

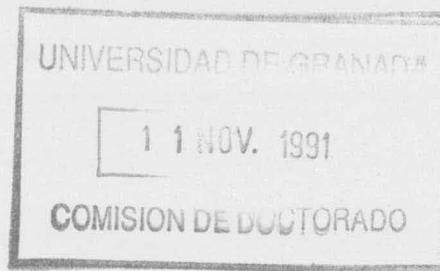
Plan Nuevo

T
11
139

Prov. T 13/57

ESTUDIO DE LOS ASPECTOS SEROLOGICOS Y FUNCIONALES DEL ANTIGENO SxS

por



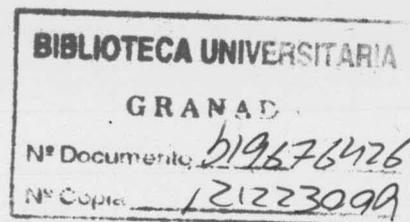
Antonio Sánchez Baca

Departamento de Biología Animal, Ecología y Genética

Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

--1991--



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 20 NOV. 1991
ENTRADA NUM. 4125

*ESTUDIO DE LOS ASPECTOS
SEROLOGICOS Y FUNCIONALES
DEL ANTIGENO SxS*

Dirigida por los Doctores



D. Rafael Jiménez Medina



D. Miguel Burgos Poyatos

Memoria que, para aspirar al grado de Doctor, presenta el Licenciado Antonio Sánchez Baca. Departamento de Biología Animal, Ecología y Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Diciembre 1991



El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Animal, Ecología y Genética de la Universidad de Granada, durante los años 1987-1991, período en el que el Doctorando disfrutó de una beca del Plan de Formación del Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia. La investigación realizada ha sido financiada principalmente por la DGICYT a través del proyecto PB87-0870, y por la Junta de Andalucía, a través de subvenciones al Grupo de Investigación "Genética Animal" de este Departamento.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Doctor D. Rafael Díaz de la Guardia Guerrero por haberme ofrecido la oportunidad de iniciarme en las tareas de investigación, por su acertada labor de tutoría y su colaboración en la dirección y asesoramiento de mi trabajo y, sobre todo, por su amistad.

A los Doctores D. Miguel Burgos Poyatos y D. Rafael Jiménez Medina por el elevado valor científico de su labor en la dirección de este trabajo, por su ayuda en innumerables tareas, por su continuo apoyo y su amistad.

Al Doctor D. Luis Caballero López-Lendinez así como al Licenciado D. Juan José Marín López por facilitar mi iniciación en las técnicas histológicas y de tratamiento de embriones y por su amistad.

Y finalmente, al resto de los miembros del Area de Genética de este Departamento, y especialmente a los componentes del Grupo de "Genética Animal".

A Inma, a mis padres y hermanos

INDICE

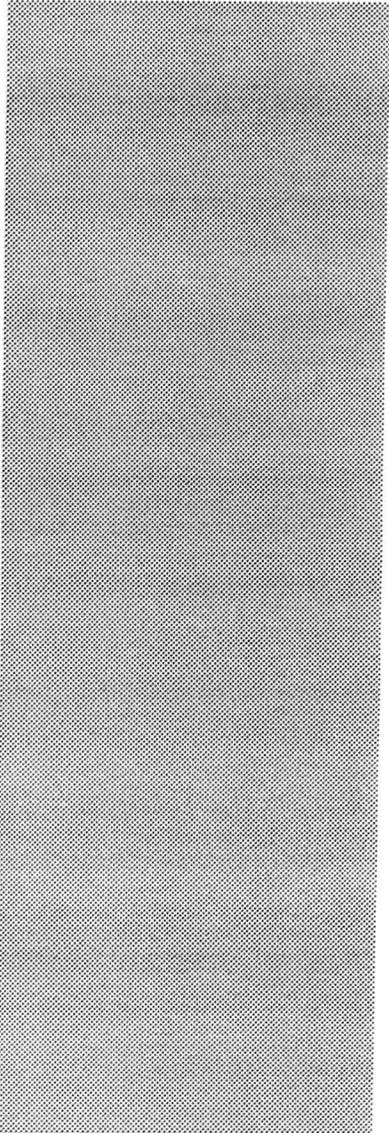
INTRODUCCION	1
INMUNOLOGIA DEL H-Y	4
IDENTIDAD DEL H-Y	16
TERMINOLOGIA DEL H-Y	19
CONSEVADURISMO EVOLUTIVO DE LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DEL SEXO HETEROGAMETICO	20
DISTRIBUCION DEL ANTIGENO Sxs	22
ASPECTOS GENETICOS DE LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DEL SEXO HETEROGAMETICO	27
<i>GENETICA DEL H-Yt</i>	28
<i>GENETICA DEL H-Yc</i>	29
<i>GENETICA DEL Sxs</i>	30
ASPECTOS MOLECULARES DEL ANTIGENO Sxs	35
ASPECTOS FUNCIONALES DE LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DEL SEXO HETEROGAMETICO	38
IDENTIFICACION DEL GEN DETERMINANTE DE TESTICULO	48
DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS GONADAS DE <i>Gallus domesticus</i>	50
OBJETIVOS	53
MATERIAL	55
MATERIAL UTILIZADO EN LA PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	55

MATERIAL UTILIZADO EN LOS TRATAMIENTOS DE EMBRIONES	55
METODOS	56
OBTENCION DE FUENTES DE ANTIGENO Sxs	56
<i>Suero de rata macho</i>	56
<u>Obtención del suero</u>	56
<u>Preparación del suero para su utilización como fuente de antígeno Sxs</u>	57
<u>Preparación del suero para la medida de sus niveles de Sxs</u>	57
<i>Líquido de epidídimo</i>	57
<i>Sobrenadante de testículo</i>	58
<i>Sobrenadante de ovario de gallina</i>	59
<i>Medio condicionado por células de Sertoli</i>	59
<u>Subcultivos</u>	61
<u>Técnicas de criopreservación de las células</u>	62
Congelación	62
Descongelación	64
OBTENCION DE SUEROS ANTI-Sxs	64
<i>Inmunización con esplenocitos de macho</i>	64
<i>Inmunización con suero de macho</i>	66
<i>Inmunización con líquido de epidídimo</i>	66
<i>Inmunización con macerado de testículo</i>	66
<i>Inmunización intraesplénica con piel de macho</i>	67
<i>Inmunización con sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund</i>	68

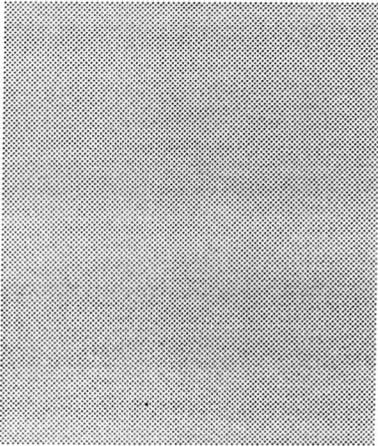
<i>Inmunización intraesplénica con piel y con coadyuvante+sobrenadante de testículo</i>	69
<i>Inmunización intraesplénica con coadyuvante y sobrenadante de testículo</i>	69
<i>Suero de hembras múltiparas</i>	70
PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	70
<i>Células diana</i>	71
<u>Espermatozoides</u>	71
<u>Células epidérmicas disociadas</u>	71
<u>Células esplénicas</u>	73
<u>Células de Sertoli cultivadas</u>	74
<i>Suero fuente de complemento</i>	75
<i>Pruebas de citotoxicidad directas</i>	76
<i>Pruebas de citotoxicidad indirectas para medir los niveles de Sxs en los fluidos utilizados como fuentes de antígeno</i>	77
TRATAMIENTO <i>in vivo</i> DE LOS EMBRIONES CON ANTIGENO Sxs	78
TRATAMIENTO <i>in vitro</i> DE LAS GONADAS EMBRIONARIAS	81
ESTUDIO DEL SEXO GENETICO	82
<i>Obtención de las preparaciones cromosómicas</i>	82
<i>Técnicas de bandedo cromosómico</i>	86
<u>Bandedo G</u>	86
<u>Bandedo C</u>	87
<u>Bandedo de fluorescencia (Cromomicina A₃)</u>	88
Método de tinción	88

ESTUDIO DEL SEXO FENOTIPICO	89
<i>Estudio histológico de las gónadas</i>	90
<u>Inclusión de las piezas</u>	90
<u>Tinción de los cortes</u>	91
TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA	93
<i>Cultivos de las células sobre portaobjetos</i>	93
<i>Tinción inmunohistoquímica</i>	94
ABSORCION DE SUEROS CON CELULAS	96
INDICE DE SOLUCIONES Y MEDIOS	97
RESULTADOS	98
CELULAS DIANA	98
<i>Espermatozoides</i>	99
<i>Células epidérmicas disociadas</i>	99
<i>Células de Sertoli cultivadas</i>	100
<i>Células esplénicas</i>	102
COMPLEMENTO	103
SUEROS ANTI-Sxs	104
FUENTES DE ANTIGENO Sxs	110
CITOGENETICA DE <i>Gallus domesticus</i>	114
TRATAMIENTO <i>in vivo</i> DE LOS EMBRIONES	115
TRATAMIENTO <i>in vitro</i> DE LAS GONADAS EMBRIONARIAS	119
<i>Gónadas cultivadas en ausencia de Sxs</i>	120
<i>Gónadas cultivadas en presencia de Sxs</i>	121

TABLAS	123
DISCUSION	132
CELULAS DIANA	132
FUENTE DE COMPLEMENTO	138
SUEROS ANTI-Sxs	139
FUENTES DE ANTIGENO Sxs	142
EFECTO DEL ANTIGENO Sxs EN EL DESARROLLO GONADAL	147
CONCLUSIONES	157
BIBLIOGRAFIA	159



INTRODUCCION



INTRODUCCION

Dentro del proceso global de determinismo y diferenciación sexual podemos distinguir tres tipos de sexo, considerados en sentido amplio: sexo genético, sexo gonadal y sexo fenotípico.

El sexo genético viene determinado en el momento de la fecundación y es consecuencia de la dotación de cromosomas sexuales que portan los gametos implicados, dando lugar a cigotos homogaméticos (hembras XX en mamíferos o machos ZZ en aves y reptiles) y cigotos heterogaméticos (machos XY o hembras ZW, respectivamente). En general, aquí radican las diferencias genéticas responsables del dimorfismo gonadal necesario para la reproducción sexual (sexo gonadal). Una vez formado un determinado tipo de gónada, testículo u ovario, la acción hormonal de éstas, determina posteriormente el desarrollo de los órganos sexuales secundarios propios de cada sexo.

No obstante, existen casos excepcionales en los que la diferenciación gonadal no se corresponde con el sexo genético, o en los que el fenotipo sexual externo no coincide con el esperado para una determinada dotación gonadal. Por esta razón es necesario distinguir entre estos tres tipos de sexo, con el fin de evitar ambigüedades.

Los embriones de mamíferos y aves, hasta una determinada fase de su desarrollo embrionario, mantienen el potencial para diferenciarse en uno u otro sexo. Así, ambos poseen un primordio gonadal indiferenciado con capacidad para hacerlo tanto hacia testículo como hacia ovario, y contienen además los conductos de Wolff (precursores de epidídimos y vesículas seminales) y los conductos de Müller (precursores de oviductos y útero). En un embrión masculino, hay una regresión de los conductos de Müller y un desarrollo de los conductos de Wolff,

mientras que en un embrión femenino ocurre lo contrario.

Jost (1947 y 1960) llevó a cabo una serie de experiencias con conejos en los cuales observó que cuando a embriones macho se les estirpaban los testículos, dichos embriones desarrollaban oviductos y útero, y, por lo tanto, diferenciaban caracteres sexuales externos propios de las hembras. Si a estos embriones castrados se les inyectaba testosterona, se restauraba parcialmente el sexo masculino. Por el contrario, si a los embriones hembra se les estirpaban los ovarios, dichos embriones mantenían el desarrollo de los caracteres propios del sexo femenino. De estas experiencias se deduce que la presencia de los testículos es imprescindible para un perfecto desarrollo de los conductos de Wolff (caracteres sexuales masculinos), y que su ausencia lleva a un desarrollo de los conductos de Müller (caracteres sexuales femeninos). Por tanto, la determinación del sexo fenotípico femenino puede llevarse a cabo sin la presencia de ovarios. De estos datos se desprende además, que la decisión en cuanto a que un embrión tome la alternativa de desarrollar los conductos de Wolff o los de Müller, depende de la existencia de testículos o de los productos hormonales producidos por ellos.

A pesar de que el proceso de diferenciación sexual secundaria es bastante conocido, la diferenciación sexual primaria o determinismo genético del sexo (diferenciación del primordio gonadal hacia testículo u ovario) se conoce aún bastante poco.

Aunque las hormonas sexuales son las encargadas de producir el desarrollo de las características sexuales secundarias, definiendo así el sexo fenotípico (Wilson y col., 1981), no tienen sin embargo ningún papel en la diferenciación del primordio gonadal (determinación del sexo gonadal). El interés por el descubrimiento de la sustancia o sustancias encargadas de controlar estos pasos, ha hecho que numerosos investigadores aborden este problema.

Dada la relación existente entre presencia de cromosoma Y y de desarrollo testicular en mamíferos, se ha postulado que este desarrollo está determinado por un gen o genes localizados en este cromosoma. El hipotético gen sobre el que pivota el proceso de diferenciación sexual ha sido llamado Tdy (Testis determining gene) en ratón y TDF (Testis determining factor) en humanos.

Wachtel y col. (1975b) propusieron al antígeno H-Y como el producto de este gen determinante de testículo. Se trata de un antígeno menor de histocompatibilidad que había sido puesto de manifiesto años antes por Eichwald y Silmsler (1955) mediante experiencias de transplantes. Numerosas evidencias apoyaron durante varios años un papel central del antígeno H-Y en el determinismo genético del sexo, aunque finalmente se han descrito casos en los que falta la necesaria correspondencia entre presencia de H-Y y de testículo (McLaren y col., 1984). A pesar de que el H-Y no es por lo tanto el producto del gen determinante de testículo, sin embargo todo parece indicar que probablemente tiene algún papel relacionado con el proceso de diferenciación sexual. Así por ejemplo, dado que los ratones macho carentes de antígeno H-Y carecían también de espermatogénesis, Burgoyne y col. (1986) postularon la posibilidad de que tal antígeno pudiese ser el producto de un hipotético gen estimulante de la espermatogénesis. Por estas razones, el antígeno H-Y sigue siendo un tema de gran interés dentro del campo de investigación del determinismo genético del sexo y la diferenciación sexual. Por ello, en el presente trabajo hemos abordado el estudio del posible papel del antígeno H-Y en estos procesos del desarrollo, mediante el tratamiento, tanto *in vivo* como *in vitro*, de embriones de pollo.

A continuación se hace una revisión sobre el conocimiento actual de cada uno de los aspectos más interesante del antígeno H-Y. Asimismo y dado que a lo largo de este trabajo se harán repetidas

alusiones a distintos aspectos relacionados con los procesos de diferenciación sexual en aves, se incluye también en esta introducción, un apartado en el que se hará una somera descripción de tales procesos.

INMUNOLOGIA DEL H-Y

Eichwald y Silmsler (1955) pusieron de manifiesto por primera vez la existencia de un antígeno específico de macho realizando transplantes de piel dentro de la línea consanguínea de ratón C57BL/6, al descubrir que las hembras rechazaban los transplantes de piel de los machos, mientras que en cualquier otra combinación de sexos el trasplante era aceptado. Dado que este antígeno estaba presente sólo en machos y por tanto posiblemente codificado por el cromosoma Y, Billingham y Silvers (1960) propusieron el nombre de Histocompatibility Y Antigen, abreviadamente antígeno H-Y.

Aunque en la línea C57BL/6 son rechazados todos los transplantes de piel de macho a hembras, no ocurre lo mismo en todas las líneas estudiadas; así por ejemplo, en las líneas CBA y C3H los transplantes de piel de macho en hembras son aceptados de forma permanente, en otras, como en la línea A, existe por el contrario un comportamiento intermedio entre las dos anteriores, de forma que las hembras rechazan aproximadamente sólo el 50% de los transplantes de piel de machos singénicos.

Según Michie y McLaren (1958) estas diferencias en el comportamiento de distintas líneas podrían ser debidas a tres causas:

- 1) Diferencias en el antígeno H-Y de unas líneas a otras.

- 2) Diferencias entre líneas para la capacidad del donador de inducir una respuesta inmune para el H-Y.
- 3) Diferencia entre las hembras de las distintas líneas en su capacidad de dar respuesta para el antígeno.

Sin embargo las hembras híbridas entre las líneas C57BL y CBA rechazan trasplantes de piel de machos de ambas líneas parentales, demostrando que la falta de respuesta por parte de la línea CBA no era debida a la falta de antígeno en las células de los machos de esta línea (Klein y Linder, 1961). Además el rechazo de estas hembras híbridas es más fuerte frente a los trasplantes de piel de machos CBA que frente a los de machos C57BL, indicando por otro lado que el antígeno H-Y se comporta como un inmunógeno más potente en el contexto genético de la línea CBA que en el de la C57BL.

En aquellas líneas donde se da rechazo de los trasplantes de piel de macho, se ha demostrado que este rechazo ocurre independientemente de que las hembras hayan sido sensibilizadas previamente con células de macho o no, aunque esta sensibilización influye en la velocidad con que se produce el rechazo. Dicha sensibilización puede llevarse a cabo utilizando células de machos singénicos, alogénicos e incluso xenogénicos. Gracias a este hecho, Silvers y Yang (1973) demostraron que las hembras de la línea de ratón C57BL rechazan los trasplantes de piel de machos singénicos de una forma acelerada si han sido previamente inyectadas con linfocitos de algunas líneas de rata. Esto indica que los linfocitos sensibilizan a estas hembras frente al H-Y y que los antígenos H-Y de rata y ratón son homólogos.

Wiberg (1985) consigue un efecto similar inmunizando hembras C57BL con fibroblastos procedentes de humanos XY y XO. Sin embargo,

no ocurre lo mismo si se inyectan células de individuos XX, lo que demuestra por un lado que el determinante antigénico del antígeno H-Y de humanos y de ratón son homólogos y por otro, que las hembras XO presentan este antígeno en sus células.

Además de en ratas y ratones, también se ha demostrado rechazo de transplantes de macho en hembras de conejos (Chai, 1968).

Utilizando la misma técnica de transplantes de piel Bacon y Craig (1966) y posteriormente Gilmour (1967) ponen de manifiesto la existencia en pollos de un antígeno de histocompatibilidad que en este caso está presente en las hembras, de forma que aquí son los machos los que rechazan los transplantes de piel de hembras. Dado que en aves las hembras son el sexo heterogamético los autores consideraron que este antígeno era análogo al H-Y de los mamíferos y, por estar probablemente ligado al cromosoma W proponen para éste el término H-W.

Por otro lado McCarrey y col. (1981) demuestran que, al igual que ocurría en mamíferos, en pollos existe variabilidad de unas líneas a otras en cuanto al porcentaje de transplantes rechazados. Así, en algunas líneas los machos rechazan invariablemente los transplantes de piel de hembra, mientras que en otras la mayoría de los transplantes sobreviven. Sin embargo cuando transplantaron piel de hembras de una de las líneas a hembras híbridas procedentes de cruces entre diferentes líneas (con cromosoma W de diferente origen), encuentran que no hay rechazo en ninguno de los casos, lo que demuestra que no existe polimorfismo genético para el locus del antígeno H-Y de unas líneas a otras.

Además de los antígenos H-Y y H-W de mamíferos y aves respectivamente, Kallman (1970) demostró la existencia de un antígeno de histocompatibilidad similar en peces teleósteos.

Un dato a destacar con respecto a la técnica de transplantes es

que se ha descrito una alta variabilidad en los tiempos de rechazo de unos individuos a otros dentro de una misma línea consanguínea. Bergstresser y col. (1980) postulan que estas diferencias de respuesta pueden ser debidas a variaciones en el contenido de mucopolisacárido de la piel en diferentes regiones del cuerpo, o bien, a la densidad y distribución de la células de Langerhans, que están directamente implicadas en el rechazo de los trasplantes. Sin embargo en cualquier caso estas diferencias se suponen debidas a factores ambientales más que a factores genéticos. Este hecho hace que esta técnica presente muchas dificultades a la hora de establecer si un determinado individuo es H-Y positivo o no, ya que para ello es imprescindible trabajar con grandes lotes de animales¹.

Paralelamente a la técnica de trasplantes de piel, el antígeno H-Y se puede poner de manifiesto mediante la realización *in vitro* de pruebas de citotoxicidad mediadas por células² (Goldberg y col. 1973).

Gordon y col. (1975) demuestran que la respuesta específica para el antígeno H-Y tanto por la técnica de trasplantes como por la de citotoxicidad mediada por células está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) conocido como H-2 en ratón y más concretamente por antígenos de la clase H-2b. Al igual que ocurre en

1 El modo de determinarlo es el siguiente: se toman dos grupos de hembras de una línea de ratón, uno de los cuales se sensibiliza con inyecciones intraperitoneales de células del individuo problema; posteriormente a ambos grupos se les realizan trasplantes de piel de machos singénicos, calculando para cada uno de ellos el tiempo medio de supervivencia de estos trasplantes. Si el tiempo medio de supervivencia no varía significativamente entre el grupo control y el previamente sensibilizado, el individuo será considerado H-Y negativo. Por el contrario, si el tiempo medio de supervivencia se ve acortado en el grupo sensibilizado, indicará que las células del individuo problema han sensibilizado a las hembras frente al H-Y acelerando así la reacción de rechazo, entonces, aquel será considerado H-Y positivo.

2 Este método comienza con la inmunización de hembras ya sea mediante trasplantes de piel o mediante inyecciones intraperitoneales de células esplénicas de macho. Posteriormente se extraen los esplenocitos de estas hembras, separando los linfocitos T del resto mediante filtración a través de una membrana de nylon. Los linfocitos T obtenidos de esta forma se vuelven a estimular contra el antígeno H-Y, cultivándolos conjuntamente con esplenocitos de macho que han sido previamente irradiados. Estos linfocitos T han demostrado capacidad citotóxica específica frente a células que porten en su superficie el antígeno H-Y.

ratón en humanos esta respuesta está también restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad, que en este caso se conoce como HLA-A2 (Goulmy y col. 1977a y b). Además Fierz y col. (1982) postulan que la respuesta está influenciada también por genes no pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad. En cualquier caso, no se conoce exactamente el tipo de relación existente entre estos antígenos.

Zinkernagel y Doherty (1974) postularon dos hipótesis para explicar el tipo de interacción que da lugar a la restricción. Teniendo en cuenta que la lisis por linfocitos T requiere su estrecha unión a la célula diana, la primera de ellas asume que los linfocitos T poseen un único receptor para reconocer ambos antígenos. Así el gen H-Y podría codificar un producto que modificaría al producto del gen H-2 resultando un H-2 anormal. Esta estructura compuesta de los antígenos H-Y y H-2 sería la reconocida por el receptor del linfocito T. La segunda hipótesis postula que los linfocitos T poseen dos receptores, uno para el antígeno H-2 y otro para el antígeno extraño, en este caso el H-Y, de forma que necesita reconocer ambos para llevar a cabo la lisis.

Algunas evidencias experimentales parecen apoyar la segunda hipótesis. Así, Boyse y col. (1968) demostraban que los antígenos H-Y y H-2 no están próximos en la membrana celular mediante una técnica de bloqueo con anticuerpos. Así, al aplicar un anticuerpo anti H-2 la unión posterior del anti H-Y no se veía bloqueada, o viceversa.

Geib y col. (1977) pusieron también de manifiesto que ambos antígenos no están estrechamente asociados en la membrana celular. Realizando "capping" en células de macho con anticuerpos anti H-2 y anti H-Y demostraron que el capping del H-2 no afecta la distribución del antígeno H-Y en la membrana.

Un aspecto muy interesante en lo que a inmunología del antígeno H-Y se refiere, es la relativa facilidad con que se puede inducir

tolerancia a este antígeno. Este hecho fue en un principio utilizado en la demostración de que el rechazo de los transplantes era efectivamente un fenómeno inmunológico (Billingham y Silvers, 1960). Inyecciones de esplenocitos de macho adultos en hembras singénicas recién nacidas hacen que éstas acepten transplantes de piel de macho demostrando la inducción de tolerancia. Bastan tan sólo 10.000 esplenocitos de macho inyectados 24 horas después del nacimiento para inducir la tolerancia. Un efecto similar se puede obtener en hembras de 17 días con dosis más altas tales como 20×10^6 esplenocitos. En hembras adultas las dosis necesarias son mucho más altas requiriéndose, hasta 500×10^6 células para inducir la tolerancia.

Además de inóculos de esplenocitos se han empleado otros métodos para inducir la tolerancia, por ejemplo, tres semanas en unión parabiótica de las hembras con los machos, irradiaciones con rayos X de la médula de las hembras y posterior reconstitución con médula de macho, transplantes de piel de macho singénico recién nacido y múltiples partos con descendientes masculinos pueden inducir tolerancia.

