 M

Pesar 12.11 g de hidroximetil aminometano y disolverlo en 500 ml de agua destilada y almacenar a temperatura ambiente.

HCl 0.2 M

Tomar 8.27 ml de HCl concentrado, diluirlo en 100 ml de agua destilada y aforar a 500 ml con agua destilada.

FORMALINA NEUTRA

Pesar 4 g de fosfato de sodio monobásico y 6.56 g de fosfato de sodio dibásico anhidro disolverlos en 500 ml de agua destilada, agregar 100 ml de formaldehido al 3.7%, ajustar el pH a 7.0 y aforar a un litro. Almacenar en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

FIJADOR ÁCIDO PÍCRICO- FORMALDEHÍDO

Pesar 1 g de paraformaldehído, agregar 20 ml de agua destilada y calentar a 50 °C. Poner unas dos o tres gotas de NaOH 10 N y la solución se torna clara, dejarla enfriar añadir 25 ml de PBS 0.2 M pH 7.4 . Ponerle 0.09 g de ácido picrico, ajustar el pH a 7.4 y almacenar a 4 °C durante un mes.

MEDIO DE INCUBACIÓN PARA REVELAR PEROXIDASA

Pesar 5 mg de diaminobencidina tetraclorhidra de Sigma y disolverla en 10 ml de buffer Tris-HCl pH 7.6 en un vaso de precipitado cubierto de la luz con un agitador magnético. En el momento de utilizarse se agregan 3 µl de peróxido de hidrógeno al 30% y agitar brevemente. Incubar el tejido con esta solución 15 minutos en la oscuridad.

MARCADO DE LA SONDA

La sonda se marcó por el método de secuencias al azar con un Kit del GIBCO-BRL. Se empleó 1 µg de la sonda desnaturalizada a °C como templado y se agregó a 15 µl del buffer del Kit los deoxi-nucleotídeos en el siguiente orden . 2 µl de dGTP, 2 µl de dATP, 2 µl de dTTP, 3 µl (50 µCi de ³²P-dCTP, 1 µl del fragmento Klenow y 3 µl de H₂O-DEPC. La mezcla se incubó dos horas a temperatura ambiente y la sonda marcada se purificó en una columna de Sephadex G-50 .