Se ha demostrado que la tolerancia al antígeno H-Y sólo es transmisible mediante unión parabiótica de hembras tolerantes con no tolerantes. Además Smith y Powell (1977) demuestran que la transmisión de 30×10^6 esplenocitos, linfocitos T o timocitos desde hembras que han tenido varios partos hasta hembras vírgenes induce tolerancia en estas últimas. Sin embargo, la transmisión de suero, células de médula ósea o linfocitos B no consigue inducir tal efecto.

Por otro lado, Weissman y col. (1984) han demostrado que la tolerancia al antígeno H-Y puede ser inducida y transferida por células linfoides pero no por células no linfoides. Así los linfocitos T son capaces de inducir tolerancia a transplantes de piel, pero no ocurre igual con los linfocitos B o con los macrófagos, aunque estos dos tipos de células

presentan antígeno y capacidad inmunógena para sensibilizar a ratones hembras para el rechazo de trasplantes posteriores.

Estos autores demuestran que se puede inducir la tolerancia con inyecciones de tan sólo 10^5 - 10^6 esplenocitos de un individuo adulto a una hembra singénica recién nacida, y que esta tolerancia puede ser transferida de una hembra a otra recién nacida por inóculos de 10^7 células.

Goldberg y col. (1971) realizaron uno de los hallazgos que más ha hecho avanzar los conocimientos sobre el antígeno H-Y. Pusieron de manifiesto que el suero de las hembras de la línea de ratón C57BL que habían rechazado varios trasplantes de piel de machos singénicos tenía poder citotóxico específico para las células de macho, lo que indica que este suero posee anticuerpos que reconocen el antígeno específico de macho. El suero de estas hembras mostraba capacidad citotóxica para los espermatozoides y otros tipos celulares de macho en presencia de complemento, efecto que no se producía cuando las células expuestas al suero eran de hembra.

Para la obtención de sueros anti H-Y, además de inmunizar hembras mediante trasplantes de piel (Harnasch, 1979), se han utilizado varios protocolos de inmunización. El más usado ha sido inmunizar hembras con inyecciones intraperitoneales de esplenocitos de macho a intervalos semanales durante unas 8 semanas variando el número de células inyectadas entre 4 y 100×10^6 . En algunos casos estas inyecciones eran acompañadas con inyecciones subcutáneas de coadyuvante de Freund en diferentes regiones del animal (Tung y col. 1982). Otros autores inyectaban los esplenocitos en las almohadillas de las patas (Bradley y Heslop, 1985b)

Según Wachtel y col. (1974) este tipo de sueros preparados por esplenocitos presenta menos autoanticuerpos que el preparado por trasplantes de piel.

Bradley y Heslop (1985b) desarrollaron un protocolo de inmunización intraesplénica que consiste en introducir fragmentos de piel de macho en el bazo de las hembras. De esta forma se obtienen unos sueros con unos títulos mucho más altos que con las inyecciones intraperitoneales.

Además, Kraupen-Brown y Wachtel (1979) no encontraron diferencias en el poder citotóxico de un suero obtenido por inmunización con esplenocitos y el de una hembra que había tenido múltiples partos, lo que indica que los embriones H-Y positivos han sensibilizado a la madre estimulando en ella la producción de anticuerpos anti H-Y. En relación con este hecho, Vernier (1975) encontraba que el tamaño de la placenta aumentaba en un embarazo de macho si el embarazo anterior había sido también de macho. Sin embargo si el embarazo previo había sido de hembra esto no ocurría.

El poder citotóxico de estos sueros venía dado por el porcentaje de espermatozoides muertos en presencia de complemento. Por su parte, la especificidad venía determinada por dos hechos: 1) dichos sueros eran citotóxicos sólo frente a células de macho y no frente a las de hembra; 2) la capacidad citotóxica podía ser retirada de forma específica mediante absorción del suero con células de macho, pero no con células de hembra.

Básicamente se han aplicado dos tipos de pruebas de citotoxicidad para poner de manifiesto la presencia de H-Y en un determinado individuo o tejido, la prueba directa y la indirecta. En la prueba directa las células de las cuales se quiere determinar si poseen o no antígeno H-Y se ajustan a una determinada concentración y se exponen a diferentes diluciones del suero anti H-Y en presencia de complemento. La muerte celular producida se compara con la de los controles negativos (células de hembras) y positivos (células de macho); si los valores obtenidos se aproximan a los del control positivo, las

células problema se considerarán también H-Y positivas, en caso contrario serán H-Y negativas.

En la prueba indirecta por el contrario las diferentes diluciones del suero anti H-Y son absorbidas con una cantidad determinada de células problema, tras lo cual son retiradas del suero por centrifugación. Posteriormente el suero es utilizado en una prueba directa con espermatozoides o cualquier otro tipo de células sensibles al suero en presencia de complemento, de forma que si las células problema eran H-Y positivas habrán retirado del suero su poder citotóxico y la muerte celular producida por éste se verá muy reducida en comparación con la que produce el suero no absorbido. Por el contrario, si dichas células eran H-Y negativas la citotoxicidad del suero permanecerá invariable tras la absorción.

Las variaciones de esta técnica han sido abundantes, si bien todas ellas afectan al tipo de células utilizadas como dianas y a la forma en que se pone de manifiesto la presencia de antígeno H-Y en las células.

En relación con los tipos celulares utilizados para cuantificar las pruebas de citotoxicidad, el uso de espermatozoides, aunque asiduo, ha planteado sin embargo algunos problemas ya que reaccionan de forma natural con anticuerpos heterófilos, lo que hace necesario un exhaustivo control tanto del antisuero como de la fuente de complemento. Por otro lado no es fácil distinguir entre los espermatozoides vivos y muertos al cuantificar la muerte producida por el suero con tinción con azul tripán debido a su escasa cantidad de citoplasma.

Además de espermatozoides se han utilizado células epidérmicas disociadas (que plantean el problema de la dificultad de su preparación) (Scheid y col., 1972; Steinmuller y col., 1984), células de cerebro disociadas (Schachner y Hämmerling., 1974), fibroblastos (Koo y col., 1981), células linfoides (Tokuda y col., 1977; Koo y col., 1981) e incluso

en muchos casos células procedentes de líneas preestablecidas que han demostrado ser H-Y positivas, tales como células Raji (Fellous y col., 1978).

Por lo general las células muertas en las pruebas de citotoxicidad eran teñidas con azul tripán y contadas al microscopio, pero se han empleado además otros métodos para estimar el número de células muertas. Así, Tung y col. (1982) relacionaban el número de espermatozoides muertos con un descenso en los niveles de ATP de la muestra que eran puestos de manifiesto mediante la emisión de luz al adicionar a la muestra un complejo de luciferasa y luciferina. También se ha estimado la muerte marcando las células diana con Cr51 y midiendo la liberación de éste tras la lisis.

Se han desarrollado además diferentes técnicas serológicas para detectar H-Y en las que la unión del antígeno y anticuerpo no se ponía de manifiesto mediante lisis celular sino marcando las células con diferentes marcadores. Así, muchos autores ponen de manifiesto la unión antígeno-anticuerpo mediante la formación de rosetas de glóbulos rojos alrededor de las células H-Y positivas. Esta técnica consiste básicamente en preparar una suspensión de glóbulos rojos de carnero a la que se le adiciona un suero de rata anti glóbulos rojos de carnero. Por otro lado, se ponen las células problema en contacto con el suero anti H-Y de rata y se mezclan las dos suspensiones celulares adicionando un suero anti IgG de rata. Si las células son H-Y positivas los glóbulos rojos formarán rosetas uniéndose a ellas a través de los diferentes anticuerpos (Hausman y Palm, 1973; Peter y col., 1973 y Koo y col., 1981).

Tokuda y col (1977), utilizan la unión de *Staphilococcus aureus* a las células que han sido expuestas al suero anti H-Y para demostrar este antígeno en células linfoides. Esta bacteria posee en su pared proteína A que muestra afinidad por la fracción Fc de las IgG de varias

especies, de forma que si las células son H-Y positivas las bacterias aparecerán unidas a su membrana.

Basándose en el mismo principio, Casanova-Bettane y col. (1981) detectaron la unión del H-Y y el anticuerpo anti H-Y en las células adicionando a éstas una suspensión de proteína A marcada con ^{125}I , de forma que las células H-Y positivas quedarán marcadas radioactivamente, lo que se pone de manifiesto en un contador gamma.

Otros, utilizan como marcador un suero anti Ig de rata o ratón, dependiendo de la especie donde se ha desarrollado el antisuero, conjugado con peroxidasa (Müller y Bross, 1977) o con productos fluorescentes como isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Galbraith y col. 1978), de forma que las células H-Y positivas aparecen teñidas de marrón al poner el sustrato de la peroxidasa para el primer caso o fluorescentes para el segundo.

Koo y col. (1973) utilizaron un anticuerpo híbrido anti-TMV (virus del mosaico del tabaco) y anti-IgG de rata. Tras tratar las células problema con un suero anti H-Y obtenido en rata, adicionaban el anticuerpo híbrido más virus del mosaico del tabaco y las observaban al microscopio electrónico. De esta forma demostraron que el H-Y estaba localizado mayoritariamente en el capuchón acrosomal de los espermatozoides.

Por su parte, Bradley y col. (1987a) ponían de manifiesto el antígeno H-Y en extracto de testículo de toro mediante una ELISA utilizando como primer anticuerpo un suero anti H-Y obtenido por inmunización intraesplénica y un anticuerpo de cabra anti IgG de rata marcado con ureasa.

Aunque las diferentes técnicas serológicas han sido ampliamente aplicadas, generalmente se han encontrado con numerosos problemas. El antígeno H-Y es un antígeno menor de histocompatibilidad y por ello

sólo el 30% de los individuos inmunizados producen sueros con niveles aceptables (Koo, 1981), lo que hace necesario inmunizar muchos individuos y, posteriormente, probar los diferentes sueros rechazando aquellos en los que no hubiese respuesta específica para las células de macho o aquellos en los que esta respuesta fuese muy baja. Además el hecho de que el antígeno H-Y esté compuesto de una parte protéica y otra glucídica, que constituye su determinante antigénico (Shapiro y Erickson, 1981; Shapiro y Goldberg, 1984), junto con su baja densidad en la membrana celular, hace realmente difícil obtener sueros anti H-Y.

Otra dificultad adicional es que la mayoría de estos sueros policlonales son resultado de la hiperinmunización de hembras con células de macho, por lo que en estos sueros pueden aparecer anticuerpos inespecíficos e incluso autoanticuerpos. Esto ha hecho necesario absorber dichos sueros con células H-Y negativas antes de ser usados, para retirar todos estos anticuerpos, tras lo cual se reducía a veces la capacidad citotóxica del suero, indicando que probablemente se absorben también inmunoglobulinas específicas para el H-Y. En cualquier caso y en las mejores condiciones, en un suero policlonal se obtienen como mucho un 5% de anticuerpos específicos para un determinado antígeno. Todo ello explica los bajos títulos mostrados en sueros anti H-Y que oscilan por lo general entre 1/4 y 1/6.

En general los sueros dan un margen muy pequeño de diferencias entre la máxima muerte observada con el suero en presencia de complemento (alrededor de 50-60%) y la mínima muerte en presencia de complemento y ausencia de suero (que es de un 30%) valores que representan los controles positivo y negativo respectivamente, en cada prueba (Goodfellow y Andrews 1982).

Parecía que el desarrollo de anticuerpos monoclonales para el antígeno H-Y (Koo y col., 1981; Nagamine y col., 1984; Bradley y Heslop 1984) terminaría con los problemas de los sueros policlonales. Sin

embargo, aunque estos anticuerpos han demostrado reconocer al antígeno H-Y, los títulos han sido igualmente bajos y de muy baja especificidad, probablemente debido a que sólo reconocen un determinante antigénico, mientras que los diferentes anticuerpos del suero policlonal reconocerían más de uno.

Más recientemente Bradley y Heslop (1985b) mediante inmunización intraesplénica han desarrollado sueros anti H-Y de altos títulos en comparación con los obtenidos por inmunización con inyecciones intraperitoneales de esplenocitos. Estos sueros pueden ser usados en pruebas más sensibles para el H-Y tales como ELISA (Bradley y col., 1987a)

Ohno y col. (1981) sugerían que el reconocimiento del H-Y por los anticuerpos probablemente es también susceptible de restricción y que éstos reconocen en realidad complejos antigénicos H-Y y MHC más que al H-Y por sí mismo, al igual que ocurría para el H-Y puesto de manifiesto mediante trasplante o mediante pruebas de citotoxicidad mediada por células. Esto viene apoyado por el hecho de que la absorción de un suero anti H-Y con células de ratón de haplotipos H-2Dk H-2Kk o H-2Db H-2Kk, reduce la citotoxicidad del suero mientras que su absorción con células de haplotipos H-2b o H-2d no tiene efecto sobre la citotoxicidad del suero.

IDENTIDAD DEL H-Y

Queda aún por dilucidar si efectivamente las diferentes técnicas detectan o no el mismo antígeno.

Melvold y col. (1977) describieron ratones híbridos entre C57BL y Balb/c, que carecían de cromosoma Y y eran H-Y negativos mediante

la técnica de trasplantes, pero que, sin embargo, eran H-Y positivos mediante técnicas serológicas. Este hecho sugiere la existencia de al menos dos antígenos específicos de macho en ratón, uno de ellos detectado mediante técnicas de trasplantes y otro mediante serología. Por el contrario, Wachtel y col. (1984) demostraron que estos dos antígenos son similares, ya que la inmunización de hembras con antígeno definido serológicamente hace que éstas rechacen de forma acelerada los trasplantes de piel de machos singénicos. Además Koo y Varano (1981) demostraron que el antígeno H-Y detectado serológicamente es similar o está situado muy próximo al reconocido por los linfocitos T, ya que la lisis celular queda bloqueada añadiendo anticuerpos anti H-Y al medio donde se realiza la prueba de citotoxicidad mediada por células, lo que indica que estos anticuerpos interfieren en el reconocimiento del antígeno por parte de los linfocitos T.

La descripción por parte de Simpson y col. (1986) de que los ratones Sxr' pierden simultáneamente la información para las posibles formas antigénicas del H-Y detectado mediante trasplantes y mediante pruebas de citotoxicidad mediada por células, sugiere que ambas técnicas detectan el mismo antígeno.

Sin embargo, Goulmy y col. (1983) describen el caso de un hombre XX que era H-Y negativo según pruebas de citotoxicidad mediada por células y H-Y positivo según pruebas de citotoxicidad mediada por anticuerpos. Además de este caso, todos los casos analizados posteriormente de hombres XX y hermafroditas verdaderos XX han sido H-Y positivos según pruebas de citotoxicidad mediada por anticuerpos, y H-Y negativos según pruebas de citotoxicidad mediada por células (Goulmy y col., 1983, y Simpson y col., 1987). Por lo tanto, al menos en humanos todo parece indicar que estas dos técnicas detectan diferentes antígenos. Esta conclusión fué apoyada por la

localización de un gen relacionado con el antígeno H-Y que se detecta mediante pruebas de citotoxicidad mediada por células, en el brazo largo o bien en el corto próximo al centrómero del cromosoma Y (Simpson y col. 1987), y la localización de otro gen, candidato para ser el gen estructural del antígeno H-Y que se detecta mediante pruebas de citotoxicidad mediada por anticuerpos en el cromosoma 6 (Lau y col. 1986).

Según Klein (1982), sólo las proteínas son capaces de inducir respuesta mediada por linfocitos T, mientras que otras estructuras además de las proteínas activan preferentemente respuesta por linfocitos B. Según estos hechos, una posible explicación de la falta de correspondencia entre los resultados de las distintas técnicas, podría basarse en la suposición de que el gen ligado al cromosoma Y fuese requerido para modificar la glicoproteína que se reconoce mediante pruebas serológicas pudiendo ser entonces reconocida por las células T. Los anticuerpos podrían ser capaces de detectar tanto la parte protéica como la glucídica. La carencia de la información para transformar el H-Y y hacerlo reconocible para los linfocitos T explicaría por qué los machos XX son positivos mediante pruebas basadas en anticuerpos, y negativos en pruebas de citotoxicidad mediada por células.

Wiberg (1987), propuso que, mientras no se tengan más datos sobre este antígeno, en humanos se puede considerar que el H-Y detectado mediante pruebas de citotoxicidad mediada por anticuerpos es un antígeno distinto al H-Y detectado mediante pruebas de citotoxicidad mediada por células, y distinto del H-Y detectado mediante transplantes y pruebas de citotoxicidad mediada por células, en ratón.

Por el contrario, en la especie *Myopus schisticolor* se da una perfecta concordancia entre los resultados obtenidos con las distintas técnicas (Wiberg y col., 1982; Wiberg y Fredga, 1985; Wiberg y Günther, 1985) lo que favorece la idea de que en esta especie sólo existe un

antígeno específico de macho, aunque no se conocen datos sobre el antígeno puesto de manifiesto mediante transplantes.

TERMINOLOGIA DEL H-Y

Como ya hemos mencionado anteriormente, Billingham y Silvers (1960) propusieron el nombre de antígeno H-Y para el antígeno específico del sexo masculino, nombre con el que durante mucho tiempo ha sido referido indistintamente el antígeno detectado mediante las diferentes técnicas inmunológicas.

Sin embargo, los indicios que apuntan al hecho de que diferentes técnicas inmunológicas empleadas para detectar el antígeno H-Y, detectan antígenos diferentes o bien diferentes partes de una misma molécula obligan a estandarizar una nomenclatura menos ambigua, que haga referencia a cada antígeno con un nombre diferente.

Como consecuencia, Silvers y col. (1982) propusieron que, aunque se debería seguir empleando el término H-Y para el antígeno de transplantes, sin embargo, para el detectado mediante técnicas serológicas debería emplearse el término SDM (Serologically Detectable Male antigen).

Wiberg (1987) propuso que el antígeno que se detecta mediante transplantes sea llamado H-Yt, mientras que el que se detecta por medio de pruebas de citotoxicidad mediada por células sea llamado H-Yc. Este autor, por similitud con esta nomenclatura, se refiere al antígeno detectado mediante serología como H-Ys, pero dado que este antígeno está relacionado con el sexo heterogamético, que en aves es el femenino (las hembras tienen el antígeno y los machos no), propone como más correcto llamarle Sxs (sex specific antigen), nomenclatura que, en lo

sucesivo, será adoptada en este trabajo. Además, aunque esta distinción no se ha hecho en la mayoría de las publicaciones, llevando por tanto a confusión en muchas ocasiones, hemos procurado averiguar a partir de la metodología empleada en cada trabajo, el antígeno al que se hace referencia en cada caso, y, aunque los autores se refirieran a él simplemente como antígeno H-Y nosotros lo citaremos en este trabajo con su nombre correcto según la nomenclatura descrita.

CONSERVADURISMO EVOLUTIVO DE LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DEL SEXO HETEROGAMETICO

Los antígenos específicos del sexo heterogamético detectados mediante las diferentes técnicas inmunológicas han demostrado con todas ellas no presentar diferencias entre distintos individuos de una línea ni entre diferentes especies. Así, por ejemplo, Silvers y Yang (1973) demostraron que el antígeno H-Yt es homólogo para ratas y ratones. Para ello inyectaban linfocitos de macho de algunas líneas de ratas en hembras de ratón C57Bl, lo que hizo que estas últimas se sensibilizaran y rechazaran los transplantes de piel de machos singénicos de forma acelerada. Igualmente, Wachtel y col. (1974), demostraron que las células de rata, conejo y humanos son susceptibles de lisis en presencia de un suero anti-Sxs de ratón más complemento, indicando que el antígeno Sxs posee determinantes muy similares en estas cuatro especies.

En la misma línea podemos considerar las experiencias de McCarrey y col. (1981) con las que demostraron que no existe polimorfismo genético para el locus del antígeno H-Wt de unas líneas a otras de pollos.

Mintz y Silvers (1983), basados en una nomenclatura incorrecta, indicaban que, aunque la expresión del antígeno varía de unas líneas a otras, las siguientes evidencias apuntan a que sólo existe una única forma alélica:

- 1) Los trasplantes de piel entre machos híbridos de las distintas líneas son aceptados permanentemente.
- 2) La exposición de hembras adultas C57BL a células alogénicas de macho sensibiliza a aquellas contra los trasplantes de piel de machos singénicos, mientras que en hembras recién nacidas induce tolerancia.
- 3) No hay diferencias en el grado de lisis específica del H-Y en células de macho cuando se comparan híbridos de diferentes líneas que difieren en el origen del cromosoma Y.

Como podemos ver, las dos primeras pruebas sólo hacen referencia al H-Yt, mientras que la tercera lo hace al Sxs.

Wachtel y col. (1974 y 1975a) demuestran también el alto grado de conservadurismo evolutivo del antígeno Sxs, mediante la realización de pruebas de citotoxicidad y de hemaglutinación. Poniendo de manifiesto que la absorción de un suero anti-Sxs de ratón con células de individuos de sexo heterogamético procedentes de especies tan distantes evolutivamente como ratas, cobayas, conejos, humanos, pollos, *Rana pipiens* y *Xenopus laevis*, retiraba su capacidad citotóxica. Estas experiencias demuestran que el antígeno Sxs de células de tan variados orígenes es muy similar al de ratón ya que todos ellos muestran reacción cruzada.

Otros autores han demostrado la presencia de este antígeno en reptiles (Zaborski y col 1979), en peces (Müller y Wolf 1979) e incluso en langostas y algunas especies de insectos (Shalev y col. 1980 y Pechan y Tracey 1980) estando siempre relacionado con el sexo heterogamético.

DISTRIBUCION DEL ANTIGENO Sxs

Todas las investigaciones sobre la distribución de antígenos específicos del sexo masculino en diferentes células y tejidos han tenido como base la utilización de sueros procedentes de hembras inmunizadas. Por lo tanto, aunque la mayoría de los autores se refieren a la distribución del H-Y en sus publicaciones, estos estudios demuestran únicamente la distribución del Sxs.

Desde el punto de vista embriológico, la expresión del antígeno Sxs es muy temprana. Así por ejemplo, Krco y Goldberg (1976) y Shelton y Goldberg (1984) demostraron la expresión de este antígeno en embriones XY de ratón de ocho células, ya que la aplicación de suero anti-Sxs y complemento les causa la muerte, lo que no ocurre en embriones XX (Epstein y col. 1980).

Müller y col, (1978b) y Brunner y col (1984) demostraron que tras cultivar células testiculares disociadas en medio de cultivo el antígeno Sxs aparece como molécula libre, lo que no ocurre si los cultivos son de cualquier otro tejido de macho. Además, Zenzes y col. (1978a) demostraron que las células de Sertoli sintetizan y liberan al medio gran cantidad de antígeno Sxs. Por el contrario las células de Leydig pueden sintetizarlo en individuos muy jóvenes pero no en individuos adultos, presentando sin embargo capacidad de captar Sxs exógeno.

A pesar de que sólo el testículo sintetiza y excreta Sxs, en mamíferos, los individuos macho adultos presentan antígeno Sxs en todas sus células como un antígeno de membrana (Müller y col., 1978a), con la excepción de las células germinales inmaduras (Zenzes y col., 1978a) y de los glóbulos rojos.

Scheid y col., (1972) utilizando una prueba de citotoxicidad demuestran la presencia del antígeno Sxs en las células epidérmicas, pero con esta misma prueba no pueden demostrarlo en células de timo, nódulos linfáticos, esplenocitos o médula ósea. Sin embargo estas células tienen capacidad de retirar la actividad citotóxica del suero anti-Sxs, indicando que son Sxs positivas. A pesar de ello estos resultados se pueden explicar suponiendo que es probable que tengan poca cantidad de antígeno o, por el contrario, que sólo lo presenten un porcentaje muy bajo de ellas.

Worst y Fusening (1973) utilizando técnicas de hemadsorción ponen de manifiesto el antígeno Sxs en células epidérmicas pero no en células de los nódulos linfáticos ni en fibroblastos. Sin embargo, estas últimas fueron Sxs positivas en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

En lo que a las células gonadales se refiere, Koo y col. (1979) demuestran mediante hemadsorción que las espermatogonias de individuos recién nacidos son Sxs negativas, aunque por el contrario los espermatocitos primarios y secundarios se convierten en Sxs positivos y las espermatidas tempranas y tardías poseen incluso más Sxs que los espermatozoides. Además, las células somáticas gonadales son Sxs positivas (Zenzes y col 1978a).

Bradley y Heslop (1988) examinan la distribución del antígeno Sxs dentro de los túbulos seminíferos de ratas de 20 días y adultas utilizando métodos inmunohistoquímicos. Demuestran que en testículos

inmaduros las células que poseen más Sxs son las espermatogonias, mientras que en los testículos adultos, los grupos de espermatocitos se tiñen menos por lo que algunos de ellos pueden ser considerados Sxs positivos y otros Sxs negativos. Por su parte las células peritubulares son Sxs positivas en los testículos maduros y negativas en los inmaduros.

Como ya vimos, Koo y col. (1973), localizaban el antígeno Sxs en espermatozoides mediante microscopía electrónica utilizando un anticuerpo híbrido anti Ig de ratón y anti virus del mosaico del tabaco. Mediante esta técnica el antígeno Sxs se localizó en el capuchón acrosomal de la cabeza del espermatozoide. Por el contrario, Bradley y col. (1987b), utilizando técnicas de marcaje con inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia, sugieren que el antígeno Sxs está localizado en la región posterior de la cabeza y en la pieza media del flagelo del espermatozoide.

Debido a la relación que se observó entre Sxs y cromosoma Y, se postuló que posiblemente sólo los espermatozoides que llevan este cromosoma expresarían el Sxs en su membrana, mientras que los que llevan el cromosoma X no, planteando la hipótesis de una posible expresión postmeiótica del Sxs. Esta podría ser la causa de la desviación observada por Bennett y Boyse (1973) a favor de las hembras en la relación de los sexos en la descendencia de hembras inseminadas artificialmente con espermatozoides previamente tratados con suero anti-Sxs en presencia de complemento, lo que sugiere que, efectivamente, los espermatozoides con cromosoma Y son más sensibles a la lisis. Sin embargo, no existe tal desviación en la descendencia de hembras inmunizadas contra el Sxs mediante transplantes de piel y que son inseminadas con espermatozoides no tratados. Esto puede ser debido a que los espermatozoides en el aparato reproductor de la hembra son inaccesibles al sistema inmune o bien a que realmente no

hay diferencias para el Sxs entre espermatozoides con cromosoma Y o X. Por su parte, Hoppe y Koo (1984) tampoco pudieron demostrar alteraciones en la relación de sexos al realizar fertilización *in vitro* de óvulos con espermatozoides tratados con un anticuerpo monoclonal anti-Sxs. Demostraron sin embargo, que los espermatozoides van perdiendo antígeno Sxs a medida que son transportados en el epidídimo y durante la capacitación, lo que les llevó a relacionar la presencia de Sxs en el espermatozoide con su inmadurez y su incapacidad de fertilización.

En las células somáticas no gonadales el antígeno Sxs no es un componente integral de la membrana y se desconoce exactamente su mecanismo de unión a la membrana celular, aunque se sabe que depende de la β_2 -microglobulina al igual que otros muchos antígenos de membrana. Se ha postulado que forma dímeros con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad MHC (HLA en humanos o H-2 en ratón) y que éstos a su vez se asocian a la β_2 -microglobulina (Ohno y col., 1979). De cualquier modo, la unión del antígeno a las células somáticas es más débil que a las células gonadales.

Esta asociación a la β_2 -microglobulina explicaba los resultados obtenidos por Fellous y col. (1978), que cultivaron varias líneas celulares de teratocarcinomas de ratón que carecían de β_2 -microglobulina y de Sxs. Tras 3 ó 4 semanas de cultivo, algunas líneas presentaban β_2 -microglobulina y Sxs, con la particularidad de que todas las células Sxs positivas tenían también β_2 -microglobulina, aunque no todas las células con β_2 -microglobulina resultaran ser Sxs positivas. Estos mismos autores demostraron también que la β_2 -microglobulina y el Sxs están estrechamente asociados en la membrana celular de las células Raji, ya que el capping con anticuerpos anti β_2 -microglobulina resulta también en capping del Sxs. Sin embargo no se producía capping de la β_2 -

microglobulina utilizando suero anti-Sxs.

La línea de células Daudi, conocida por carecer de HLA y de β 2-microglobulina, liberan al medio gran cantidad de Sxs precisamente por no poder retenerlo en su membrana (Iwata y col., 1979; Nagai y col., 1979).

Sin embargo, a pesar de localizarse en todas las células de individuos de sexo heterogamético, las únicas células que poseen un receptor específico para el antígeno Sxs son las células somáticas gonadales de ambos sexos.

Müller y col. (1978a) demostraron que la piel, hígado, riñón y cerebro de ambos sexos no presentan capacidad de captar Sxs exógeno, mientras que los tejidos gonadales tanto de macho como de hembra son capaces de hacerlo. En los ovarios, esta capacidad permanece invariable a lo largo de toda la vida del animal, mientras que en testículo decrece con la edad del animal. Esto indica que el receptor específico para el Sxs está localizado en las células somáticas de las gónadas, aunque en testículo está parcialmente copado, gracias a la producción de antígeno Sxs por las células de Sertoli, mientras que en el ovario permanece libre durante toda la vida por falta de antígeno. En consecuencia, Wachtel y col. (1980c) pudieron demostrar que tras incubar células ováricas en Sxs libre estas adquieren el Sxs en su membrana y pueden absorber anticuerpos de un suero anti-Sxs.

Así, las gónadas de sexo homogamético (que son por tanto Sxs negativas) de diferentes especies, como ovarios de vaca o perra, y testículos de pollo o xenopus, expuestas a Sxs de extracto de testículo de ratón absorben éste de forma específica y se convierten en Sxs positivos, lo que indica (1) que todas ellas poseen el receptor en sus células y (2) que este receptor específico para el Sxs muestra un alto grado de conservadurismo evolutivo (Wachtel, 1981).

Además de estar unido a la β_2 -microglobulina y al receptor específico de las gónadas, el antígeno Sxs se puede encontrar también como molécula libre en suero (Wachtel y col., 1980c) y en líquido de epidídimo (Müller y col., 1978a, 1980b) o unido de forma inespecífica a la membrana de los eritrocitos. Así, Müller y col. (1980b) demostraron que los eritrocitos de individuos XY absorben anticuerpos anti-Sxs, mientras que los de individuos XX no lo hacen. Estudiando el modo de unión del Sxs a la membrana del eritrocito, observaron que, después de varios lavados el Sxs desaparece de la membrana celular de éstos, pero no de otros tipos celulares.

Los eritrocitos de hembra absorben Sxs exógeno y se convierten en Sxs positivos aunque la lisis de estos eritrocitos por suero anti-Sxs no es específica del sexo. Por tanto, la unión del antígeno a la membrana de los eritrocitos es inespecífica y, en consecuencia, no llega a ser integrante de la misma.

ASPECTOS GENETICOS DE LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DEL SEXO HETEROGAMETICO

Como ya hemos mencionado en alguna ocasión, antes de que se distinguieran diferentes antígenos específicos del sexo heterogamético, el patrón de expresión del entonces llamado antígeno H-Y, hizo pensar que este antígeno debería estar codificado por un gen localizado en el cromosoma Y. Sin embargo, cabía la posibilidad de que este antígeno resultase de la presencia de un sólo cromosoma X más que de la presencia de cromosoma Y, tal como ocurre en *Drosophila* donde la presencia de dos antígenos específicos de macho y otros dos específicos de hembra están determinados por el número de cromosomas X. Sin

embargo, todo parecía indicar que era el cromosoma Y el que codificaba el antígeno H-Y, ya que los individuos XO eran H-Y negativos mientras que los XXY eran H-Y positivos. Además, teratomas testiculares que retenían el cromosoma Y expresaban el H-Y, mientras que los que carecían de este cromosoma no lo expresaban (Bunker, 1966).

Cuando los conocimientos sobre el antígeno H-Y avanzaron hasta el punto de distinguir varios antígenos diferentes, el H-Yt, H-Yc y Sxs, se hizo necesario tratar por separado la localización de los genes de estos antígenos.

GENETICA DEL H-Yt

En ratones se consideró en principio que el gen que determina el antígeno H-Yt está localizado en el cromosoma Y, dado que los ratones XO han sido descritos en numerosas ocasiones como H-Yt negativos (Celada y Welshons, 1963; Melvold y col., 1977; Haughton y col., 1979 y Simpson y col., 1982). Sin embargo esto no es siempre así habiéndose descrito también ratones XO H-Yt positivos (Koo y col., 1983).

Más recientemente, Simpson y col. (1986) y Wiberg y Lattermann (1987) han demostrado que ratones XXSxr (llevan sobre uno de los cromosomas X el fragmento Sxr, causante de reversión sexual, derivado del cromosoma Y) son H-Yt positivos, mientras que ratones XXSxr' (poseen un Sxr deleciónado) han perdido su capacidad antigénica pero no la masculinizante. La pérdida de esta capacidad antigénica indica que, bien el gen estructural, o bien un gen regulador relacionado con el H-Yt está localizado en el cromosoma Y. Posteriores investigaciones han situado este gen en el brazo corto del cromosoma Y (Simpson y col., 1987 y McLaren y col., 1988).

En humanos y *Myopus schisticolor* la situación es bien distinta.

Así todas las mujeres con síndrome de Turner XO son H-Yt positivas (Wiberg, 1985) y las hembras X'Y, XO, X'O y X'X de *Myopus schisticolor* también son H-Yt positivas (Wachtel y col., 1976a; Wiberg y Fredga 1985; Wiberg y Günther, 1985). [X' es un cromosoma X mutado causante de la producción de hembras XY fértiles en *M. schisticolor* (Fredga y col., 1976)]. A pesar de que algunas mujeres XO descritas anteriormente fueron mosaicos XO/XY (Müller y col., 1987) otras, por el contrario, carecían por completo de secuencias del cromosoma Y. Tampoco hay evidencias de que en el cromosoma X' de *Myopus* existan secuencias del cromosoma Y. Por tanto en humanos y en *Myopus* es muy probable que el gen para el H-Yt no esté localizado en el cromosoma Y.

GENETICA DEL H-Yc

Los datos obtenidos sobre la localización del H-Yc coinciden perfectamente con los obtenidos para el H-Yt.

En ratones los individuos XO, pueden ser H-Yc positivos (Koo y col., 1983) o H-Yc negativos (Simpson y col., 1982).

Los ratones XX portadores de Sxr son todos H-Yc positivos mientras que los Sxr' son H-Yc negativos. Todo esto sugiere que el gen estructural del H-Yc, o bien alguno de sus genes reguladores, están localizados en el cromosoma Y (McLaren y col., 1984; Simpson y col., 1986).

McLaren y col. (1988) concluyen mediante el estudio de ratones Sxr, que el gen del antígeno H-Yc está localizado en el brazo corto del cromosoma Y, idea que fué apoyada al demostrar que si se realiza hibridación in situ con una sonda del Sxr (que se ha demostrado posee

el gen del H-Yc), ésta se localiza en el brazo corto del cromosoma Y (Roberts y col. 1988).

En humanos, los datos son también bastante claros. Cinco hombres XX mostraron ser H-Yc negativos (Goulmy y col., 1983), mientras que seis hombres XX que presentan parte del brazo corto del cromosoma Y, pero que carecen del brazo largo, eran H-Yc positivos. En concordancia con esto, dos mujeres XY que poseen el brazo largo del cromosoma Y pero no el corto, eran H-Yc negativas (Simpson y col., 1987).

Todos estos datos sugieren que el gen del antígeno H-Yc o alguno de sus genes reguladores se localiza en el brazo corto del cromosoma Y o en el largo, muy próximo al centrómero.

GENETICA DEL Sxs

La relación existente entre la presencia de Sxs y el sexo heterogamético junto con el hecho de que en las primeras experiencias se encontró que este antígeno estaba ausente en individuos XO pero presente en individuos XXY, Tfm (síndrome de feminización testicular) e intersexos XY, favorecía la hipótesis de que el cromosoma Y era necesario para la expresión de este antígeno (Celada y Welshons., 1963 y Bennett y col., 1975). Además, la expresión del antígeno en individuos Tfm es indicativo de que no es dependiente de la testosterona, ya que los tejidos de individuos Tfm no responden a esta hormona por carecer de su receptor específico en sus células.

Por lo tanto, se asumió la presencia en el cromosoma Y de un gen estructural o regulador de la expresión del Sxs, suposición que encontró apoyo en el hecho de que los individuos con dos cromosomas Y expresaban más antígeno que los machos normales (Wachtel y col.,

1975). Posteriormente, se tuvieron evidencias de que el gen para el Sxs podría estar localizado en el brazo corto del cromosoma Y. Así por ejemplo, un individuo con un cromosoma Y que es un isocromosoma del brazo largo era Sxs negativo. Además individuos con cariotipo 45X más un pequeño cromosoma metacéntrico originado a partir del cromosoma Y eran Sxs positivos (Faggiano y col., 1980).

Koo y col. (1977) apoyaron la idea de que el gen estructural para el Sxs estaba localizado en el brazo corto del cromosoma Y o bien en el largo muy próximo al centromero. La segunda posibilidad parecía más probable por el hecho de que individuos con una deleción de todo o parte del brazo largo del cromosoma Y eran Sxs negativos (Rosenfeld y col., 1979).

A pesar de todo es muy probable que el gen que se localiza en el cromosoma Y sea un gen regulador más que estructural ya que Wachtel y col. (1976b) describieron tanto machos XX como hermafroditas verdaderos XX que eran Sxs positivos, por lo que concluyeron que el gen estructural para el Sxs no debería estar localizado en el cromosoma Y. Por lo tanto, el gen estructural del Sxs podría ser autosómico o ligado al cromosoma X.

Los casos de mujeres XY analizados posteriormente fueron tanto Sxs positivos como negativos (Wachtel y col., 1980b). Además, se encontraron hembras X0 Sxs positivas, que acabaron siendo la mayoría (Wolf y col., 1980b y Waibel y col., 1987), aunque hay excepciones de mujeres X0 que fueron Sxs negativas (Casanova-Bettane y Fellous, 1981).

Por otra parte, todos los hombres XX analizados han sido Sxs positivos independientemente de si portan o no parte del cromosoma Y (Wachtel y col. 1976b y De la Chapelle y col. 1978).

Se han descrito también hombres XX en donde tanto ellos como

sus madres eran Sxs positivos. Para explicar este hecho, De la Chapelle y col. (1978) y De la Chapelle (1981) propusieron la idea de que el gen estructural para el antígeno Sxs, en caso de estar localizado en el cromosoma Y, formaría una familia multigénica, de manera que estos individuos XX Sxs positivos podrían explicarse por tanslocación de parte del cromosoma Y al X. Sin embargo Winters y col. (1979), Moreira-Filho y col. (1980), Waibel y col. (1987) y Wachtel (1983), han demostrado la presencia de Sxs en hermafroditas verdaderos con cariotipo XX sin que en ellos se hayan podido detectar secuencias del cromosoma Y. Resulta evidente por tanto que el gen Sxs no es holándrico.

Wolf y col. (1980a) analizaron individuos con cariotipo 45X0 y mosaicos 45X/46Xi(Xq) y en todos ellos se expresa el antígeno. Demostraron también que hembras XX con delección del brazo corto de uno de los X son Sxs positivas, mientras que aquellas en que el brazo perdido es el largo son Sxs negativas. Postularon que el gen estructural podría ser autosómico y estar regulado por un gen represor ligado al cromosoma X, que debería escapar a la inactivación.

Dado que la expresión del antígeno está asociada a la pérdida de un segmento del cromosoma X (Xp223), es en este segmento donde se cree podría estar localizado el gen regulador represor (en este mismo segmento Xp223 se han descrito varios genes que escapan a la inactivación), de forma que cuando se expresa en doble dosis, tal como ocurriría en hembras normales, podría ejercer su efecto represor sobre el gen estructural del Sxs, pero bastaría la pérdida de una dosis para que la represión no sea completa y se exprese el Sxs (Wolf y col. 1980a).

Estos autores proponen así un modelo que implica al menos a tres genes en la expresión del antígeno Sxs:

- 1) un gen estructural, no localizado en el cromosoma Y, que

podría ser autosómico.

- 2) un gen regulador con efecto represor localizado en el cromosoma X, y
- 3) un gen regulador activador localizado en el cromosoma Y. El producto del gen activador del cromosoma Y puede actuar reprimiendo directamente el gen represor del X, inactivando el producto represor o bien activando el gen estructural.

Esta idea está de acuerdo con los resultados de Bernstein y col. (1980), quienes describen una duplicación del brazo corto del cromosoma X que, a pesar de la presencia del cromosoma Y, hace que no se exprese el antígeno Sxs. Esto, por otra parte, es algo contradictorio ya que los individuos XXY son Sxs positivos, aunque con unos niveles más bajos que los machos normales.

En ratones X0, al igual que en humanos con síndrome de Turner, se han descrito individuos Sxs positivos (Engel y col., 1981 y Koo y col., 1983) y Sxs negativos (Wiberg y Mayerová., 1985), aunque aquellos mostraron niveles más bajos que los machos normales, lo que sugiere que, también en ratón el gen Sxs es autosómico o ligado al X.

Con objeto de explicar el desarrollo ovárico en individuos Sxs positivos, Wiberg y col. (1982) ampliaron el grupo de genes incluyendo un gen ligado al cromosoma X que codificaría para el receptor específico del Sxs, de forma que una mutación en este gen conduciría a la presencia de un receptor incapaz de unirse al antígeno.

Posteriormente, Adinolfi y col. (1982) y Polani y Adinolfi (1983), sugieren que el locus autosómico del Sxs produce en realidad un precursor de este antígeno, al que denominan H-Yp. Este precursor

podría ser detectado serológicamente, pero no podría inducir una diferenciación testicular. El producto del gen localizado en el cromosoma Y actuaría en un proceso de maduración de este H-Yp, que se convertiría en H-Ya que presentaría tanto la capacidad de reaccionar con el suero como la de inducir la diferenciación sexual masculina (este H-Ya sería el Sxs maduro). El gen del cromosoma X transformaría el H-Yp en H-Yr, producto que habría perdido la capacidad de reaccionar con el suero y, por supuesto, no habría adquirido la capacidad de inducir la diferenciación testicular. De esta forma los autores pueden explicar presencia de Sxs (H-Yp) en individuos que no muestran tejido testicular.

Finalmente, el postulado de que el gen estructural para el Sxs es autosómico (Wolf, 1978, 1979, 1980 y 1981; Adinolfi y col., 1982; Polani y Adinolfi, 1983), ha sido confirmado por evidencias moleculares ya que Lau y col. (1986, 1987) clonaron un gen, al que denominaron MEA (Male Enhanced Antigen) localizado en el cromosoma 6 humano y demostraron que era un buen candidato para ser el gen estructural del Sxs.

Algo parecido ocurre en *Myopus shisticolor*, donde los individuos X*Y, X0, X*0 y X*X son Sxs positivos (Wiberg y col., 1982). No se conoce si el X* es o no portador de secuencias del cromosoma Y, pero es muy probable que el gen para el Sxs no este localizado en el cromosoma Y, sino que sea autosómico.

Al igual que en mamíferos, el gen para el Sxs de las especies con determinismo del sexo ZZ/ZW probablemente no está localizado en el cromosoma W, ya que la inducción de la producción de Sxs por las hormonas sexuales en individuos ZZ, indica que este gen se encuentra en ambos sexos y podría estar localizado en un autosoma o en el cromosoma Z. (Müller y col., 1979, 1980a; Wachtel y col., 1980).

ASPECTOS MOLECULARES DEL ANTIGENO Sxs

El antígeno Sxs es un antígeno menor de histocompatibilidad que se encuentra en la membrana de todas las células de individuos de sexo heterogamético y en la membrana de las células somáticas gonadales. En el primer caso, está unido de forma inespecífica a dímeros HLA- β_2 -microglubulina, unión que se da también por otros muchos antígenos menores y muchas proteínas, mientras que en el segundo caso, está unido a un receptor específico.

A pesar de estar tan extendido, aún no se ha podido aislar debido a que su presencia en la superficie celular es muy reducida. Este hecho hace que las características moleculares del Sxs no se conozcan aún. Sin embargo, se tienen algunos datos que han sido inferidos a través de experiencias en las que se ha empleado como fuente de antígeno Sxs libre, el excretado por células Daudi cultivadas en un medio sin suero bovino fetal. Así, Nagai y col. (1979), demostraron que el Sxs excretado al medio por células Daudi es una proteína de vida media alta y con capacidad para formar grandes polímeros, que son extremadamente hidrofóbicos, por medio de puentes disulfuro.

De entre todos los polímeros de proteínas hidrofóbicas excretados por las células Daudi, el receptor específico de la membrana plasmática de la células ováricas de vacas fetales absorbe selectivamente polímeros de una subunidad con un peso molecular de 18000 daltons. Estos polímeros oscilan entre 86000 a 36000 daltons. Los polímeros mayores a 86000 daltons no pueden unirse al receptor específico. Sin embargo, estos polímeros sí son capaces de retirar la capacidad citotóxica frente a células de macho de un suero anti-Sxs, lo que indica que retienen el determinante antigénico del Sxs, aunque su capacidad para unirse al receptor específico se ve disminuida por la polimerización.

Un dato interesante es que una vez unidos al receptor los polímeros son rápidamente reducidos a su forma monomérica de 18000 daltons, lo que podría indicar que esta forma monomérica es la forma funcional del Sxs. La capacidad de unirse al receptor específico declina rápidamente alrededor de la cuarta semana de conservación del medio a 0°C.

Posteriormente Iwata y col (1979) describieron una variante de la línea Daudi que, aunque excreta grandes cantidades de la forma monomérica del Sxs (18000 daltons), también tienen capacidad para retener parte de éste en su membrana. De hecho, estas células absorben los anticuerpos del suero anti-Sxs incluso mucho más de lo que lo hacen las células esplénicas de macho de la línea de ratón BALB/C.

La retención de parte del antígeno Sxs por estas células no es debida a que se hayan convertido en HLA+ ni β_2m+ , lo que indica que la mutación ha afectado al propio antígeno Sxs de manera que éste puede unirse a la membrana utilizando otras proteínas y no los dímeros HLA- β_2m . En la mutación probablemente esté implicada la pérdida de al menos un residuo de cisteína ya que este antígeno ha perdido la capacidad de formar polímeros a través de puentes disulfuro. Además, este Sxs alterado ha perdido la capacidad de unirse al receptor específico de las células ováricas de embrión de vaca y, sin embargo, conserva la capacidad de absorber los anticuerpos anti-Sxs del suero, lo que indica que retiene su determinante antigénico. Estos hechos indican claramente que el determinante antigénico del Sxs es una parte de la molécula diferente de la que interacciona con el receptor específico.

Hall y col. (1981), Bradley y Heslop (1985a) y Bradley y col. (1987b) propusieron también un peso molecular comprendido entre 15000 y 18000 daltons para el Sxs a partir de datos de inmunoprecipitación del medio de cultivo de células Daudi con

anticuerpos anti-Sxs. Hall y Wachtel (1980) pusieron también de manifiesto la presencia de moléculas de 18000 y 30000 daltons en el Sxs de células de Sertoli mediante electroforesis bidimensional de alta resolución. Estos autores postularon que la molécula de 30000 daltons pudiese ser un dímero.

Por otro lado, Ohno y col. (1981) describen el antígeno Sxs como un polipéptido hidrofóbico que consta aproximadamente de 160 aminoácidos y unidos a este no más de 5 residuos glucosaminos. Shapiro y Erickson (1981), trataron esplenocitos de macho con diferentes enzimas proteolíticas (Termolisina, tripsina y quimotripsina) y glucolíticas (β -galactosidasa y galacto oxidasa) y absorbieron después estas células con suero anti-Sxs. Demostraron así, que las células que han sido tratadas con enzimas proteolíticas no ven alterada su capacidad de retirar los anticuerpos del suero, mientras que aquellas que han sido tratadas con enzimas glucolíticas pierden esta capacidad, lo que indica que el determinante antigénico del Sxs no es una proteína, sino un carbohidrato, es decir los residuos glucosaminos unidos a la parte proteica.

Posteriormente, Shapiro y Goldberg (1984) volvieron a confirmar que el determinante antigénico del Sxs es un glicoconjugado que posee residuos de galactosa internos y terminales no reducidos. Para ello, realizaron tratamientos de células Sxs positivas con enzimas que alteran los carbohidratos (Galactosa oxidasa y β -galactosidasa) y comprobaron después la capacidad de éstas para absorber un anticuerpo monoclonal anti-Sxs.

ASPECTOS FUNCIONALES DE LOS ANTIGENOS ESPECIFICOS DEL SEXO HETEROGAMETICO

El alto grado de conservadurismo evolutivo del Sxs, que se ha estimado se extiende a lo largo de 300 millones de años (Wachtel y col. 1975a), sugiere que este antígeno debe desempeñar un importante papel que de algún modo está asociado con el sexo heterogamético.

Wachtel y col. (1975b) basándose en esta idea, propusieron que el Sxs es el producto del gen determinante de testículo conocido como Tdy en ratón y como TDF en humanos. De forma que el primordio gonadal indiferenciado se diferenciaría hacia testículo en presencia de Sxs y, consecuentemente, el desarrollo posterior del individuo le llevaría a tener un fenotipo masculino.

Esta suposición implicaría la necesidad de que el antígeno Sxs se expresase muy tempranamente en el desarrollo embriológico, como realmente demostraron Krco y Goldberg (1976) encontrando antígeno Sxs en embriones de ratón en estadio de 8 células.

Según esta hipótesis, el Sxs se ligaría a las células de la gónada indiferenciada y, una vez saturadas de Sxs, estas células son inducidas a organizar túnica albugínea y túbulos seminíferos.

Al igual que muchos antígenos implicados en la organogénesis, el antígeno Sxs podría ejercer su función en la diferenciación del testículo mediante el establecimiento de relaciones célula a célula (Nagai y col., 1979; Müller, 1981; Wachtel, 1981).

La relación existente entre el desarrollo testicular y presencia de Sxs se vio apoyada por numerosos casos. Se encontró en humanos que machos XX y hermafroditas verdaderos XX que presentaban tejido testicular eran también Sxs positivos (Wachtel y col. 1976b), mientras que hembras fértiles XY de *Myopus schisticolor* eran Sxs negativas

(Wachtel y col 1976a). Además, Jiménez y col. (1988) encontraron niveles intermedios de Sxs en intersexos de la especie *Talpa occidentalis* que presentaban ovotestes y por tanto diferenciación testicular.

Las experiencias de disociación y reagregación celular realizadas por Zenzes y col. (1978b y c) demostraban que si se dejaban reasociar células ováricas o testiculares disociadas, éstas se reorganizaban en sus estructuras histológicas típicas. Sin embargo, células testiculares cultivadas en presencia de suero anti-Sxs se organizaban en estructuras semejantes a folículos ováricos, mientras que en presencia de suero anti H-1 o suero normal no se producía este fenómeno.

Los mismos autores demostraron que células ováricas disociadas se reorganizaban en estructuras semejantes a túbulos seminíferos en presencia de Sxs procedente del cultivo de células testiculares, responsabilizando al Sxs de este cambio histomorfológico que, además, iba acompañado de un cambio funcional, ya que estas células presentaron receptores para la hormona luteinizante y para la gonadotropina corionica humana (Müller y col. 1978c) características que son típicas de células testiculares de recién nacidos pero no de células ováricas de recién nacidos (Siebers y col. 1977).

La hipótesis de Wachtel también encontró apoyo en el hecho de que sólo las células de Sertoli son productoras de Sxs. Zenzes y col. (1978).

Wachtel (1981) demostró que células XX de ovario o ZZ de testículo, es decir, células procedentes de gónadas del sexo homogamético de vaca, perro, pollo y *Xenopus laevis*, normalmente Sxs negativas, se convierten en Sxs positivas después de ser expuestas a sobrenadante de testículo de rata o suero de ternero como fuente de Sxs libre, demostrando así la presencia en estas células de un receptor del Sxs, lo que constituyó otro dato que apoyó el posible papel de este

antígeno en la diferenciación testicular. El receptor para el Sxs se encontró en las células somáticas gonadales de ambos sexos.

Por otro lado, el antígeno Sxs de diferentes especies puede competir por su unión al receptor, por lo que la unión de Sxs de humanos es inhibida por la exposición de las células al Sxs de suero de ratón, demostrando así, no sólo el alto grado de conservadurismo evolutivo del antígeno Sxs, sino también el de su receptor en las células somáticas de la gónada.

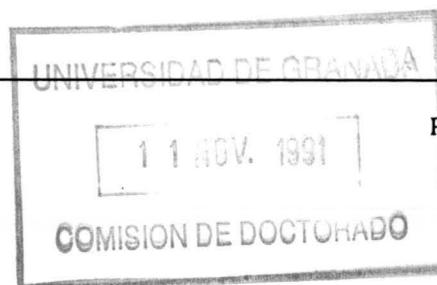
Se ha estimado que cada célula ovárica posee alrededor de 300.000 receptores libres para el Sxs en su membrana, sin embargo, en las células testiculares, la mayoría de ellos están ocupados (Ohno 1979).

Estos hechos inducen a pensar que la presencia de antígeno Sxs hace que el primordio gonadal indiferenciado se diferencie hacia testículo independientemente del cariotipo del individuo (Müller y col. 1978c).

Se obtuvo un resultado concluyente a favor del papel diferenciador de testículo del Sxs cuando Nagai y col. (1979) demostraron que la interacción prolongada durante varios días de Sxs procedente del cultivo de células Daudi con células de ovarios fetales de vaca inducía en estos ovarios la formación de túnica albugínea y túbulos seminíferos.

También apoyaba el papel del Sxs en la diferenciación sexual es la descripción que Winters y col. (1979) hicieron de un verdadero hermafrodita con ovotestes en los que la parte testicular era Sxs positiva y la ovárica Sxs negativa.

Wachtel y col. (1980c) demuestran la presencia de Sxs en freemartins de vaca tanto en suero como en sus células lo que para ellos constituía una clara evidencia de que el Sxs producido por el individuo XY había pasado a través de la anastomosis vascular entre ambos



uniéndose al receptor específico de las células somáticas de la gónada del individuo XX, produciendo su masculinización.

Por otro lado, el hecho de que en aves el sexo heterogamético sea el femenino, y que éste sea precisamente el sexo que expresa el Sxs, hace suponer que en estas especies este antígeno sea el responsable de la diferenciación ovárica, planteando por tanto el problema de cómo una misma molécula puede ser inductora de testículo en mamíferos y de ovario en aves (Wachtel y col., 1980a).

Esta suposición encontró apoyo en las experiencias de Weniger (1961) y de Akram y Weniger (1968) que demuestran que cuando se cultivan conjuntamente testículos embrionarios de mamífero y de ave, el de ave se feminiza responsabilizando al Sxs de este efecto. Además, Zenzes y col. (1980) demuestran que cultivos rotatorios de células testiculares de pollo disociadas organizan estructuras ováricas en presencia de Sxs procedente de cultivos de células testiculares de rata o de cultivos de células Daudi. Si, además de Sxs, se adicionaba al medio suero anti-Sxs, el efecto de reversión sexual no se producía, de forma que las células se organizaban en estructuras testiculares, tal como corresponde a su genotipo. De acuerdo con estos resultados, el cultivo conjunto de las células testiculares de pollo y células testiculares de rata inducía la organización de un ovoteste, indicando que el Sxs es el responsable de la diferenciación hacia el sexo heterogamético, el masculino en mamíferos, y el femenino en aves.

En correspondencia perfecta con los datos sobre reasociación de células gonadales de pollo en presencia y ausencia de Sxs, los casos de freemartinismo en aves muestran un comportamiento inverso al de mamíferos, ya que en éstas el testículo del individuo ZZ se feminiza (Lutz y Lutz-Ostertag, 1958).

Además, Müller y col. (1979) demuestran que tras feminizar

embriones de pollo macho con estradiol, sus testículos, normalmente Sxs negativos, se convierten en ovotestes que expresan el Sxs. De forma similar, en el anfibio *Xenopus laevis*, con un determinismo del sexo de tipo ZZ/ZW, los machos expuestos a estradiol se convierten en hembras funcionales y el Sxs aparece en sus células gonadales aunque no en las somáticas.

Por otro lado, el antígeno Sxs de testículo de ratón se une de forma específica a las células de testículos ZZ de pollos y de *Xenopus* machos (Wachtel y col., 1980a).

Todo parece indicar que el antígeno Sxs está implicado en la diferenciación ovárica de estas especies, y que, al menos en estas especies y posiblemente en otras con un determinismo del sexo de tipo ZZ/ZW la expresión del antígeno Sxs, puede estar mediada por las hormonas sexuales, dado que con estas hormonas se puede revertir el sexo en estas especies, ya sea parcialmente, como ocurre en aves, o totalmente como ocurre en anfibios.

Una serie de datos sugieren que en mamíferos la expresión del antígeno Sxs puede depender también de la testosterona. Así, la orquidectomía de ratones recién nacidos de la línea C57BL hace que sus transplantes de piel no sean rechazados por las hembras de la misma línea. De acuerdo con esto, la antigenicidad de la piel de individuos neonatos se pierde tras mantener la piel transplantada en una hembra durante algún tiempo de forma que después no es rechazada por otra hembra.

Además, la capacidad de respuesta de las hembras frente al antígeno Sxs se ve disminuida tras ser tratadas con testosterona desde su nacimiento, y la piel de machos tratados con un análogo no funcional de la testosterona sobrevive en hembras.

Sin embargo, la interpretación de estos hechos no está exenta de

problemas, ya que la testosterona puede tener un efecto inhibitor de la respuesta inmune. Además, sólo en aves y en anfibios se ha podido conseguir una reversión sexual total o parcial mediante tratamiento con hormonas sexuales, mientras que en mamíferos esto no ha sido posible, ya que la testosterona es producto de los testículos una vez producida la diferenciación sexual.

Por otra parte, la presencia de Sxs en hembras Tfm (XY) indica que la acción de la testosterona sobre la expresión del Sxs en mamíferos no está mediada por los órganos diana de esta hormona, ya que los tejidos de estos individuos han perdido la capacidad de responder a la testosterona, motivo por el cual se desarrollan como hembras aunque tengan testículos que producen la hormona (Erickson, 1977).

Existían pues un elevado número de pruebas a favor de un papel relevante del antígeno Sxs en la diferenciación sexual primaria. Sin embargo, estas pruebas se acumularon antes de que se descubriera que se podía estar tratando con diferentes antígenos, por lo que, inicialmente, se emitió la hipótesis de que el antígeno H-Y era el mejor candidato para ser el producto del gen Tdy, o TDF.

Sin embargo, pronto empezaron a aparecer individuos en donde no se observaba la correspondencia entre presencia de tejido testicular y de alguno de los antígenos específicos del sexo heterogamético.

Melvold y col. (1977) describían un ratón fenotípicamente macho que carecía de H-Yt, según se podía demostrar mediante la técnica de transplantes, lo que excluye a este antígeno como molécula diferenciadora de testículo. Sin embargo, este mismo individuo aparecía como Sxs positivo mediante técnicas serológicas. Esta fué una de las primeras pruebas que hicieron sospechar de la existencia de al menos dos antígenos diferentes y que, aunque el H-Yt no fuera el producto del Tdy, sí podría serlo el Sxs, al que los autores denominaron SDM

(Serologically Detectable Male antigen).

Sin embargo, se describieron hembras Sxs positivas e individuos con tejido testicular que eran claramente Sxs negativos, por lo que tampoco este antígeno puede ser el responsable de la diferenciación testicular (ver Silvers y col., 1982).

También Sharp y col. (1980), describen un caso de una yegua XY fértil que presentaba niveles de Sxs reducidos. Selden y col. (1984) describen en perros un caso en donde algunas de las hembras, así como individuos hermafroditas XX y machos XX eran Sxs positivos, aunque en niveles más bajos que los machos normales. Tanto las hembras como alguno de los hermafroditas eran fértiles lo que indica que la presencia del Sxs no interfiere con el normal desarrollo ovárico ni con la fertilidad de los mismos.

Wolf y col. (1980a) describen también individuos con síndrome de Turner XO y 45X/46Xi (Xq), todos ellos Sxs positivos en niveles más bajos que los machos. De la Chapelle y col. (1978) describen también hembras XX fértiles con bajos niveles de Sxs.

Para explicar el desarrollo ovárico en estos casos de presencia de niveles bajos de Sxs, Wolf (1980) postuló que los títulos de Sxs son continuos y que la acción del Sxs depende de que se alcance o no un determinado umbral de concentración por encima del cual se produciría la diferenciación testicular, y por debajo del cual se produciría la diferenciación ovárica. Más raramente, se producirían ovotestes en individuos hermafroditas con niveles intermedios de Sxs.

Sin embargo, se describieron casos de machos XX en ratas y de humanos que, aunque presentaban niveles muy reducidos de Sxs, habían experimentado diferenciación testicular, lo que indica que esta diferenciación es compatible con bajos niveles de Sxs (Wachtel y col., 1976b)

Por otro lado, se ha demostrado mediante la utilización de anticuerpos monoclonales la existencia de individuos XO que tienen niveles de Sxs en un rango semejante al de los machos normales (Koo y col., 1981).

Otra posible explicación de la diferenciación ovárica en presencia de Sxs podría estar basada en la existencia de alguna mutación que afectase a la capacidad del Sxs de unirse a su receptor, o bien en la mutación o ausencia de su receptor específico en la gónada. En cualquiera de estos casos, la falta de unión entre el Sxs y su receptor podría explicar la diferenciación ovárica en individuos Sxs positivos, de forma parecida a lo que ocurre con el síndrome de feminización testicular en donde la producción de testosterona es normal pero los tejidos no tienen los receptores para ésta. Ya en 1979, Wolf proponía esta explicación al hecho de que los pacientes XY con disgenesia gonadal fuesen Sxs positivos.

Wiberg y col. (1982) atribuyen también la falta de desarrollo testicular en individuos con niveles de Sxs normales, a un fallo en el reconocimiento entre el receptor específico de la gónada y el Sxs.

Adinolfi y col. (1982) y Polani y Adinolfi (1983), basándose en su modelo sobre la genética del Sxs (ver apartado correspondiente) sugieren que las pruebas serológicas detectan en estos casos un precursor no funcional del Sxs.

Estas hipótesis proporcionan también una explicación razonable a otros casos, como los de transexualidad descritos por Engel y col. (1980) en que individuos transexuales de macho a hembra son Sxs negativos y de hembra a macho son Sxs positivos. La presencia de testículos en individuos Sxs negativos sugiere la presencia de una mutación que afecte al determinante antigénico del Sxs pero no a su capacidad de unión al receptor de la gónada. La ausencia de testículos

en individuos Sxs positivos es explicable si el determinante antigénico del Sxs no se altera pero sí lo hace su secuencia de unión al receptor, o bien, mediante la presencia de una mutación que afecte a la propia molécula receptora.

Esto estaba apoyado en la descripción de Iwata y col. (1979) de antígeno Sxs, secretado por células Daudi mutadas, que mantiene su determinante antigénico pero no su capacidad de unión al receptor específico con lo que se pueden explicar casos de individuos Sxs positivos sin desarrollo testicular.

Goulmy y col. (1983) descartaron al H-Yc como responsable de la diferenciación testicular al describir machos XX que carecen de este antígeno, no existiendo en este caso correspondencia entre presencia de H-Yc y de testículo.

Se fueron acumulando más datos en relación a esta idea cuando McLaren y col. (1984) describieron ratones Sxr' H-Yt y H-Yc negativos de sexo masculino, y por tanto con testículos, lo que hace pensar que el gen determinante de testículo y los H-Y son entidades separadas apoyando por tanto la idea de que ninguno de ellos sea el responsable de la diferenciación testicular. Los autores postulan sin embargo la posibilidad de que alguno de estos antígenos esté relacionado con otros aspectos de la reproducción, quizá con la espermatogénesis.

Burgoyne y col. (1986) describen también ratones X0Sxr' que son H-Yc negativos, aunque desarrollan testículos. Sin embargo, estos individuos no presentan espermatogénesis. Estos hechos constituyen un claro ejemplo de que el Tdy y el H-Yc son dos entidades separadas y de que este H-Yc puede estar directamente implicado en la espermatogénesis.

Esta misma idea también puede ser aplicada al H-Yt, ya que Melvod y col. (1977) encontraron individuos carentes de este antígeno

que no presentaba espermatogénesis en sus testículos.

Simpson y col. (1987) demuestran también en ratones que el Tdy y el H-Yc no son el mismo gen ya que uno de ellos (el Tdy) mapea en el brazo corto del cromosoma Y y el otro (el H-Yc) mapea en el brazo largo próximo al centromero.

Sutcliffe y Burgoyne (1989), estudian también otros casos en ratones de la cepa Sxr que guardan relación con esta hipótesis. Los autores encuentran que ratones XOSxr'(a los que llaman XOSxr**b**) tienen menor peso testicular y corporal con respecto a los XOSxr (a los que denominan XOSxr**a**). Demuestran además que, aunque los testículos de los individuos XOSxr**b** tienen células germinales al nacer, se da posteriormente una reducción muy drástica en su tamaño debida a un fallo en la proliferación de las espermatogonias. Teniendo en cuenta que los ratones Sxr**a** y Sxr**b** se diferencian por la pérdida en estos últimos de una pequeña porción del fragmento Sxr translocado del Y al X, postulan que en esta pequeña porción se encuentra localizado el gen para la espermatogénesis (al que denominan *Spy*). Puesto que estos ratones son además H-Yt negativos, el H-Yt debe encontrarse también en este mismo fragmento. En este mismo fragmento debe localizarse un posible gen implicado en el crecimiento y desarrollo (al que denominan *Gdy*) cuya pérdida sería responsable del reducido tamaño de estos ratones. Estos tres genes podrían ser entidades separadas, o bien algunos de ellos, o incluso los tres, podrían ser el mismo.

El Tdy en ratones, o TDF en humanos, volvía a ser una entidad abstracta, que no podía identificarse con ningún gen concreto.

Una visión muy diferente del problema de la diferenciación sexual es la de Mittwoch (1969, 1983, 1986, 1988 y 1990), quien defiende que el proceso de diferenciación sexual está determinado por un mayor crecimiento de la gónada del sexo heterogamético. Efectivamente, en

mamíferos el testículo crece más rápido que el ovario, mientras que en las aves es el ovario el que muestra una mayor tasa de crecimiento. Según esto Mittwoch postulaba que el posible papel del Sxs como molécula diferenciadora del sexo fuese debido a que éste incrementaba la tasa de crecimiento de la gónada de forma que en su presencia el primordio tanto de individuos XX como XY se diferenciaba como testículo.

IDENTIFICACION DEL GEN DETERMINANTE DE TESTICULO

Una forma diferente de abordar el problema de la búsqueda del TDF fue la adoptada por Page y col. (1987) y Page (1988). Estos autores clonaron un fragmento del cromosoma Y humano que parecía bastarse por sí mismo para determinar el desarrollo sexual masculino. De este fragmento aislaron un gen, conocido como ZFY, que, al igual que se demostró en su tiempo para los antígenos específicos del sexo heterogamético, había sido muy conservado a lo largo de la evolución, ya que se encontró en el cromosoma Y de varias especies de mamíferos. También aislaron otro gen relacionado, localizado en el cromosoma X, al que llamaron ZFX (Schneider y col., 1989; Palmer y col., 1990).

El ZFY codifica para una proteína que presenta un dominio con múltiples "dedos de Zinc" por lo que probablemente ejerza su función uniéndose a una secuencia específica en el ADN, pudiendo actuar como factor de transcripción de otros genes que pudieran intervenir en el desarrollo gonadal (Mardon y Page, 1989).

En ratones, el ZFY tenía dos homólogos ligados ambos al cromosoma Y, conocidos como Zfy1 y Zfy2. El descubrimiento de ratones

con testículos carentes de ambos genes los excluía definitivamente como genes determinantes de testículo (Koopman y col. 1989).

Este hecho coincidía con el descubrimiento de Sinclair y col. (1988) de que el Zfy era autosómico en marsupiales, siendo en estos organismo el cromosoma Y determinante de testículo.

El hecho de que también se pierde la información para el Zfy en aquellos ratones Sxrb que presentaban testículo pero carecían de espermatogénesis y de que el Zfy se exprese en testículo y, posiblemente, en las células germinales, hace de éste un buen candidato para el gen de la espermatogénesis.

En relación con este tema, Palmer y col. (1989) describen tres casos de machos XX y un intersexo también XX carentes todos ellos de Zfy. El fenotipo masculino de estos individuos era debido a un intercambio de secuencias entre los cromosomas X e Y que redefinían una nueva región en la que debería estar localizado el gen determinante de testículo (TDF). Esta región era el fragmento 1A1 del cromosoma Y. Un segmento de 14 Kb se identificó como gen de copia única dentro de este fragmento y se demostró su presencia en el cromosoma Y de diferentes especies. Este gen se denominó SRY (sex determining región of the Y), excluyendo deliberadamente la palabra "testículo" ya que este mismo gen determinaría ovario en aquellas especies en las que el sexo heterogamético es el femenino.

La demostración concluyente de que el SRY es el gen determinante de testículo vino de la mano de Koopman y col. (1991) a través de la obtención de ratones XX transgénicos para el SRY que efectivamente se desarrollaban como machos y presentaban testículos. El SRY se expresa en el puente urogenital en el momento de la diferenciación sexual y en testículos de individuos adultos pero aunque este gen sea el determinante de testículo, en el desarrollo masculino deben de intervenir otros genes, posiblemente con una actuación en

casca a partir del SRY, ya que aunque estos ratones transgénicos mostraban desarrollo testicular, carecían de espermatogénesis.

DESARROLLO EMBRIONARIO DE LAS GONADAS DE *Gallus domesticus*

Ya en estado indiferenciado, se pueden distinguir dos regiones en las gónadas de ambos sexos: el cortex, de donde derivará el tejido ovárico, y la médula, de donde derivará el tejido testicular.

Existe asimetría en el desarrollo de las gónadas de las aves, de forma que la gónada primordial izquierda posee un cortex ovárico incipiente rodeando la médula, mientras que la gónada derecha está compuesta principalmente por médula rodeada por meras trazas de cortex. Esto implica que la gónada derecha posee mayor preponderancia a desarrollarse como testículo desde un principio, y que la izquierda es potencialmente bisexual, pudiendo diferenciarse como testículo o como ovario. La asimetría es más patente en el caso de la hembra en donde la gónada derecha sufre un proceso de regresión a medida que avanza el desarrollo embrionario, quedando reducida a un rudimento no funcional de muy pequeño tamaño, mientras la izquierda sigue un desarrollo normal hacia ovario, incluso con una mayor tasa de crecimiento que los testículos. Sin embargo, en los machos, ambos testículos presentan aproximadamente el mismo tamaño, aunque el izquierdo es siempre ligeramente más grande.

Aunque el período de desarrollo sexual indiferenciado se extiende desde el tercer día de incubación hasta el octavo, en este período existe ya una diferencia fisiológica de las gónadas de ambos sexos. Entre los días quinto y sexto, se diferencian los cordones sexuales primarios, que

darán lugar a los túbulos seminíferos en los testículos y a la médula en los ovarios.

El proceso de diferenciación sexual propiamente dicho, comienza entre los días sexto y octavo.

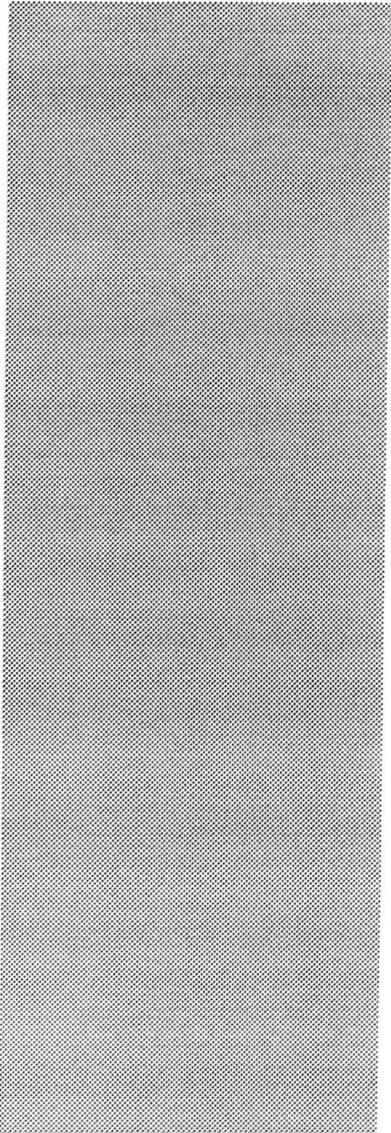
Durante el desarrollo femenino es fácil reconocer dos regiones en la gónada izquierda, el cortex y la médula, mientras que en la derecha solamente existe una médula con numerosas células ricas en contenido lipídico. Como ya se ha comentado, esta gónada derecha se va reduciendo a medida que avanza el desarrollo.

El primer signo de diferenciación sexual en la hembra es la aparición de un cortex ovárico en la gónada izquierda, formado por varias capas de células columnares. Este cortex va creciendo y originando los cordones sexuales secundarios, que se forman gracias a la activa división de las células germinales y somáticas de su capa más interna. Se van formando así lobulaciones procedentes del cortex que invaden la médula a modo de digitaciones, que están compuestas por agrupaciones de oogonias y células epiteliales rodeadas por una túnica albugínea. Paralelamente, la degeneración de los cordones sexuales primarios de esta médula origina dos regiones, una externa y compacta y otra interna de aspecto reticular.

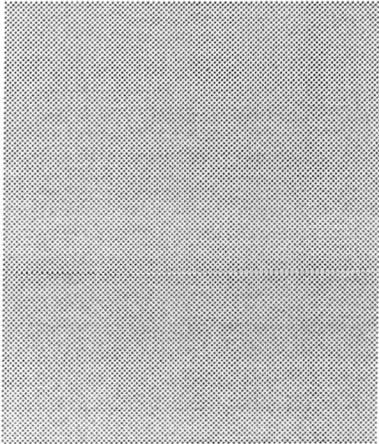
En las hembras, la gónada derecha aparece muy reducida y formada por una retícula de células epiteliales, mientras que la izquierda se ha desarrollado completamente, y ha dado lugar a un voluminoso ovario, de forma similar a la de un testículo, aunque bastante más aplanada. Este ovario está formado por un cortex compuesto por numerosas lobulaciones rodeadas de una túnica albugínea, que están constituidas a su vez por células germinales y epiteliales. La médula aparece también con aspecto reticular como consecuencia de la degeneración de los cordones sexuales primarios (ver figuras 13b y d).

En cuanto a la diferenciación sexual masculina, la gónada izquierda presenta un cortex ovárico incipiente, formado en principio por células cuboidales, que se transforman en células redondeadas hacia el noveno día de incubación. En esta gónada izquierda, dicho cortex (también llamado epitelio germinativo) va reduciéndose paulatinamente hasta desaparecer. Sin embargo, el de la gónada derecha degenera y desaparece en el mismo momento en que se diferencian los cordones sexuales primarios. En ambos testículos, los cordones sexuales primarios se van transformando en túbulos seminíferos, que en un principio son rectos y que posteriormente se vuelven sinuosos y dan lugar a numerosas anastomosis que forman una red. Los cordones están formados por células epiteliales de soporte y por células germinales, que son fácilmente distinguibles por su mayor tamaño. El tejido intersticial está formado por células con abundante contenido lipídico, encargadas de la producción de las hormonas sexuales. La capa externa de este tejido forma la túnica albugínea, que en un principio tiene como misión separar al cortex de los túbulos seminíferos.

Al final del proceso de diferenciación sexual masculina, encontramos dos testículos de forma ovoidal, aproximadamente del mismo tamaño, con numerosos túbulos seminíferos formados por células de Sertoli y células germinales. Los túbulos están inmersos en una matriz de células intersticiales, y el conjunto rodeado por una túnica albugínea (ver figuras 13a y c).



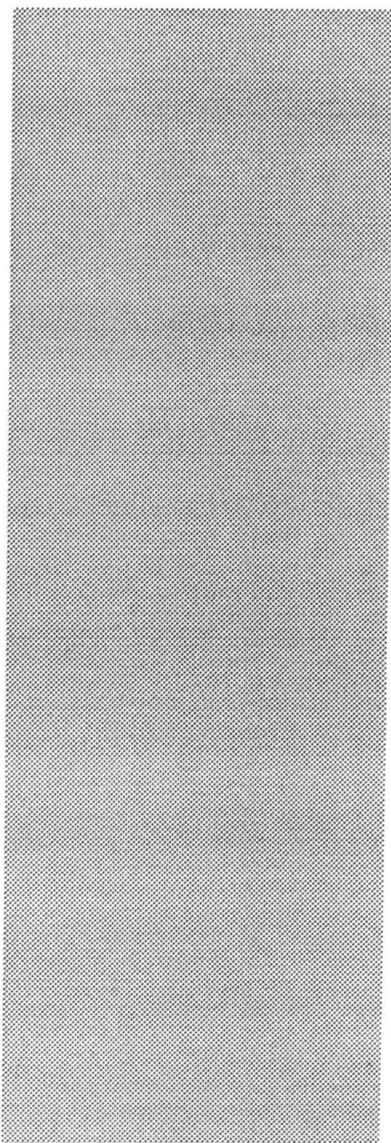
OBJETIVOS



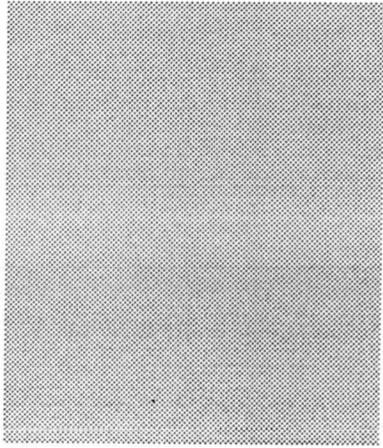
OBJETIVOS

Una de las principales conclusiones que podemos extraer de todo lo expuesto hasta ahora es la falta de homogeneidad que afecta a diversos aspectos de la investigación de los antígenos masculinos. Esta heterogeneidad implica la existencia de una gran variabilidad metodológica para su detección, con resultados que no siempre son extrapolables entre sí, así como la multiplicidad de términos con sinonimias generalmente confusas. Como resultado de ésto ha sido relativamente frecuente el empleo de términos y conceptos ambiguos a la hora de referirse a un determinado antígeno, lo que, en muchas ocasiones, ha dificultado la posibilidad de contrastar los resultados de investigaciones llevadas a cabo en laboratorios diferentes. Estos hechos han llevado a algún autor a plantearse incluso la oportunidad o no de continuar las investigaciones sobre los antígenos específicos del sexo masculino (Goodfellow, 1983). Sin embargo, lejos de haberse demostrado una falta absoluta de relación entre estos antígenos masculinos y los procesos de determinismo y diferenciación del sexo, existen por el contrario numerosos puntos de coincidencia que son dignos de ser investigados. Resulta obvio, por tanto, que para realizar tales investigaciones, es necesario racionalizar la terminología y estandarizar las técnicas de detección, como un paso previo imprescindible. El establecimiento de las condiciones óptimas para llevar a cabo las distintas técnicas, permitirá obtener resultados que podrán ser interpretados sin ambigüedad y contribuirán, por tanto, al esclarecimiento de las funciones de los antígenos específicos del sexo. De acuerdo con estas premisas, en el presente trabajo nos hemos fijado los objetivos que se relacionan a continuación:

- 1) Estandarizar las técnicas de detección del antígeno Sxs, ya sea localizado en la membrana celular, como en su forma libre en diversos fluidos orgánicos, lo que nos permitirá explicar los resultados contradictorios existentes en relación a este antígeno, así como evaluar la fiabilidad de los datos bibliográficos disponibles. Para la consecución de este objetivo resulta imprescindible tratar en profundidad el efecto y la contribución de todos los reactivos biológicos utilizados en este tipo de técnicas.
- 2) Una vez estandarizadas las técnicas, el siguiente objetivo consiste en la obtención de una fuente de antígeno Sxs en su forma libre y que conserve su actividad biológica. La consecución de este objetivo abrirá la posibilidad de un estudio detallado de las funciones que este antígeno pueda tener en relación a la diferenciación sexual primaria.
- 3) El logro de los objetivos anteriores nos permitirá administrar artificialmente antígeno Sxs durante el desarrollo embrionario y determinar las posibles anomalías que puedan producirse durante la diferenciación sexual primaria, obteniendo así datos a partir de los cuales pueda inferirse el papel que el Sxs juega en esta diferenciación.



MATERIAL Y METODOS



MATERIAL

MATERIAL UTILIZADO EN LA PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

Para la obtención de sueros anti-Sxs se hace imprescindible trabajar con una raza consanguínea de rata o de ratón, de forma que todos los individuos sean genéticamente idénticos y las únicas diferencias entre machos y hembras sean exclusivamente debidas al sexo. En nuestro caso hemos utilizado la línea de rata Lewis para la obtención de los sueros anti-Sxs, y la línea de ratón C57BL para la obtención de las diferentes células diana.

MATERIAL UTILIZADO EN LOS TRATAMIENTOS DE EMBRIONES

Teniendo en cuenta los problemas obvios que acarrearía el tratamiento *in vivo* con antígeno Sxs de embriones de mamíferos, decidimos utilizar para la realización de estas experiencias embriones de aves, concretamente de la especie *Gallus domesticus*. De esta forma, los embriones pueden manipularse con relativa facilidad y la supervivencia puede controlarse periódicamente durante todo el período de incubación.

METODOS

OBTENCION DE FUENTES DE ANTIGENO Sxs

Como fuentes de antígeno Sxs libre se han utilizado diferentes fluidos de origen masculino (suero de macho, sobrenadante de testículo y líquido de epidídimo), medio de cultivo condicionado por crecimiento de células de Sertoli y sobrenadante de ovario de gallina.

A continuación se detallan los pasos necesarios para la obtención de las diferentes fuentes de antígeno Sxs libre.

Suero de rata macho

Obtención del suero

- 1) Se extrae la sangre de una rata macho mediante un corte en la subclavia y se coloca en un tubo de centrifuga de 15ml.
- 2) Se incuba a 37°C durante 1 hora permitiendo que coagule.
- 3) Se centrifuga a 4200 rpm durante 20 min. con objeto de separar el suero, que se alicuota en tubos Eppendorf y se guarda a -80°C hasta su uso.

Preparación del suero para su utilización como fuente de antígeno Sxs

La utilización de este suero como fuente de antígeno Sxs, en los tratamientos *in vivo* de embriones, requiere su previa inactivación a 56°C durante 30 min. y su posterior esterilización por filtración.

Preparación del suero para la medida de sus niveles de Sxs.

En aquellas pruebas en las que fué necesario medir los niveles de antígeno Sxs de este suero, mediante absorción del poder citotóxico de un antisuero anti-Sxs, además de ser inactivado, es imprescindible absorberlo con células de ratón hembra con objeto de eliminar posibles anticuerpos que pudiesen actuar frente a las células diana. El modo en que se ha realizado dicha absorción se describe más adelante en el apartado "Absorción de sueros con células". Por último el suero era filtrado a través de un filtro de 0.2 μ m con objeto de retirar los restos celulares.

Líquido de epidídimo

- 1) Se extraen los dos epidídimos de una rata macho separándolos cuidadosamente del tejido adiposo que los rodea¹.

¹ Es muy importante que, antes de ser troceado, el epidídimo quede perfectamente libre de tejido adiposo ya que, de lo contrario, las pequeñas gotículas de grasa que quedan en suspensión después de centrifugar impiden por completo que la solución pueda ser filtrada y por tanto que pueda ser esterilizada por filtración en los casos en que ésta es necesaria.

- 2) Los epidídimos se trocean finamente en un pocillo que contenga 1.5ml de PBS¹ sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, y se transfieren a un tubo de centrifuga de 15ml donde se incuban durante 24 horas a 4°C.
- 3) Trascurrido este tiempo, la suspensión se centrifuga a 4200 rpm durante 15 min. quedando un sobrenadante limpio de restos de tejido y de espermatozoides.
- 4) El sobrenadante se filtra pasándolo a través de filtros con tamaño de poro de 0.8µm, 0.45µm y por último de 0.2µm, con objeto de eliminar los restos celulares.

En caso de que este sobrenadante se requiriese estéril el filtro de 0.2µm se esteriliza en autoclave y la solución filtrada se recoge en un frasco estéril, realizando estos pasos en la cámara de flujo laminar.

- 5) La solución se alicuota y se guarda a -80°C hasta su uso.

Sobrenadante de testículo

- 1) Los dos testículos (con un peso comprendido entre 2.72 y 3.4g) de un macho adulto de rata Lewis son desprovistos de la túnica albugínea.
- 2) Los túbulos son troceados en un pocillo que contiene 2ml de

1 PBS (Phosphate Buffered Saline) sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺: Para preparar esta solución se disuelven 8g de NaCl, 0.2g de KCl, y 1.4g de Na₂HPO₄·2H₂O en 900ml de H₂O desionizada. Una vez disueltos los componentes el volumen se completa hasta 1000ml y el pH se ajusta entre 7.2 y 7.4.

PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} , siendo transferidos a un tubo de centrífuga e incubados a 4°C durante 24 horas.

- 3) A partir de este momento se siguen exactamente los mismos pasos descritos para la obtención del líquido de epidídimo.

Sobrenadante de ovario de gallina

- 1) Se trocean dos ovarios (con un peso aproximado de 3g) de gallina en 2ml de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} .
- 2) Posteriormente se procesan de la misma forma que los testículos de rata.

Medio condicionado por células de Sertoli

Para la obtención de esta fuente de Sxs se realizan cultivos de células de Sertoli siguiendo el método descrito por Mather y Sato (1979) con algunas modificaciones que consta de los siguientes pasos:

- 1) Se extrae un testículo y se le quita la túnica albugínea.
- 2) El testículo se coloca en medio de cultivo compuesto de una mezcla a partes iguales de DME¹

¹ DME (Dulbecco Modified Eagle Medium): Se disuelven 13.4g de DME (con glutamina) en 900ml de H_2O desionizada. Una vez disuelto se añaden 3.7g de NaHCO_3 , se completa el volumen hasta 1000ml, se ajusta el pH entre 7.2 y 7.4 con $(\text{OH})\text{Na}$, se esteriliza por filtración y se le añaden 2ml de una solución estéril de penicilina-estreptomicina (500x). Antes de su utilización se le adiciona al medio un 10% de suero bovino fetal.

y RPMI¹ 1640 conteniendo 1M de glicina y 2mM EDTA.

- 3) Los túbulos se resuspenden lentamente en este medio con la ayuda de una pipeta pasteur a la que se le ha eliminado la punta fina y ha sido flameada para evitar bordes cortantes, quedando una apertura de unos 3 a 5mm de diámetro.
- 4) Se incuban en este medio durante 15 min. A lo largo de este tiempo, las células de Leydig se lisan debido a su locación en el exterior de los túbulos.
- 5) Se dejan sedimentar los túbulos por simple gravedad y el sobrenadante se elimina.
- 6) Con objeto de separar las células mioides adheridas a los túbulos se resuspenden éstos en medio de cultivo conteniendo 0.05% de colagenasa/dispasa y se incuban en este medio durante varios min.
- 7) Los túbulos se lavan tres veces en medio de cultivo mediante sedimentación por gravedad.
- 8) Tras el último lavado se decanta el medio y los túbulos se trocean en fragmentos muy pequeños.

1 RPMI 1640: Se mezclan 100ml de RPMI 1640 (10x) sin NaHCO₃ ni glutamina con 800ml de H₂O desionizada. Una vez disuelto se añaden 0.3g de glutamina, 2g de NaHCO₃, y se completa el volumen hasta 1000ml. Se ajusta el pH entre 7.2 y 7.4 con (OH)Na, se esteriliza por filtración y se le añaden 2ml de una solución estéril de penicilina-estreptomicina (500x). Antes de su utilización se le adiciona al medio un 10% de suero bovino fetal.

- 9) Los túbulos se incuban durante 30 min. en medio con colagenasa/disypasa 0.05%, pipeteando fuertemente de vez en cuando para ayudar a la disgregación de las células que componen el túbulo.
- 10) Las células de Sertoli muestran capacidad de formar agregados que sedimentan por gravedad, quedando en el sobrenadante la mayoría de las células germinales y peritubulares, que se decantan.
- 11) Los acúmulos resultantes de células de Sertoli se lavan cuatro veces por centrifugación durante 5 min. a 1000 rpm.
- 12) Por último las células se cultivan en medio BME¹ suplementado con 10% de SBF (Suero bovino fetal) y se incuban a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.
- 13) Cuando el cultivo se hace confluyente se cambia el medio por medio BME sin SBF. Este medio, que se utilizará como fuente de Sxs, se recoge después de 48 horas y se filtra a través de un filtro de 0.2µm en condiciones de esterilidad.

Subcultivos

Cuando un cultivo alcanza la confluencia es necesario realizar

1 BME (Basal Medium Eagle): Se disuelven 9.345g de BME (con glutamina) en 900ml de H₂O desionizada. Una vez disuelto se añaden 1.68g de NaHCO₃, y se completa el volumen hasta 1000ml. Se ajusta el pH entre 7.2 y 7.4 con (OH)Na, se esteriliza por filtración y se le añaden 2ml de una solución estéril de penicilina-estreptomina (500x). Antes de su utilización se le adiciona al medio un 10% de suero bovino fetal.

subcultivos mediante el siguiente método:

- 1) Se retira el medio del frasco de cultivo con una pipeta pasteur y se sustituye por solución de Hanks¹ sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, que se cambia varias veces, con lavados intermedios para eliminar los iones Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.
- 2) Se añade una pequeña cantidad de solución de tripsina-EDTA² al frasco de cultivo para cubrir el fondo de éste y se deja incubar, controlando el proceso de tripsinización al microscopio invertido, pudiendo ayudar a que las células se despeguen golpeando el frasco con la mano.
- 3) Cuando las células se encuentran en suspensión se añaden 10ml de medio BME con 10% de SBF.
- 4) El medio conteniendo las células se reparte en dos a tres frascos dependiendo de la cantidad de células disponibles.

Técnicas de criopreservación de las células

Congelación

Las diferentes líneas celulares pueden criopreservarse a -80°C o

1 Hanks' BSS (Balanced Salt Solution) sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺: Se mezclan 100ml de Hanks'BSS (10x) y 800ml de H₂O desionizada. Se le añaden 0.35g de NaHCO₃, se completa el volumen hasta 1000ml, se ajusta el pH entre 7.2 y 7.4 con Na(OH) y se esteriliza por filtración.

2 Tripsina-EDTA: Se mezclan 10ml de una solución estéril de tripsina (1:250) al 0.5% y EDTA al 0.2% con 90ml de Hanks'BSS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺.

en nitrógeno líquido cuando ello sea necesario. Para ello se realizan los siguientes pasos:

- 1) Las células se despegan del fondo del frasco de cultivo siguiendo los pasos descritos anteriormente para la realización de subcultivos.
- 2) Una vez que las células se encuentran en suspensión en el medio de cultivo se centrifugan de nuevo a 1100 rpm durante 10 min.
- 3) Se decanta el sobrenadante y el botón celular se resuspende en medio F-10 de Ham¹ con 20% de SBF y 10% de Dimetil Sulfoxido (DMSO) a una concentración que no debe ser inferior a 6×10^6 células por ml.
- 4) La suspensión celular se reparte en alícuotas de 200 μ l en tubos Eppendorf estériles de 0.5ml de capacidad.
- 5) Las células debe entonces congelarse a una tasa de -1°C por minuto. Para ello se introducen en un congelador a -80°C en el interior de una caja de poliestireno. El grosor de las paredes de esta caja deberá haber sido calculado previamente para que el enfriamiento se lleve a cabo a la tasa adecuada.

¹ Medio F-10 de Ham (Medio para criopreservación): Se mezclan 10ml de medio F-10 de Ham (10x) sin NaHCO_3 ni glutamina con 80ml de H_2O desionizada. Una vez disuelto se añaden 0.0146g de glutamina, 0.12g de NaHCO_3 , y se completa el volumen hasta 100ml. Se ajusta el pH entre 7.2 y 7.4 con $(\text{OH})\text{Na}$, se esteriliza por filtración y se le añaden 200 μ l de una solución estéril de penicilina-estreptomicina (500x).

Descongelación

La descongelación de las células para iniciar un nuevo cultivo a partir de una muestra criopreservada debe realizarse de la forma más brusca posible. Para lo cual se realizan los siguientes pasos:

- 1) Tras sacarlo del congelador, el Eppendorf, con la muestra congelada, se introduce inmediatamente en un baño termostático a 40°C.
- 2) En cuanto el medio con las células se encuentre descongelado, se disuelve en 5 a 6ml de BME con 10% SBF y las células se incuban a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂.

OBTENCION DE SUEROS ANTI-Sxs

Se han empleado varios métodos de inmunización de los cuales se ha estudiado su capacidad de sensibilización. Los resultados de estos estudios se expondrán en el apartado correspondiente. Los aspectos técnicos de estas inmunizaciones se detallan a continuación.

Inmunización con esplenocitos de macho.

- 1) Se sacrifica un macho de rata Lewis y se le extrae el bazo, que es macerado con suavidad, con objeto de no romper las células, en un homogeneizador manual con 8ml de PBS sin

Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺.

- 2) Se dejan sedimentar los fragmentos grandes por simple gravedad y el sobrenadante se pasa a un tubo de centrifuga de 15ml.
- 3) Las células se lavan varias veces en PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, mediante centrifugaciones a 1100 rpm durante 10 min. La concentración final de células se ajusta a 40x10⁶ células/ml.
- 4) Se inoculan ratas hembras intraperitonealmente con 2ml de la suspensión celular, repitiendo el tratamiento a intervalos semanales durante 8 semanas.
- 5) Una semana después de la última dosis se anestesian las ratas con éter y se les extrae la sangre mediante un corte en la subclavia, que es recogida con una pipeta pasteur y colocada en un tubo de centrifuga de 15ml.
- 6) La sangre se incuba a 37°C durante 1 hora para que coagule. Se centrifuga entonces a 4200 rpm durante 20 min., obteniendo así el suero, que es alicuotado en tubos Eppendorf y guardado a -80°C hasta su uso.

Los sueros obtenidos a partir de diferentes individuos no se mezclaron, sino que se les asignó a cada uno de ellos un código identificativo, de forma que en una determinada prueba pudiera utilizarse siempre suero procedente del mismo animal.

Inmunización con suero de macho.

- 1) Se sacrifica un macho y se le extrae el suero en la forma que se ha indicado previamente.
- 2) Se inmunizan ratas hembras mediante inyecciones subcutáneas de 1ml de suero, administradas a intervalos semanales durante 8 semanas.
- 3) Una semana después de terminar el tratamiento las hembras inmunizadas son sacrificadas y se les extrae el suero de la forma indicada, que se guarda a -80°C hasta su uso.

Inmunización con líquido de epidídimo.

- 1) Las ratas hembras se inmunizan con líquido de epidídimo extraído de la forma descrita anteriormente durante 8 semanas a intervalos semanales con dosis subcutáneas de 1ml.
- 2) Al igual que en los casos anteriores el suero se extrae transcurrida una semana desde la última dosis, y se conserva a -80°C hasta su uso.

Inmunización con macerado de testículo.

- 1) Los dos testículos de un macho se liberan de la túnica

albugínea y se maceran en un homogeneizador manual.

- 2) Las hembras se inmunizan con inyecciones subcutáneas de 1ml del tejido macerado obtenido.
- 3) El resto del protocolo de inmunización y la obtención del suero son los mismos a los que ya nos hemos referido en anteriores apartados.

Inmunización intraesplénica con piel de macho.

- 1) Se sacrifica un macho al que se le afeita y esteriliza mediante lavados con alcohol al 70% un trozo de piel, que se separa posteriormente del resto de los tejidos y se corta en trozos de aproximadamente 1 mm².
- 2) Las hembras a inmunizar se anestesian, se atan, se les afeita el costado izquierdo a la altura del bazo y se les esteriliza la piel mediante lavados con alcohol al 70%.
- 3) Se les practica una incisión en el costado, a la altura del bazo, de 1,5 cm aproximadamente hasta llegar a la cavidad peritoneal.
- 4) A través de esta incisión, y con ayuda de unas pinzas, el bazo se saca al exterior, con cuidado de no dañarlo y de no desgarrar los vasos sanguíneos ni los tejidos a los que está unido.

- 5) Con la ayuda de unas pinzas de punta muy fina se introducen en diferentes partes del bazo 4 trozos de piel del macho introduciendo las pinzas un poco inclinadas para asegurarse de que los trozos de piel no se salgan y procurando desgarrar el bazo lo menos posible de forma que no se produzca hemorragia.
- 6) El bazo se coloca de nuevo en el interior del animal, y la herida se cierra aplicando puntos tanto en el peritoneo como en la piel.
- 7) Transcurridas 2 semanas se sacrifican las hembras y se les extrae el suero.

Inmunización con sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund.

- 1) Cada rata hembra se inmuniza con cinco dosis subcutáneas de 0.5ml de una emulsión a partes iguales de sobrenadante de testículo y coadyuvante completo de Freund¹ a intervalos semanales.
- 2) El suero se extrae, como ya se ha indicado previamente, una semana después de la última dosis.

1 Emulsión de sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund: Para la realización de esta emulsión se requieren dos jeringas a las que se acopla una aguja con dos conos, uno en cada extremo. Una mezcla a partes iguales de sobrenadante de testículo y coadyuvante completo de Freund se hace pasar de una jeringa a otra a través de la aguja hasta obtener una completa emulsión.

Inmunización intraesplénica con piel y con coadyuvante+sobrenadante de testículo.

- 1) Se corta la oreja a una rata macho y con ayuda de unas pinzas se separan las dos láminas de piel, cortándolas en trozos de 1mm de diámetro aproximadamente.
- 2) Con estos trozos de piel se procede a inmunizar hembras intraesplénicamente como ya se ha descrito anteriormente.
- 3) Tres semanas después se administra una dosis de recuerdo, mediante inoculación de 0.5ml de emulsión de sobrenadante de testículo con coadyuvante de Freund en proporciones 1:1.
- 4) Una semana después se extrae el suero.

Inmunización intraesplénica con coadyuvante y sobrenadante de testículo.

- 1) Las ratas hembras se inmunizan intraesplénicamente mediante inóculo en el bazo de 0.2ml de emulsión de sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund.
- 2) Transcurridas cuatro semanas se administra una dosis de 0.5ml de la misma emulsión por vía subcutánea.
- 3) El suero se extrae, como ya se ha indicado en otros apartados, una semana después de esta última dosis.

Suero de hembras múltiparas

Como suero anti-Sxs también ha sido probado el suero perteneciente a hembras que habían tenido entre 5 a 7 partos. Ya que Kraupen-Brown y Wachtel (1979) demostraron la existencia en hembras múltiparas de anticuerpos anti-Sxs debidos a la sensibilización de la hembra por parte del antígeno Sxs de los fetos machos de los distintos partos.

Para la obtención de este suero se cruzaron hembras Lewis con machos Lewis reiteradas veces, extrayendo el suero después de 5 a 7 partos.

PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD

Existen básicamente dos tipos de pruebas de citotoxicidad, las pruebas de citotoxicidad directas y las indirectas. En las pruebas directas las células se exponen directamente al suero anti-Sxs detectando sobre ellas la existencia o no del antígeno en función de su sensibilidad a la lisis en presencia de complemento. En las pruebas de citotoxicidad indirectas el suero se absorbe en unas determinadas condiciones con las células o soluciones de las que se quiere saber si son o no Sxs positivas, de manera que si lo son, retirarán la capacidad citotóxica del suero anti-Sxs y, posteriormente, este suero mostrará una lisis muy reducida sobre células diana Sxs positivas en una prueba directa.

Antes de ser usados, cada uno de los sueros fué titulado mediante una prueba directa sobre células tanto de macho como de hembra, utilizando en posteriores experiencias únicamente aquellos sueros en los

que la muerte específica para las células de macho fuese claramente mayor que para las células de hembra.

La técnica empleada para la realización de estas pruebas de citotoxicidad es básicamente la descrita por Goldberg y col (1971) con algunas modificaciones. En nuestras experiencias, hemos utilizado como células de diana espermatozoides, células epidérmicas disociadas, células esplénicas y células de Sertoli cultivadas.

A continuación describimos los pasos necesarios para la preparación de los distintos tipos de células diana.

Células diana

Espermatozoides

- 1) Los epidídimos de un ratón se extraen y se elimina el tejido adiposo que los rodea.
- 2) Los epidídimos se trocean finamente en un pocillo que contenga PBS con 0,5% de fructosa, liberando de esta forma los espermatozoides.
- 3) Se lavan varias veces en RPMI Mediante centrifugación y se ajustan a una concentración de 7×10^6 células/ml de RPMI.

Células epidérmicas disociadas

Para la preparación de células epidérmicas se ha seguido el

método descrito por Scheid y col. (1972) con ligeras modificaciones:

- 1) Se realiza una incisión circular cerca de la base del rabo y se tira hasta separar la piel que lo envuelve.
- 2) Se realiza un corte longitudinal y, ayudándose con unas pinzas, se extiende la piel en una placa de petri que contenga tripsina al 1% en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} , donde se incuba durante 30 min. a 37°C .
- 3) Tras este período de incubación, la piel se lava en medio BME con 20% de suero de ternero recién nacido.
- 4) Con ayuda de unas pinzas curvas, se separa la dermis de la epidermis.
- 5) Se coloca la epidermis con su parte más externa en contacto con la placa de petri.
- 6) Con ayuda de una pipeta Pasteur (en una mano) se van dejando caer sobre ella medio BME con 10% SBF.
- 7) El medio se recoge con otra pipeta (en la otra mano), con la punta flameada para evitar bordes cortantes, con la que se va realizando un proceso de raspado sobre la epidermis, liberando así las células, que se recogen junto con el medio.
- 8) Los agregados de células obtenidos de esta forma se disgregan mediante incubación en tripsina al 0.1% en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} durante 10-20 min. a 37°C .

- 9) Las células se colocan en un tubo de centrifuga y se lavan, varias veces en BME con 10% SBF y por último en RPMI sin SBF, por centrifugación durante 10 min. a 1100 rpm.
- 10) Las células se ajustan a una concentración de 7×10^6 células/ml en medio RPMI.

Células esplénicas

- 1) Se extrae el bazo que se macera en un homogeneizador manual que contiene 2 a 3ml de PBS¹, el macerado debe realizarse de forma que las células no se rompan, pero procurando la máxima disgregación posible. Una vez macerado el bazo se adicionan de 4 a 5ml más de PBS.
- 2) Se dejan sedimentar los grumos y restos de tejido.
- 3) El sobrenadante, que contiene las células esplénicas, se transfiere a un tubo de centrifuga de 15ml que con 3ml de Histopaque[®] (SIGMA) de forma que ambas soluciones no se mezclen.
- 4) Se centrifuga el tubo durante 30 min. a 1700 rpm.
- 5) Tras la centrifugación los linfocitos han quedado retenidos en la interfase entre Histopaque y PBS mientras que los

¹ PBS (Phosphate buffered saline): Se disuelven 8g de NaCl, 0.2g de KCl, 2.2g de Na₂HPO₄·7H₂O, 0.2g de KH₂PO₄, 0.1g de CaCl₂ y 0.1g de MgCl₂·6H₂O en 900ml de H₂O desionizada. Una vez disueltos los componentes el volumen se completa hasta 1000ml y el pH se ajusta entre 7.2 y 7.4.

eritrocitos han atravesado el Histopaque y se encuentran en el fondo del tubo.

- 6) Se decanta el PBS hasta que quede aproximadamente 0.5 cm por encima de la interfase, se recoge la interfase, que contiene los linfocitos, con una pipeta pasteur arrastrando también unos 0.5 cm de Histopaque por debajo de ésta, y se transfiere a otro tubo de centrifuga.
- 7) Se resuspenden las células en PBS y se lavan mediante centrifugación a 1100 rpm durante 10 min. decantando el sobrenadante.
- 8) Se repite el lavado con PBS una vez más y por ultimo se realiza otro lavado con medio de cultivo RPMI. Estos lavados tienen por objeto eliminar cualquier resto de Histopaque.
- 9) Durante el último lavado en RPMI se cuenta una muestra de la suspensión celular en un hemocitómetro y se ajustan a una concentración de 7×10^6 células/ml de RPMI.

Células de Sertoli cultivadas

Estas células se separan del frasco de cultivo tal y como se ha descrito anteriormente para la realización de subcultivos y se lavan varias veces por centrifugación a 1100 rpm durante 10 min. en BME con 10% de SBF y por último en RPMI sin SBF. Finalmente son ajustadas a una concentración de 7×10^6 células/ml de RPMI.

Suero fuente de complemento

Como fuente de complemento ha sido utilizado suero de conejo hembra. Tras su obtención, este suero se absorbe con células esplénicas de hembra antes de ser utilizado (Boyse y col., 1970). A continuación describimos los pasos a seguir para la obtención y absorción del suero de conejo:

- 1) Se frota la oreja con un algodón empapado en xileno produciendo una vasodilatación, lo que facilita la extracción de la sangre.
- 2) El suero se extrae lo antes posible mediante centrifugación a 4200 rpm durante 10 min.
- 3) Antes de ser absorbido con las células esplénicas de hembra y con objeto de evitar pérdida de complemento durante la absorción, se mezclan 9 volúmenes de suero con 1 volumen de una solución de EDTA 0.1M.
- 4) Se absorben 7 volúmenes de la solución de suero más EDTA con 1 volumen de células esplénicas de un botón celular obtenido por centrifugación a 1100 rpm durante 10 min (ver el apartado "Absorción de sueros con células").
- 5) Se limpia el suero mediante centrifugación y los iones divalentes se restauran añadiendo 1 volumen de una solución de CaCl_2 0.1M.

- 6) El suero se alicuota y se guarda a -80°C hasta su uso.

Una vez obtenidas las células diana y el suero de conejo como fuente de complemento pueden realizarse tanto pruebas de citotoxicidad directas como indirectas, según los protocolos que se describen a continuación.

Pruebas de citotoxicidad directas

- 1) Se inactiva el complemento del suero anti-Sxs mediante incubación a 56°C en baño termostático con agitación durante 30 min.
- 2) Se realizan diferentes diluciones del suero en medio RPMI sin SBF, se reparten $50\mu\text{l}$ de cada dilución en diferentes tubos Eppendorf o en pocillos de una placa de microtitulación.
- 3) Se añaden a cada dilución $50\mu\text{l}$ de la suspensión celular preparada como se ha descrito anteriormente, y se incuba durante 15 min. a temperatura ambiente.
- 4) Tras este período de incubación se añaden a cada tubo $15\mu\text{l}$ de complemento de conejo.
- 5) Los tubos se incuban durante 1 hora a 37°C .
- 6) Se adicionan a los tubos $66\mu\text{l}$ de una solución isotónica de

azul tripán¹.

- 7) Tras incubar 3 a 5 min. a temperatura ambiente se adicionan 22 μ l de formaldehído al 40% para fijar las células.

Pruebas de citotoxicidad indirectas para medir los niveles de Sxs en los fluidos utilizados como fuentes de antígeno

- 1) Se inactiva el suero anti-Sxs por incubación a 56°C durante 30 min. en agitación. Realizando posteriormente diluciones seriadas del mismo en medio RPMI.
- 2) Se absorben 40 μ l de cada dilución en un tubo Eppendorf con 30 μ l de la fuente de antígeno a probar (Sobrenadante de testículo, líquido de epidídimo, sobrenadante de ovario, suero de macho o medio condicionado por células testiculares), incubando durante 2 horas a 4°C. Como control negativo se realiza una absorción de cada dilución del suero con 30 μ m medio RPMI.
- 3) Se añaden a cada tubo 70 μ l de la suspensión de células esplénicas preparada como se ha comentado anteriormente.
- 4) Tras incubar a temperatura ambiente durante 15 min. se adicionan 20 μ l de complemento.

1 Solución isotónica de azul tripán: Se mezclan cuatro partes de una solución stock de azul tripán al 1% en agua destilada y una parte de una solución de NaCl al 4.25%.

- 5) A partir de este momento se procede exactamente igual que se ha descrito para la prueba directa a excepción de que se adicionan 100 μ l de azul tripán y 30 μ l de formaldehído.

Como controles negativos en cada prueba se prepararon tubos en donde las células se ponían sólo con medio de cultivo RPMI y otros en donde se adicionaba además la misma cantidad de complemento que al resto de los tubos.

Para calcular la proporción de células lisadas, se realiza un recuento de 200 células de cada tubo de la prueba al microscopio de contraste de fases en donde las lisadas aparecen azules, mientras que las no lisadas aparecen blancas y muy refringentes.

Los porcentajes de lisis en cada punto de las pruebas se calculan mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$x = \frac{a-b}{100-b} \times 100$$

siendo "a" la proporción de muerte celular registrada en cada tubo y "b" la proporción de muerte inespecífica registrada en el control negativo en donde las células se encontraban en medio de cultivo.

TRATAMIENTO *in vivo* DE LOS EMBRIONES CON ANTIGENO Sxs

Los embriones de *Gallus domesticus* han sido tratados con diferentes dosis de las distintas fuentes de antígeno Sxs, la aplicación de las dosis se ha hecho de una sola vez o bien repartiendo el volumen

total del tratamiento en dos o tres dosis administradas en días consecutivos.

El tratamiento de los embriones se realizó según los siguientes pasos:

- 1) Se colocan los huevos embrionados en la incubadora con su eje mayor situado horizontalmente y se suprime el movimiento de volteo de la incubadora con objeto de que el embrión en desarrollo se coloque en la parte más alta del huevo, justo debajo de la cáscara.
- 2) Al tercer o cuarto día de incubación, se procede a inocular los huevos con las distintas fuentes de Sxs.
- 3) El huevo se coloca en la cámara de flujo laminar¹, donde deberá permanecer durante todo el proceso, con objeto de trabajar en condiciones de esterilidad y se desinfecta la parte superior del huevo frotándolo con algodón empapado en alcohol etílico al 70%.
- 4) Se deja secar el alcohol y con la punta de una lanceta estéril se abre en la cáscara un agujero pequeño, rompiendo con cuidado la membrana de la cáscara ya que el embrión está situado inmediatamente debajo y podríamos dañarlo.
- 5) Con una jeringa o una micropipeta estéril se van

¹ Es importante que durante el traslado del huevo desde la incubadora hasta la cámara de flujo laminar no se cambie su posición para no perder la posición actual del embrión, lo que supondría que abríamos el agujero en un punto distante del embrión, y el tratamiento no sería tan directo.

introduciendo por el agujero pequeñas gotas de la solución de tratamiento, hasta completar la dosis deseada.

- 6) El agujero abierto en la cáscara se cierra con un trozo de papel de parafina, previamente esterilizado mediante exposición a luz ultravioleta durante 12 horas. Los bordes del papel de parafina se sellan tocándolos levemente con una lanceta calentada a la llama, procurando no calentar demasiado la lanceta ni aplicarla durante mucho tiempo en un mismo punto ya que el exceso de calor puede matar el embrión que, como se ha comentado, estará colocado justo debajo de la abertura.
- 7) El huevo se coloca nuevamente en la incubadora, y 12 horas después se colocan en la posición de incubación con el eje mayor vertical y con la cámara de aire del huevo en la parte superior. En este momento se comienza el volteo de los huevos. La supervivencia de los embriones se comprueba días después mirando el interior del huevo con una lámpara mira-huevos.
- 8) Los embriones supervivientes se extraen del huevo a los 16 días de incubación con objeto de estudiar el sexo tanto genético como fenotípico, tal como se describe más adelante. (En alguno de los experimentos los embriones han sido extraídos a los 9 días de incubación).

Como controles se han tratado también embriones con diferentes dosis de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} , suero de rata hembra y medio de cultivo BME sin SBF.

TRATAMIENTO *in vitro* DE LAS GONADAS EMBRIONARIAS

- 1) En la cámara de flujo se extraen del huevo embriones de 7, 8 y 9 días de incubación, colocándolos sobre un placa de petri estéril.
- 2) El embrión se decapita y la cabeza se coloca en medio BME con objeto de realizar un cultivo a corto término para determinar su sexo genético.
- 3) El resto del cuerpo se disecciona, manteniendo las condiciones de esterilidad, hasta dejar los primordios gonadales, que se encuentran sobre el mesonefros, al descubierto.
- 4) Las gónadas, junto con el mesonefros, se colocan en una placa de petri estéril que contiene 10ml de medio BME condicionado por el crecimiento de células de Sertoli o medio conteniendo 600 μ l de sobrenadante de testículo, de forma que las gónadas queden expuestas directamente al medio de cultivo y no estén en contacto con la placa.
- 5) Los cultivos se incuban durante 6 días en la estufa a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.
- 6) Al sexto día de cultivo se fijan las gónadas en fijador AFA¹.

¹ Fijador AFA: se mezclan alcohol etílico 70%, formaldehído 40% y ácido acético, en proporciones 90:5:5.

En el presente trabajo se utilizaron como controles gónadas cultivadas en medio BME sin SBF y gónadas sin cultivar pertenecientes a individuos de ambos sexos de 7, 8 y 9 días de incubación.

ESTUDIO DEL SEXO GENETICO

Obtención de las preparaciones cromosómicas

Para conocer el sexo genético de los individuos de 16 días de incubación se realizaron cultivos de médula ósea según el siguiente protocolo:

- 1) Se extrae el embrión en la cámara de flujo laminar y se coloca sobre una placa de petri estéril.
- 2) Se le extraen las tibias y se trocean, tras lo cual se colocan en un frasco de cultivo con medio RPMI suplementado con 10% de SBF y Concanavalina A (SIGMA) como estimulante de la mitosis.
- 3) Con objeto de liberar las células del interior de los pequeños fragmentos de hueso de las tibias, los tubos se agitan fuertemente con ayuda de un vortex.
- 4) Los cultivos se incuban a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante tres días, tiempo suficiente para que el número de células en división nos permita obtener preparaciones

cromosómicas.

Esta técnica no puede ser aplicada a embriones de 7,8 ó 9 días de incubación debido al pequeño tamaño de sus tibias. Por este motivo, en estos embriones se realizó un cultivo a corto término de las células obtenidas tras disgregar la cabeza del embrión mediante un pipeteo rápido en medio RPMI.

- 1) Tanto en este último tipo de cultivo como el de médula ósea las células se colchicinan mediante la adición de $10\mu\text{l}$ por cada ml de medio de cultivo de una suspensión de colchicina (SIGMA) al 0.02% en solución salina de ClNa al 0.9%. A partir de este momento se hace innecesario mantener las condiciones de esterilidad.
- 2) Tras una incubación de 2 horas en presencia de colchicina se resuspende todo el material mediante pipeteo con una pipeta pasteur dejando sedimentar los trozos de tejido y pasando la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15ml.
- 3) El material se centrifuga a 1100 rpm durante 10 min. y se decanta el sobrenadante.
- 4) Las células se someten a un tratamiento hipotónico durante 20 a 30 min. en 6 a 8ml de una solución hipotónica de KCl al 0.56% a 4°C .
- 5) Finalizado el choque hipotónico se añaden, a modo de prefijación, de 0.5 a 1ml de fijador Carnoy modificado

(metanol:ácido acético en proporciones 3:1) y se pipetea suavemente. Este paso tiene por objeto impedir la formación de grumos de células durante la centrifugación.

- 6) Los tubos se centrifugan durante 10 min. a 1100 rpm. El sobrenadante se decanta y el sedimento se resuspende en los restos de solución hipotónica que quedan en el tubo después de decantar.
- 7) Se añaden, muy lentamente, 6ml de fijador sobre la suspensión concentrada de células de forma que no se mezclen y los tubos se incuban a 4°C durante 1 hora aproximadamente, tiempo suficiente para que las células se hayan fijado, lo que vendrá indicado porque la suspensión celular toma un aspecto translúcido.
- 8) El material se resuspende nuevamente y se centrifuga a 1100 rpm durante 10 min., decantando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en 6ml de fijador.
- 9) Se vuelve a centrifugar y se repite este mismo proceso dos veces más, hasta completar tres lavados de fijador.
- 10) Tras decantar el último fijador se añaden de 1 a 2ml de fijador, dependiendo de la concentración celular.

En este momento estamos en disposición de realizar las extensiones sobre portaobjetos, para lo cual se utilizan dos métodos diferentes.

a:Extensiones sobre portaobjetos secos y secados al aire.

b:Extensiones sobre portaobjetos húmedos y fríos y secados al aire.

Para cualquiera de ellas se utilizan portaobjetos limpios y desengrasados en una mezcla de alcohol etílico y éter en proporciones 1:1.

Seguidamente explicaremos algunas consideraciones a tener en cuenta a la hora de la realización de las extensiones por los distintos métodos.

a:Extensiones sobre portaobjetos secos y secados al aire

Se dejan caer de 5 a 6 gotas de la suspensión celular sobre el portaobjetos y dejarlo secar. Se observa la densidad celular y el grado de extensión de las placas metafásicas al microscopio de contraste de fases a bajo aumento, o tiñendo la preparación.

Si la densidad celular es alta, se diluye la suspensión celular añadiendo más fijador, si por el contrario es demasiado baja, se ponen unas cuantas gotas más de suspensión en la siguiente preparación.

Si las placas metafásicas están poco extendidas puede realizarse otra preparación dejando caer las gotas de suspensión celular desde una mayor altura, pudiéndose llegar hasta los dos metros e incluso más. Si con esta modificación no se consiguen mejores resultados pueden realizarse uno o dos cambios de fijador más y volver a realizar de nuevo las extensiones.

b:Extensiones sobre portaobjetos húmedos y fríos y secados al aire.

Los portaobjetos se sumergen en agua destilada y se incuban a 4°C para que estén fríos. Posteriormente se sacan del agua y se drena el exceso de líquido. Se dejan caer de 5 a 6 gotas de la suspensión celular sobre el portaobjetos y se controla la densidad celular y la extensión de las placas metafásicas de la misma forma que se ha expuesto en el apartado anterior.

Estas técnicas, que han sido desarrolladas en nuestro laboratorio, han demostrado una alta eficacia, ya que han permitido realizar simultáneamente las preparaciones cromosómicas de gran número de embriones (más de 50), así como un alto grado de reproducibilidad puesto que todos los embriones pudieron ser cariotipados. Por otro lado, tanto el número como la calidad de las metafases fueron suficientes como para permitir una aplicación eficaz de las técnicas de bandeo cromosómico y una rápida y clara determinación del sexo genético.

Técnicas de bandeo cromosómico

Bandeo G

Para la consecución de bandas G hemos utilizado una técnica desarrollada en nuestro laboratorio (Burgos y col., 1986) que se caracteriza por ser rápida y por dar unos resultados fácilmente reproducibles. El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se sumerge la preparación en solución de tripsina (0,0125g

de tripsina en 50ml de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} pH 8) durante 20 a 40 segundos, con agitación continua y se lava inmediatamente en agua corriente.

- 2) Se sumerge la preparación en $2xSSC^1$ a 65°C durante 1 a 2 min. y se lava en agua destilada.
- 3) Se tiñe con Giemsa al 10% durante 5 min.

Los tiempos de tratamiento con tripsina y $2xSSC$ son sólo orientativos, ya que los tiempos óptimos de tratamiento son muy estrictos. Sin embargo, no hay dificultad en obtener el tiempo óptimo después de escasos intentos que, gracias a la sencillez de la técnica, se realizan rápidamente.

Así, si después de una inmersión corta en $2xSSC$ (por ejemplo 45 segundos) los cromosomas aparecen "huecos e hinchados", los cromosomas han sido expuestos demasiado tiempo a la acción de la tripsina. De la misma forma, si después de un largo tratamiento con $2xSSC$ los cromosomas aparecen teñidos uniformemente o sólo con una cierta sugerencia de bandas, el tratamiento con tripsina fué insuficiente.

Bandeo C

La técnica empleada se basa esencialmente en el método desarrollado por Sumner (1972), que básicamente consiste en lo siguiente:

1 $2xSSC$ (solución salina citrato): Se disuelven 17,52g de NaCl y 8,82g de citrato sódico tribásico dihidrato en 900ml de H_2O desionizada. Se ajusta el pH entre 6,8 y 7 y se completa hasta un volumen de 1000ml.

- 1) Se sumergen las preparaciones en una solución de $(OH)_2Ba$ al 5% durante un tiempo que oscila entre 5 y 20 min. y que deberá estimarse efectuando varios ensayos.
- 2) Se lavan enérgicamente en agua corriente.
- 3) Se sumergen en 2xSSC a 60°C durante 1 hora.
- 4) Se lavan con agua destilada.
- 5) Se tiñen con Giemsa al 2% durante 30 min.

Bandeo de fluorescencia (Cromomicina A₃)

La técnica utilizada para la tinción con cromomicina A₃ (CMA) sigue básicamente el protocolo descrito por Schweizer (1980, 1981). Esta técnica se basa en una primera tinción con cromomicina, tras la cual se aplica una contratinción con distamicina A (DA).

Método de tinción

- 1) Se ponen unas gotas de la solución de CMA¹ sobre la preparación, se cubre con un cubreobjetos y se incuba en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 min.

¹ Solución de CMA: Se disuelve la CMA a una concentración de 0.5 mg/ml en tampón McIlvaine (82ml de Na₂HPO₄ 0.2M + 18ml de ácido cítrico 0.1M) pH 7 con 2.5 Mm de MgCl₂. El tampón se adiciona suavemente y se deja que el antibiótico se disuelva lentamente en el frigorífico durante toda la noche.

- 2) Se quita el cubre, lavando brevemente la preparación con agua destilada y se sopla con una pera de goma para eliminar las gotas de agua.
- 3) Se ponen unas gotas de la solución de DA¹ sobre la preparación, se cubre con un cubreobjetos y se incuba en oscuridad a temperatura ambiente durante 40 min.
- 4) Se quita nuevamente el cubre lavando la preparación brevemente en agua destilada y se sopla con una pera de goma para eliminar las gotas de agua.
- 5) La preparación se monta en una mezcla a partes iguales de Glicerol:McIlvaine pH 7.
- 6) La preparación se deja envejecer en la estufa a 37°C durante 48 horas aproximadamente.
- 7) Se observa al microscopio de epifluorescencia con excitación violeta entre 430-470nm.

ESTUDIO DEL SEXO FENOTIPICO

A la vez que se determina mediante cultivo de células de médula ósea el sexo genético de los ejemplares a estudiar, es necesario determinar su sexo fenotípico, con objeto de establecer la

1 Solución de Distamicina A: Se disuelven de 0.05 a 1mg de distamicina A por ml de tampón McIlvaine pH 7 inmediatamente antes de usar.

correspondencia entre ambos. Tras realizar el cultivo a partir de las tibias del embrión, éste se disecciona, retirando todos los tejidos que ocultan las gónadas, que están situadas sobre el mesonefros. La parte posterior del embrión, junto con el mesonefros y las gónadas se fijan en fijador AFA. Las gónadas tienen ya, en estos estadios del desarrollo, un tamaño suficiente como para poder diferenciarlas a la lupa e incluso a simple vista.

Estudio histológico de las gónadas

La observación a nivel histológico de las gónadas requiere su deshidratación para su posterior inclusión en parafina, ya que ésta es inmisible con el agua.

Inclusión de las piezas

Para la inclusión en parafina se procede de la siguiente forma:

- 1) Las piezas fijadas en fijador AFA se lavan en alcohol al 70% entre 15 y 30 min.
- 2) Posteriormente se lavan durante 30 min. en una mezcla en proporciones 1:1 de alcohol al 70% y dioxano.
- 3) Se lavan en dioxano durante 30 min.
- 4) Se lavan de nuevo en dioxano durante 60 min, para lo cual la pieza se coloca en un saquito de gasa que se sujeta en la parte superior de un tubo alto y delgado que contiene CaCl_2

en el fondo. De esta forma se evita que se vuelva a rehidratar con el agua que, al ser mas densa que el dioxano, se va al fondo del tubo.

- 5) Se incuba la pieza en una mezcla de parafina-dioxano en proporciones 1:1 a 60°C durante 30 min.
- 6) Se incuba durante una noche en parafina.
- 7) Se incuba la pieza en un pocillo con parafina limpia durante 4 a 5 horas.
- 8) Se construye el bloque orientando adecuadamente la pieza.

Tras la inclusión, las piezas se cortan en secciones de 5 ó 10 μ m y se colocan en un baño de parafina, recogéndolas del baño en portaobjetos impregnados con albúmina de huevo.

Tinción de los cortes

Dado que la parafina no es miscible con el agua y que las soluciones de tinción son acuosas, se hace necesario desparafinar y rehidratar los cortes para proceder a la tinción tal y como a continuación se describe:

- 1) Se desparafinan mediante tres pases en xileno de 10 min cada uno.
- 2) Se rehidrata, pasando las preparaciones por una serie de

alcoholes desde 100 al 50% (10 min cada uno).

- 3) Se lavan en agua destilada durante 10-20 segundos.
- 4) Se tiñen en hemalumbre de Harris¹ durante 4-6 min.
- 5) Se incuban en agua corriente durante 5 min. para inducir el viraje del colorante.
- 6) Se lavan en agua destilada durante 10-20 segundos.
- 7) Se tiñen en eosina² durante 2-3 min.
- 8) Se lavan en agua destilada.
- 9) Se deshidratan de nuevo las preparaciones pasándolas por la serie de alcoholes en sentido inverso (1 min. en cada uno).
- 10) Se sumergen las preparaciones en xileno durante 1 min.
- 11) Se montan en DePeX.

1 Hemalumbre de Harris: Se disuelven 2g de hematoxilina en 20ml de alcohol absoluto y 40g de alumbre potásico (sulfato de aluminio y potasio) en 400ml de agua destilada. Transcurridas 24 horas se mezclan ambas soluciones añadiendo 1g de HgO. Se calienta la solución, se deja enfriar y se filtra.

2 Solución de eosina: se disuelven 4,5g de Eosina en 450ml de agua destilada a la que se añaden 4 gotas de ácido acético glacial.

TECNICA INMUNOHISTOQUIMICA

Se ha aplicado una técnica inmunohistoquímica con objeto de determinar si las células de Sertoli cultivadas, además de secretar Sxs al medio de cultivo, son capaces de retenerlo en su membrana. Para ello, fué necesario hacer crecer estas células sobre portaobjetos, lo que nos permitió su fijación y posterior tratamiento.

Cultivos de las células sobre portaobjetos

- 1) Se toma un cultivo, y se retira el medio del frasco con una pipeta pasteur, sustituyéndolo por solución de Hank sin C^{++} ni Mg^{++} que se cambia varias veces, con lavados intermedios para eliminar los iones de Ca^{++} y Mg^{++} del frasco.
- 2) Se añade una pequeña cantidad de solución de tripsina-EDTA al frasco para cubrir el fondo de éste, se deja incubar controlando el proceso de tripsinizado al microscopio invertido e incluso ayudando a que las células se despegen golpeando el frasco con la mano.
- 3) Cuando las células se encuentran en suspensión se añaden 10ml de medio BME con 10% de SBF.
- 4) Las células en suspensión se colocan dentro de una placa de petri sobre un portaobjetos previamente esterilizado. Las células se cultivan a $37^{\circ}C$ en una atmósfera de 5% de CO_2 durante 2 días o más si fuese necesario hasta que el porta

esté prácticamente cubierto.

- 5) Las células adheridas al porta se fijan por inmersión en acetona a -20°C durante 4 min.

Caso de ser necesario estas células fijadas se pueden guardar a -80°C hasta su uso, de forma que al sacarlas del congelador habrá que ponerlas en acetona a -20°C dejándolas alcanzar lentamente la temperatura ambiente.

Tinción inmunohistoquímica

- 1) Se lavan las preparaciones con las células fijadas en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} pH 7.4 durante 20 min.
- 2) Se incuban los portaobjetos en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} con 3% de BSA durante 1 hora y media a temperatura ambiente con objeto de inactivar los sitios de unión inespecíficos que pudiesen presentar las células para los anticuerpos anti-Sxs del suero.
- 3) Se drena el exceso de PBS de la preparación y se ponen $300\mu\text{l}$ de suero anti-Sxs diluido a 1/2 en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} con 1% BSA previamente centrifugado a 13000 rpm durante 2 min., cubriendo con un cubreobjetos e incubando durante 12 a 14 horas a 4°C en una cámara saturada de humedad.
- 4) Se quita el cubre y se lava la preparación cinco veces

durante 5 min. cada una en abundante PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} pH 7.4.

- 5) Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG de rata conjugado con peroxidasa a una dilución 1/400 en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} con 1% de BSA previamente centrifugado a 4000 rpm durante 3 min.

En cada preparación se pusieron $300\mu\text{l}$ de esta dilución de inmunoconjugado y se cubrieron con un cubreobjetos, incubando a temperatura ambiente en cámara saturada de humedad durante 1 hora y media.

- 6) Se lavan de nuevo las preparaciones cinco veces como en los pasos 4 y 5.
- 7) Las preparaciones se tiñen por inmersión en una solución de Diaminobenzidina (DAB)¹ como sustrato de la peroxidasa, controlando la tinción al microscopio de contraste de fases. La reacción se detiene lavando las preparaciones en agua destilada.
- 8) Se dejan secar las preparaciones al aire y se montan en DePeX.

Como controles, además de los casos en que se omite el suero anti-Sxs o el inmunoconjugado, se han utilizado también suero anti-Sxs

¹ Solución de DAB: se disuelven 0.005g de DAB en 20ml de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} pH 7.6 y justo antes de usar se adicionan $25\mu\text{l}$ de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

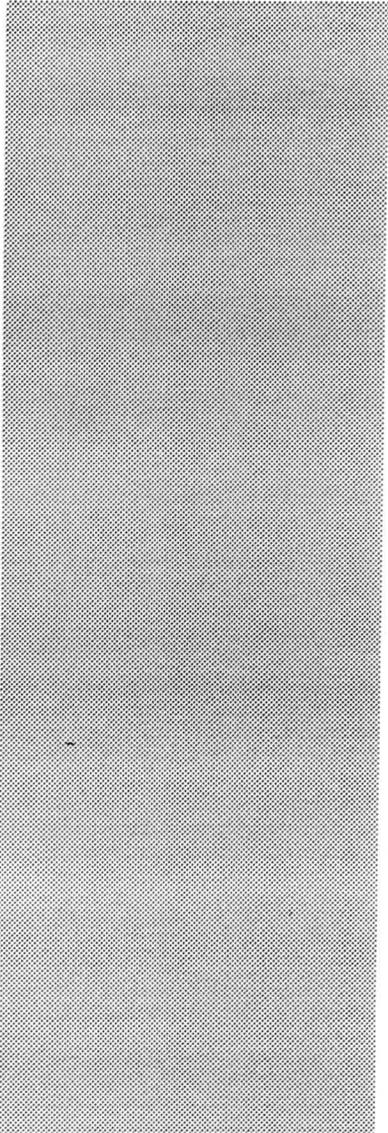
absorbido con células de hembra o con células de macho. Estos métodos de absorción se describen a continuación.

ABSORCION DE SUEROS CON CELULAS

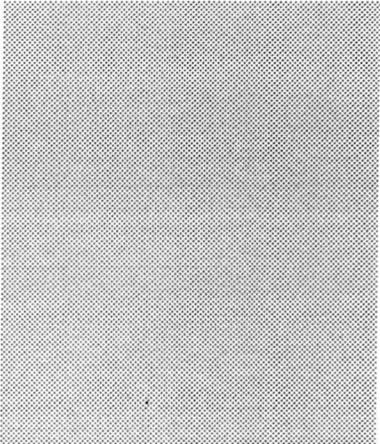
- 1) Los bazos de varias ratas, del mismo sexo, se maceran en un homogeneizador manual con 5 a 6ml de PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} .
- 2) Se dejan sedimentar los fragmentos de tejido y la suspensión celular se pasa a un tubo de centrifuga de 15ml con una pipeta pasteur .
- 3) Las células se lavan varias veces en PBS sin Ca^{++} ni Mg^{++} centrifugando a 1100 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decanta tras el último lavado, quedando así un botón de células empaquetadas.
- 4) Se absorben $300\mu\text{l}$ del suero, con $150\mu\text{l}$ del botón celular, incubando durante 3 horas a 4°C agitando cada 30 min.
- 5) Las células se retiran del suero por centrifugación a 4200 rpm durante 10 min., quedando éste completamente limpio y listo para su utilización.

INDICE DE SOLUCIONES Y MEDIOS

PBS sin Ca ⁺⁺ ni Mg ⁺⁺	58
DME	59
RPMI	60
BME	61
Hanks' BSS	62
Tripsina EDTA	62
Ham's F-10	63
PBS	73
Azul tripán	77
Fijador AFA	81
2xSSC	87
CMA	88
DA	89
Hemalumbre de Harris	92
Eosina	92
DAB	95



RESULTADOS



RESULTADOS

Como acabamos de ver, uno de los principales objetivos de este trabajo consiste en llevar a cabo tratamientos de embriones con antígeno Sxs. Para ello, fué necesario establecer las condiciones óptimas para realizar tales experimentos. Consecuentemente, fué preciso desarrollar métodos para controlar la riqueza en antígeno Sxs de las diferentes fuentes investigadas y métodos para titular los sueros anti-Sxs usados en las pruebas de citotoxicidad. Paralelamente, fué necesario seleccionar convenientemente el tipo de células diana apropiado, el método de obtención de los sueros anti-Sxs, la fuente y utilización del complemento y las mejores fuentes de antígeno Sxs.

El desarrollo de toda esta metodología ha ocupado una parte considerable de este trabajo, cuyos resultados son expuestos a continuación.

CELULAS DIANA

Para la realización de cualquier prueba de citotoxicidad es necesario contar con una fuente de células diana, que deben cumplir los siguientes requisitos:

- 1) ser de fácil obtención en número suficiente,
- 2) poder ser individualizadas mediante técnicas sencillas, con objeto de permitir su posterior recuento,
- 3) tener un porcentaje de viabilidad elevado tras las

manipulaciones necesarias para su obtención y

- 4) mostrar bajos niveles de muerte inespecífica durante el desarrollo de la prueba.

Con objeto de determinar el tipo idóneo de células diana para nuestros experimentos, se realizaron un mínimo de tres pruebas de citotoxicidad sobre distintos tipos de células: espermatozoides, células epidérmicas disociadas, células de Sertoli cultivadas y células esplénicas.

Espermatozoides

Aunque de fácil preparación, los espermatozoides presentaron serias dificultades a la hora de hacer el recuento de los lisados al microscopio, debido a la escasa cantidad de citoplasma que poseen y a su forma aplanada. Por estas causas, su aspecto al microscopio depende por lo general de su orientación con respecto al portaobjetos, de manera que aparecen mucho más refringentes si están situados perpendiculares al mismo. Este hecho dificultó bastante la diferenciación entre espermatozoides vivos y muertos, lo que fué en detrimento de la fiabilidad del recuento, razón por la cual fueron desestimados como células diana.

Células epidérmicas disociadas

Estas células mostraron también varios inconvenientes serios. En primer lugar, requieren un proceso laborioso para su obtención que

implica al menos dos tratamientos enzimáticos para individualizarlas, que elevan considerablemente el número de células muertas. Además, durante el proceso de legrado por el que se obtienen estas células, se arrastran numerosas células muertas de la capa más externa de la epidermis, lo que contribuye a aumentar aún más este problema. Así, en el momento de iniciar una prueba, las suspensiones de células epidérmicas mostraron un porcentaje de lisis cercano al 40%, que indudablemente resulta demasiado elevado para nuestros fines. Por otro lado, estas células demostraron ser extremadamente sensibles a los sueros ricos en complemento, ya que los controles negativos realizados en nuestros experimentos arrojaron porcentajes de muerte celular superiores al 90%. Por lo tanto, resulta obvio que este tipo de células es inadecuado para la realización de pruebas de citotoxicidad.

Células de Sertoli cultivadas

Se iniciaron un total de diez cultivos celulares a partir de células de Sertoli purificadas de testículo de rata, según la técnica descrita en el apartado correspondiente de "Material y Métodos". Estos cultivos primarios mostraron diferentes tasas de crecimiento, de manera que fue posible realizar varios subcultivos en cuatro de ellos. Al cabo de algunos meses, solamente una de las líneas sufrió una transformación espontánea, convirtiéndose así en una línea celular estable.

Estas células podían tener dos utilidades:

1) dado que las células de Sertoli producen antígeno Sxs, éstas podrían liberarlo al medio de cultivo proporcionando de esta forma una fuente de éste;

2) de ser Sxs positivas, estas células podrían ser utilizadas como células diana para la realización de las pruebas de citotoxicidad.

Con relación al primer punto y tal como se verá más adelante en el apartado correspondiente a "Fuentes de antígeno Sxs", estas células liberan dicho antígeno al medio de cultivo, proporcionando así una de las fuentes en que éste se encuentra en mayor pureza.

Por otro lado, las células de Sertoli cultivadas presentarían también varias ventajas para su utilización como células diana. Así, el proceso de preparación de un número considerable de ellas para la realización de las pruebas es muy simple. Además, la homogeneidad de las mismas facilitaría en principio los recuentos al microscopio a la hora de determinar el porcentaje de lisis.

Sin embargo, estas células presentaron varios inconvenientes que las convierten en un material poco adecuado para este fin. Una de sus características más llamativas es la capacidad para formar agregados celulares, difíciles de deshacer, hecho que dificulta, sobre todo, el proceso de recuento. Además, la tripsinización necesaria para separar las células del frasco de cultivo reduce la viabilidad de las mismas, lo que eleva los niveles de células muertas de los controles negativos.

Aunque estas razones impidieron determinar claramente si estas células eran o no Sxs positivas mediante pruebas de citotoxicidad, la utilización de una técnica inmunohistoquímica nos permitió demostrar la presencia de dicho antígeno en su membrana citoplasmática. En la figura 1a se puede observar la aparición de color marrón en la superficie de las células de Sertoli cultivadas, cuando como primer anticuerpo se utilizó suero anti-Sxs absorbido previamente con células de hembra. Por el contrario, no apareció color alguno en los controles negativos, que fueron de tres tipos: en el primero de ellos se omitió el suero anti-Sxs,

Figura 1. Detección de antígeno Sxs en la superficie de células de Sertoli cultivadas mediante inmunohistoquímica. **A:** Tinción positiva de las células tras la aplicación de la técnica. **B:** Ausencia de tinción en un control negativo.

en el segundo faltaba el inmunoconjugado y en el tercero, el suero anti-Sxs utilizado fue absorbido previamente con células de macho. La figura 1b puede ser representativa de los resultados de cualquiera de estos controles.

Células esplénicas

Finalmente, las células esplénicas han demostrado ser de gran utilidad como células diana ya que presentan bajos niveles de muerte celular inespecífica, permanecen individualizadas facilitando así los recuentos y presentan claras diferencias en contraste de fases entre las células muertas y vivas tras su tinción con azul tripán (Figuras 2a y b).

Sin embargo, debido a que fueron extraídas mediante macerado del bazo, las suspensiones celulares resultantes presentaron un alto grado de contaminación por otros tipos celulares, mayoritariamente eritrocitos, que suelen sufrir lisis inespecíficas. El grado de contaminación era variable en diferentes suspensiones, lo que dificultó tanto el ajuste de la densidad celular requerida para la realización de las pruebas, como los recuentos necesarios para cuantificarlos. Sin embargo, las células esplénicas pueden ser purificadas mediante centrifugación en gradiente de densidad, eliminando así la presencia de eritrocitos. Estas suspensiones purificadas presentaron las características idóneas para su utilización como células diana en las pruebas de citotoxicidad.

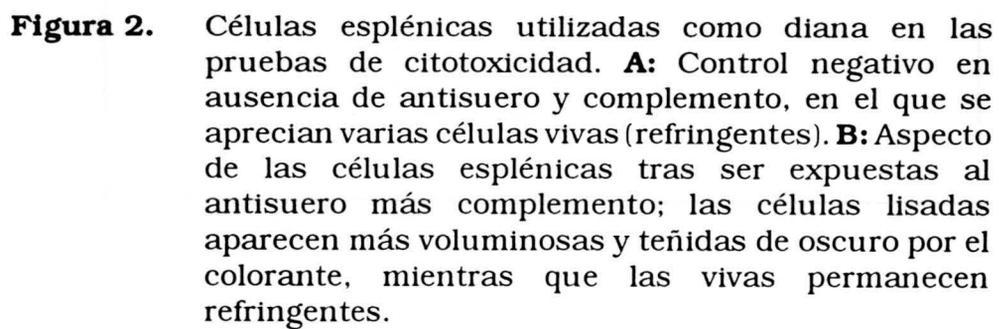


Figura 2. Células esplénicas utilizadas como diana en las pruebas de citotoxicidad. **A:** Control negativo en ausencia de antisuero y complemento, en el que se aprecian varias células vivas (refringentes). **B:** Aspecto de las células esplénicas tras ser expuestas al antisuero más complemento; las células lisadas aparecen más voluminosas y teñidas de oscuro por el colorante, mientras que las vivas permanecen refringentes.

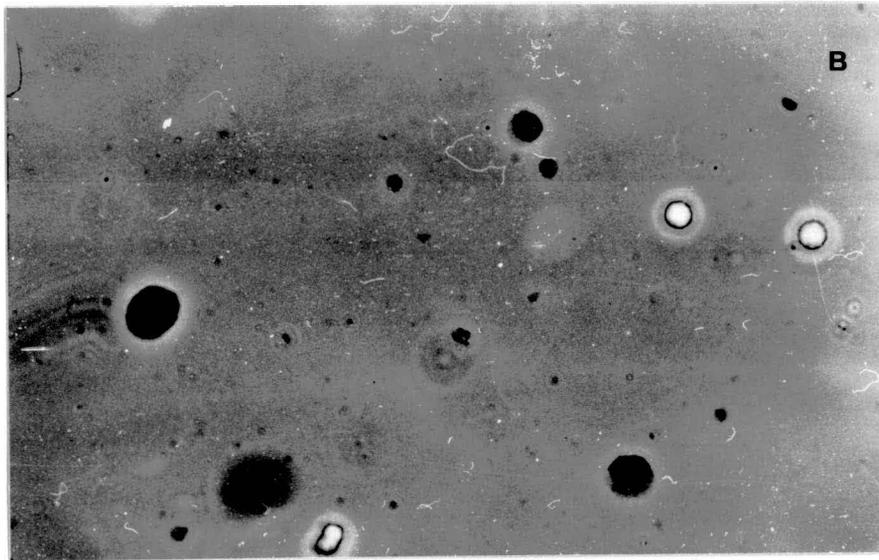
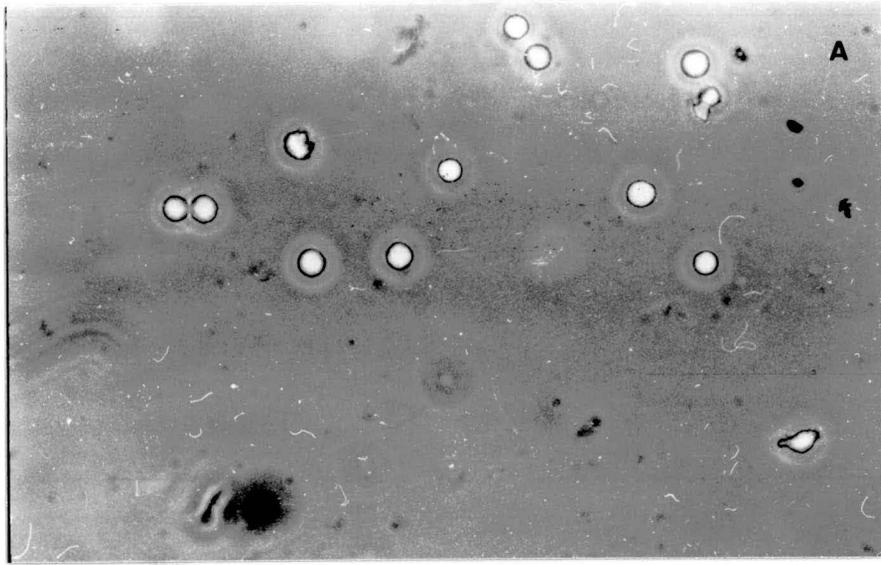


FIG 2

COMPLEMENTO

Cualquier suero que vaya a ser utilizado como fuente de complemento debe reunir dos características principales:

- 1) poseer altos títulos de complemento y
- 2) no ser citotóxico para las células diana, en ausencia del antisuero de que se trate.

El suero de conejo, utilizado como fuente de complemento en presencia de un suero con anticuerpos, proporciona generalmente unos niveles de citotoxicidad aceptables. Sin embargo, en nuestras experiencias, y para los tipos de células diana utilizadas, el porcentaje de muerte celular que se obtuvo en los controles (complemento en ausencia de antisuero) era demasiado alto.

Con objeto de comprobar si estos niveles de citotoxicidad inespecífica podían ser minimizados, realizamos la absorción del suero a utilizar como fuente de complemento con células esplénicas de ratón hembra. En la figura 3 (tabla I), donde se muestran los resultados de la comparación de la muerte celular provocada por complemento sin absorber y absorbido en ausencia (C' y C'a) y en presencia (C'+S y C'a+S) de suero anti-Sxs, podemos observar que, aunque los porcentajes de lisis obtenidos para ambos tipos

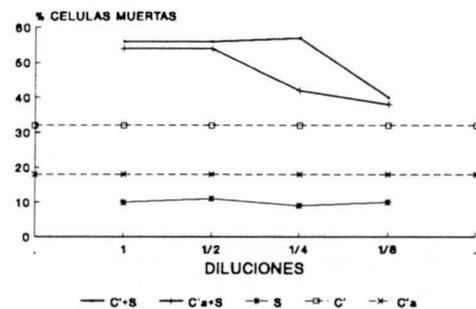


Figura 3: Efectos de la absorción del complemento con células esplénicas de hembra.

de complemento fueron muy similares en las diferentes diluciones del suero anti-Sxs, sin embargo, el porcentaje de muerte fué muy inferior para el complemento absorbido en ausencia de suero y próximos al obtenido en un control de suero anti-Sxs en ausencia de complemento (S).

Estos resultados indicaron que el suero de conejo posee la capacidad de lisar un número considerable de células de ratón de forma inespecífica, lo que podría enmascarar y falsear el porcentaje de muerte específicamente debida al suero anti-Sxs. Como acabamos de ver en el experimento, este inconveniente pudo evitarse fácilmente mediante la absorción del complemento con células de hembra en ausencia de iones divalentes, lo que, por otro lado, no afectó a los títulos de complemento. Consecuentemente, en todos nuestros experimentos hemos utilizado como fuente de complemento suero de conejo previamente absorbido, en ausencia de iones divalentes, con células esplénicas de ratón hembra.

SUEROS ANTI-Sxs

Uno de los componentes fundamentales de toda prueba de citotoxicidad es el suero inmune utilizado. En nuestro caso hemos empleado diversos métodos de inmunización para obtener sueros anti-Sxs, cuyos títulos debían ser establecidos previamente, con objeto de optimizar las condiciones de nuestros experimentos. Para ello, se realizaron diversas pruebas de citotoxicidad que se describirán a continuación.

Para la realización de estas pruebas, así como de cualquier otra en que vayan a utilizarse sueros anti-Sxs, es necesario comprobar previamente la capacidad citotóxica de cada uno de los lotes de suero

obtenido antes de ser utilizados, con objeto de descartar aquellos que, con relativa frecuencia, no muestran citotoxicidad específica.

Así, para la presente experiencia, la capacidad citotóxica de los diferentes sueros utilizados fué determinada frente a células de macho y de hembra en pruebas directas de citotoxicidad, utilizándose en las pruebas de comparación los mejores lotes obtenidos.

Además, los niveles de muerte celular de diferentes pruebas de citotoxicidad puede verse influenciada por multitud de factores que incluyen el lote de suero utilizado, el lote de complemento, las condiciones de conservación de ambos, el lote de células diana utilizadas, etc. Esto exige que en cada prueba deban incluirse varios controles con objeto de determinar la muerte inespecífica en ausencia de suero y complemento, así como la muerte inespecífica producida por el complemento. Aún cuando en distintas pruebas, se utilizan los mismos sueros (antisuero y complemento) y se realizan en las mismas condiciones, los niveles de muerte celular específica no coinciden de unas a otras. Estos hechos hacen que sólo sean comparables resultados obtenidos en una misma prueba. Por lo tanto, la comparación de la capacidad citotóxica de los diferentes sueros obtenidos, sólo puede ser estimada entre aquellos sueros que han sido contrastados en un mismo experimento. No obstante, la fiabilidad de cada una de las pruebas realizadas quedó garantizada por los niveles de muerte celular registrados en los distintos controles negativos. Entre ellos, resultaron especialmente significativos aquellos en los que las células diana fueron expuestas a los sueros problema (previamente inactivados y sin aporte de complemento), ya el porcentaje de muerte celular observada fué siempre similar a los porcentajes de muerte inespecífica (4-12%) en ausencia de suero y complemento.

Los resultados que se representan en los gráficos siguientes corresponden a la media de tres pruebas de citotoxicidad realizadas

independientemente. Estos datos representan la muerte celular específicamente debida a la acción del suero utilizado en cada caso (x), que ha sido calculada mediante la fórmula siguiente:

$$x = \frac{a-b}{100-b} \times 100$$

en donde "a" es el porcentaje de células muertas en un punto concreto de la prueba, y "b" el porcentaje de muerte inespecífica en ausencia de suero y complemento o, lo que es lo mismo, el porcentaje de células muertas en el control negativo de células mantenidas en medio RPMI.

La figura 4 (Tabla II) muestra los resultados de la comparación de la capacidad citotóxica de cuatro tipos de sueros anti-Sxs diferentes:

- 1) suero obtenido por inyecciones intraperitoneales de esplenocitos (suero E),
- 2) suero obtenido por inyecciones subcutáneas de líquido de epidídimo (suero LE),
- 3) suero obtenido por inyecciones subcutáneas de macerado de testículo (suero MT) y
- 4) suero obtenido por inyecciones subcutáneas de suero de macho (suero SM).

De todos ellos, el suero E demostró ser el que mayor poder citotóxico posee frente a las células de macho, mientras que en todos ellos la citotoxicidad para las células de hembra fueron muy similares. Por tanto, es este tipo de suero el que presenta también una mayor

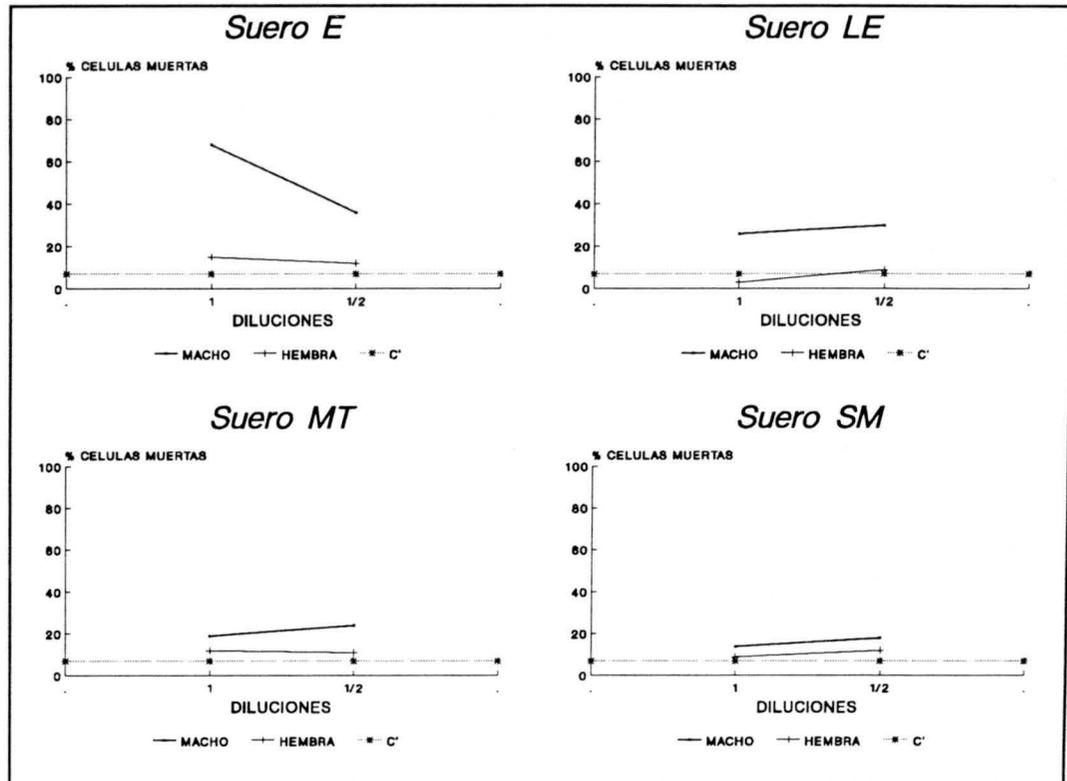


Figura 4: Comparación de los niveles de citotoxicidad de los sueros E, LE, MT y SM. **E:** Suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos. **LE:** Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con líquido de epidídimo. **MT:** Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con macerado de testículo. **SM:** Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con suero de macho. **MACHO:** Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de macho. **HEMBRA:** Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de hembra.

citotoxicidad específica anti-Sxs, calculada como la media de las diferencias entre la muerte obtenida para células de macho y la de hembra en cada dilución del suero (figura 5).

De acuerdo con los resultados obtenidos en estos experimentos,

en lo sucesivo se utilizará el suero E como patrón de comparación de los restantes tipos de suero desarrollados. Así, en la figura 6 (Tabla III), se han representado los resultados de las pruebas realizadas para comparar el suero E con otros dos: suero de inmunización intraesplénica con trozos de piel (suero I) y suero extraído de hembras múltíparas (suero MP).

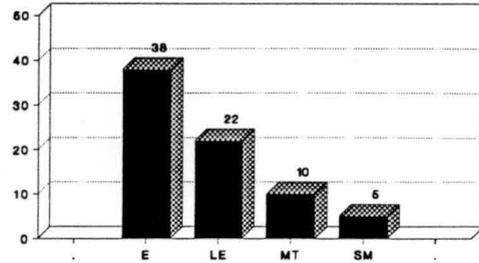


Figura 5: Citotoxicidad específica anti-Sxs de los sueros E, LE, MT y SM.

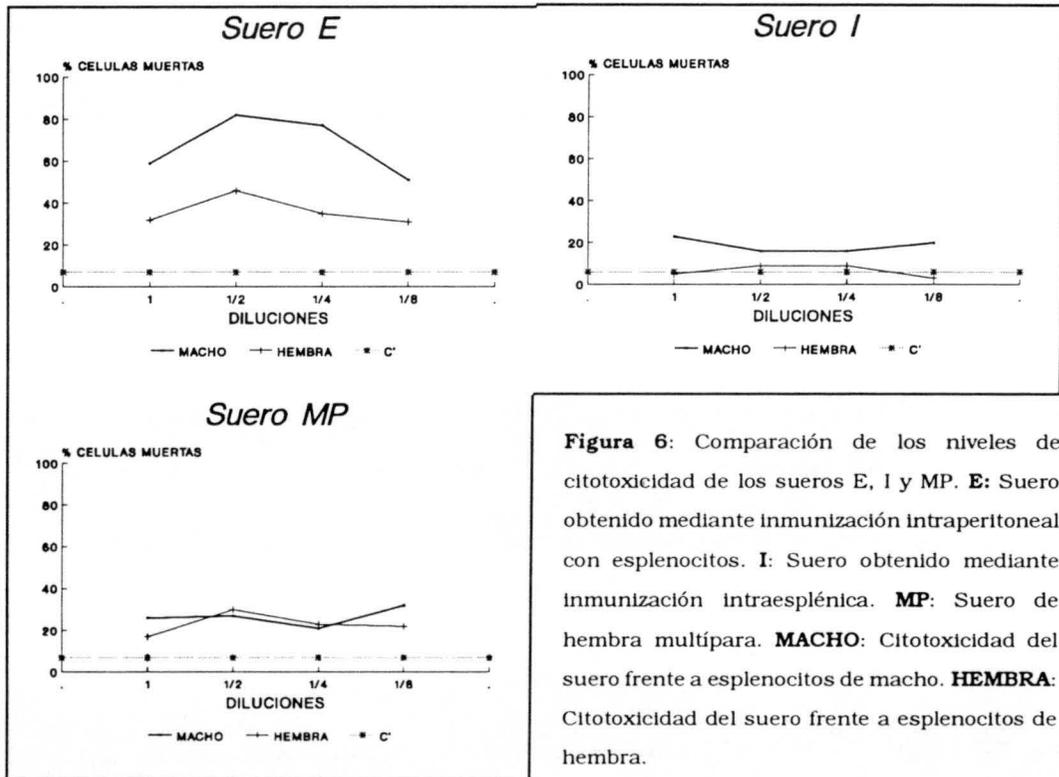


Figura 6: Comparación de los niveles de citotoxicidad de los sueros E, I y MP. **E:** Suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos. **I:** Suero obtenido mediante inmunización intraesplénica. **MP:** Suero de hembra múltipara. **MACHO:** Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de macho. **HEMBRA:** Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de hembra.

Como en el caso anterior, el suero E ha demostrado poseer mayor capacidad citotóxica absoluta, así como un mayor nivel de citotoxicidad específica anti-Sxs (figura 7).

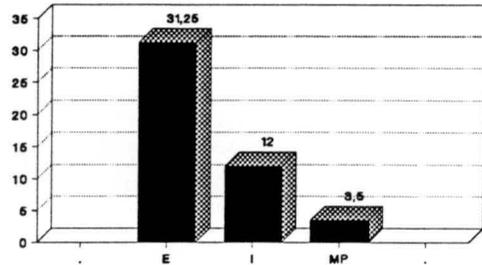


Figura 7: Citotoxicidad específica anti-Sxs de los sueros E, I y MP.

Finalmente, la figura 8 (Tabla IV) muestra los resultados obtenidos al comparar otros tres nuevos sueros con el patrón E.

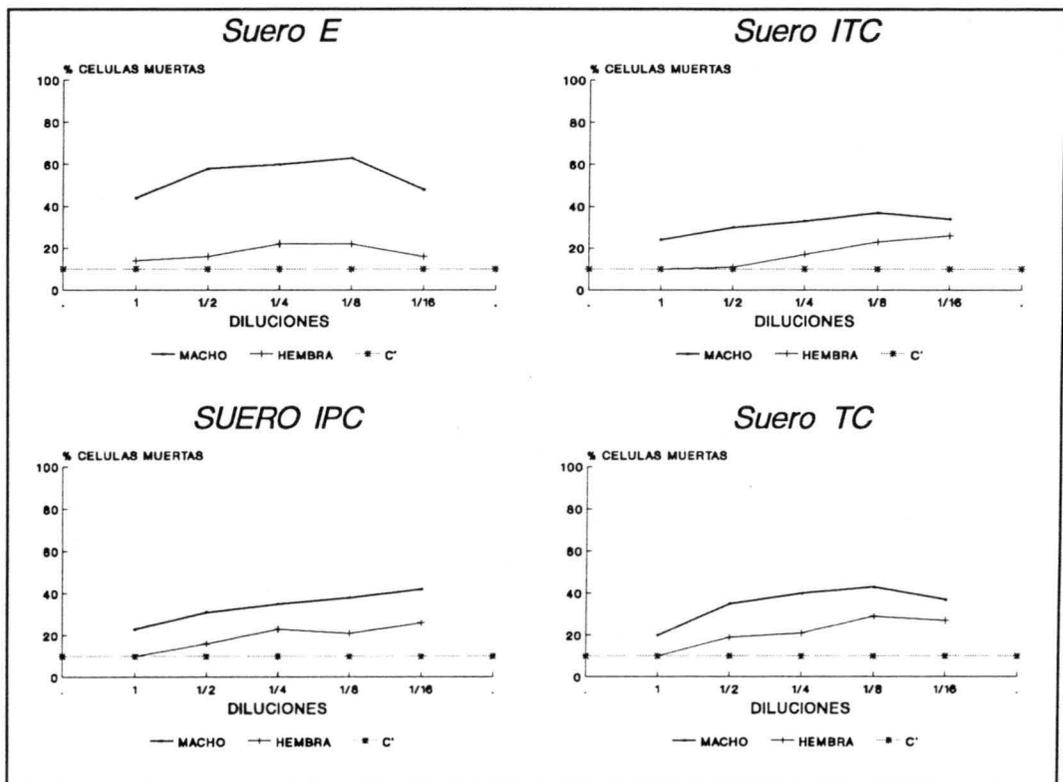


Figura 8: Comparación de los niveles de citotoxicidad de los sueros E, ITC, IPC y TC. **E**: Suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos. **ITC**: Suero obtenido mediante inmunización intraesplénica con sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund. **IPC**: Suero obtenido mediante inmunización Intraesplénica con piel + dosis de recuerdo de sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund. **TC**: Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund. **MACHO**: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de macho. **HEMBRA**: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de hembra.

Estos fueron: suero obtenido mediante inmunización por inyección intraesplénica de una emulsión de sobrenadante de testículo en coadyuvante de Freund más una dosis de recuerdo subcutánea de la misma emulsión (suero ITC), suero obtenido por inmunización intraesplénica con trozos de piel más una dosis de recuerdo subcutánea con emulsión de sobrenadante de testículo en coadyuvante de Freund (suero IPC) y suero obtenido mediante inmunización con repetidas inyecciones subcutáneas de la misma emulsión (suero TC). El suero E proporciona de nuevo los mejores resultados, tanto en valores absolutos, como en los niveles de citotoxicidad específica anti-Sxs (figura 9).

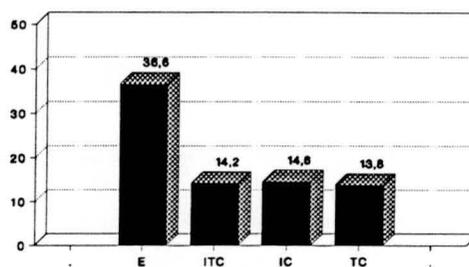


Figura 9: Citotoxicidad específica anti-Sxs de los sueros E, ITC, IPC y TC.

En conclusión, el suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos de macho (suero E) es el que presenta una mayor citotoxicidad específica anti-Sxs, y por tanto resulta idóneo para determinar la presencia de antígeno Sxs en las diferentes fuentes estudiadas.

FUENTES DE ANTIGENO Sxs

Para determinar la presencia de antígeno Sxs en las distintas fuentes, se realizaron diversas pruebas de citotoxicidad en las que el suero E anti-Sxs fué absorbido previamente con muestras de las

mismas. De esta manera, la presencia de Sxs en una fuente determinada vendría dada por la reducción de la capacidad citotóxica que provoca en el suero anti-Sxs, debido a la captura de los anticuerpos por parte del antígeno libre, lo que impide su posterior unión a las células y reduce por tanto el porcentaje de lisis observado. A continuación se describen los resultados obtenidos de la realización de tales experimentos.

En un primer grupo de pruebas, se comparó el contenido en antígeno Sxs de tres fuentes diferentes: sobrenadante de testículo (ST), líquido de epidídimo (LE) y medio condicionado por células de Sertoli (MCS). Como podemos observar en la figura 10 (Tabla V), el sobrenadante de testículo fué la fuente de antígeno Sxs que mostró mayor capacidad para retirar el poder citotóxico del suero E, bajando los niveles de muerte celular incluso por debajo de los del control negativo

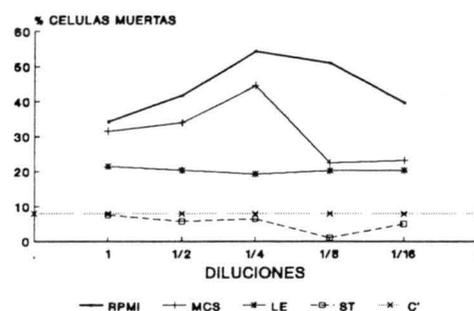


Figura 10: Niveles de citotoxicidad del suero anti-Sxs absorbido con medio RPMI, MCS, LE y ST. C': control negativo de complemento en ausencia de suero.

que sea esta fuente la que mayor concentración de antígeno Sxs posea. Por otra parte, en este experimento se observa también que tanto el líquido de epidídimo como el medio condicionado por células de Sertoli poseen antígeno Sxs, dado que ambos retiran la citotoxicidad del suero E, aunque en menor grado que el sobrenadante de testículo.

La figura 11 (Tabla VI) muestra el resultado de comparar los niveles de antígeno en el sobrenadante de testículo (ST) con otras dos

fuentes: sobrenadante de ovario de gallina (SOG) y medio condicionado por células de Sertoli (MCS). Tal como podemos observar en el gráfico, se confirman los resultados del experimento anterior por lo que respecta a los niveles relativos de antígeno Sxs en sobrenadante de testículo y medio condicionado,

mientras que los del sobrenadante de ovario de gallina se sitúan intermedios entre ambos, aunque muy próximos a los de éste.

Finalmente, sólo nos quedaba comprobar los niveles de antígeno Sxs en suero de rata macho. Sin embargo, esta fuente necesitó un tratamiento previo, que venía exigido por su condición de suero sanguíneo, por lo que debería poseer complemento y posiblemente anticuerpos que puedan unirse inespecíficamente a las células diana, interfiriendo así los resultados del experimento. De los resultados

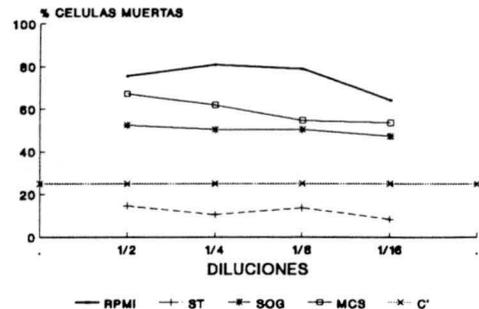


Figura 11: Niveles de citotoxicidad del suero anti-Sxs absorbido con medio RPMI, ST, SOG y MCS. C': control negativo de complemento en ausencia de suero.

representados en la figura 12 (Tabla VII), se desprenden las condiciones óptimas en que debe utilizarse esta fuente para determinar sus niveles de antígeno Sxs. Como podemos observar, la absorción del suero E con suero de rata macho sin preparación previa (S) provocó paradójicamente un aumento de los niveles de citotoxicidad en relación con los del mismo suero

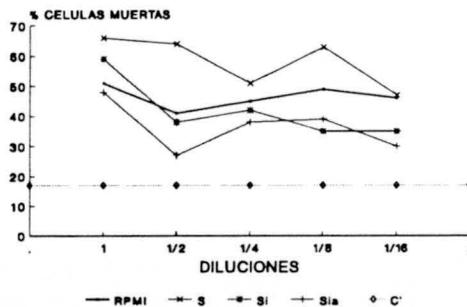


Figura 12: Niveles de citotoxicidad del suero anti-Sxs absorbido con medio RPMI, S, Si y Sia. C': control negativo de complemento en ausencia de suero.

Es absorbido simplemente con medio de cultivo (RPMI). Esto es fácilmente explicable si tenemos en cuenta el aporte de complemento que supuso la adición de este suero S. De hecho, este efecto desapareció cuando el suero S fué inactivado previamente mediante incubación a 56°C durante 30 minutos (Si). En este caso, los niveles de citotoxicidad registrados fueron similares a los del control positivo RPMI, lo cual indicaba que aún no se había podido poner de manifiesto la posible presencia de antígeno Sxs en el suero de macho. Sin embargo, dado que el suero Si se extrajo de rata macho y que las células diana utilizadas en las pruebas eran de ratón, dicho suero fué además absorbido previamente con células esplénicas de ratón hembra (Sia), las cuales retirarían del mismo medio los anticuerpos que pudiesen lisar células de ratón macho de forma inespecífica. De esta manera, se pudo observar una disminución de la capacidad citotóxica de la mezcla, que en este caso podía ser atribuida exclusivamente al antígeno Sxs.

En concordancia con estos resultados, el suero de rata macho utilizado para comparar sus niveles de antígeno Sxs con los de otras fuentes, fué previamente inactivado y absorbido con células de ratón hembra. La figura 13 (Tabla VIII) muestra los resultados de esta comparación. Como podemos observar, el contenido en antígeno Sxs del suero de macho, es sensiblemente inferior al de

otras fuentes tales como el líquido de epidídimo o sobrenadante de

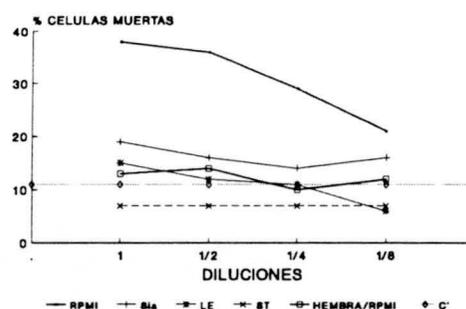


Figura 11: Niveles de citotoxicidad del suero anti-Sxs absorbido con medio RPMI, Sia, LE y ST. **HEMBRA/RPMI:** citotoxicidad del suero E frente a células de hembra, tras haber sido absorbido con medio de cultivo RPMI. **C':** control negativo de complemento en ausencia de suero.

testículo. En este experimento se introdujo un nuevo control negativo consistente en comprobar el poder citotóxico del suero anti-Sxs (suero E) frente a células de hembra, tras haber sido absorbido simplemente con medio de cultivo RPMI (curva *hembra/RPMI*). Los porcentajes de lisis observados en este control fueron claramente inferiores a los mostrados por el control positivo (*RPMI*) y a los de suero absorbido con líquido de epidídimo (*LE*) o suero de macho (*Sia*).

CITOGENETICA DE *Gallus domesticus*

Un aspecto cuyo estudio resulta imprescindible en un trabajo como el que nos ocupa, es la identificación y caracterización de los cromosomas de los embriones de pollo utilizados para realizar cada uno de los experimentos, especialmente la de los cromosomas sexuales, lo que permite conocer directamente su sexo genético.

El cariotipo de la especie *Gallus domesticus* consta de $2n=78$ cromosomas, de los cuales 5 parejas de autosomas y el cromosoma Z son fácilmente identificables por su mayor tamaño (macro-cromosomas), mientras que el resto son de un tamaño extremadamente reducido (micro-cromosomas), entre los que se encuentra al cromosoma W (figura 14a).

Mientras que el Z es un macro-cromosoma fácilmente identificable por ser el único metacéntrico de entre ellos, por el contrario el W, que también es metacéntrico, resulta imposible de identificar mediante técnicas de tinción convencionales, debido a su condición de micro-cromosoma. Sin embargo, la aplicación de las técnicas de bandeo C permite una fácil identificación de este cromosoma, dado que es claramente C positivo (figura 14b). Por lo que respecta al resto de

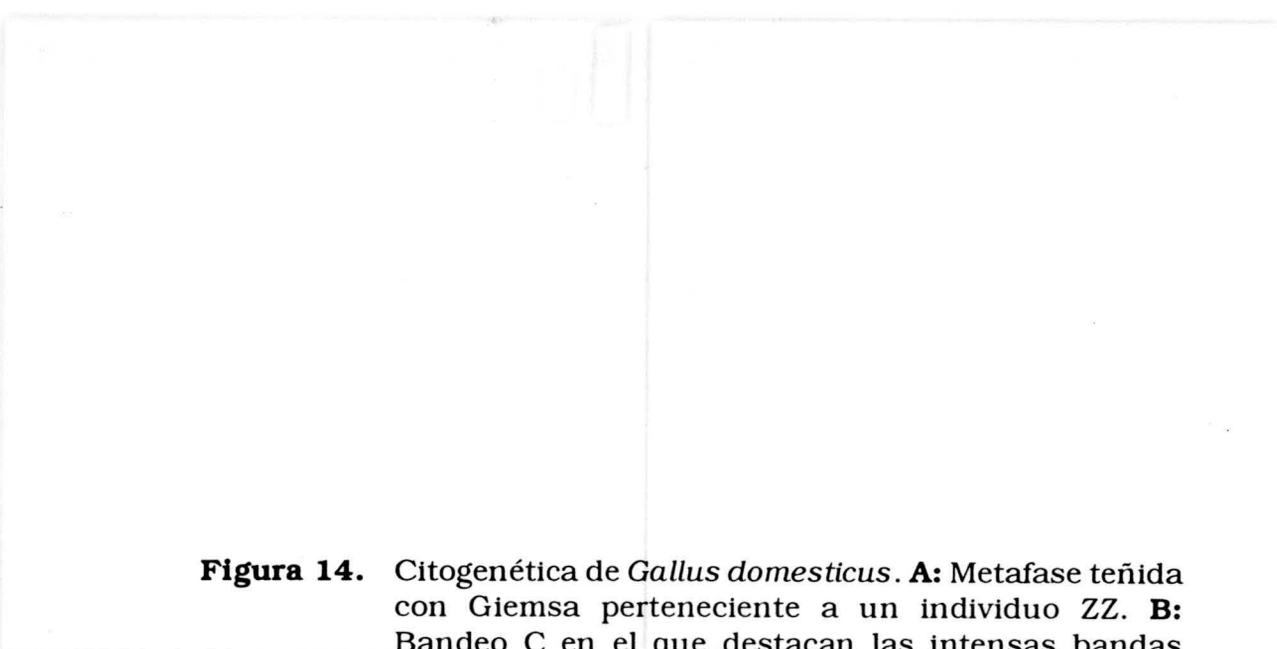


Figura 14. Citogenética de *Gallus domesticus*. **A:** Metafase teñida con Giemsa perteneciente a un individuo ZZ. **B:** Bandeo C en el que destacan las intensas bandas teloméricas de los cromosomas Z y la tinción positiva de todo el cromosoma W (inserto). **C:** Bandeo G correspondiente a un macho en el que se puede observar la banda telomérica G-negativa del cromosoma Z. **D:** Tinción con cromomicina A₃ donde destacan igualmente la intensa banda telomérica del cromosoma Z y la tinción positiva de todo el cromosoma W.

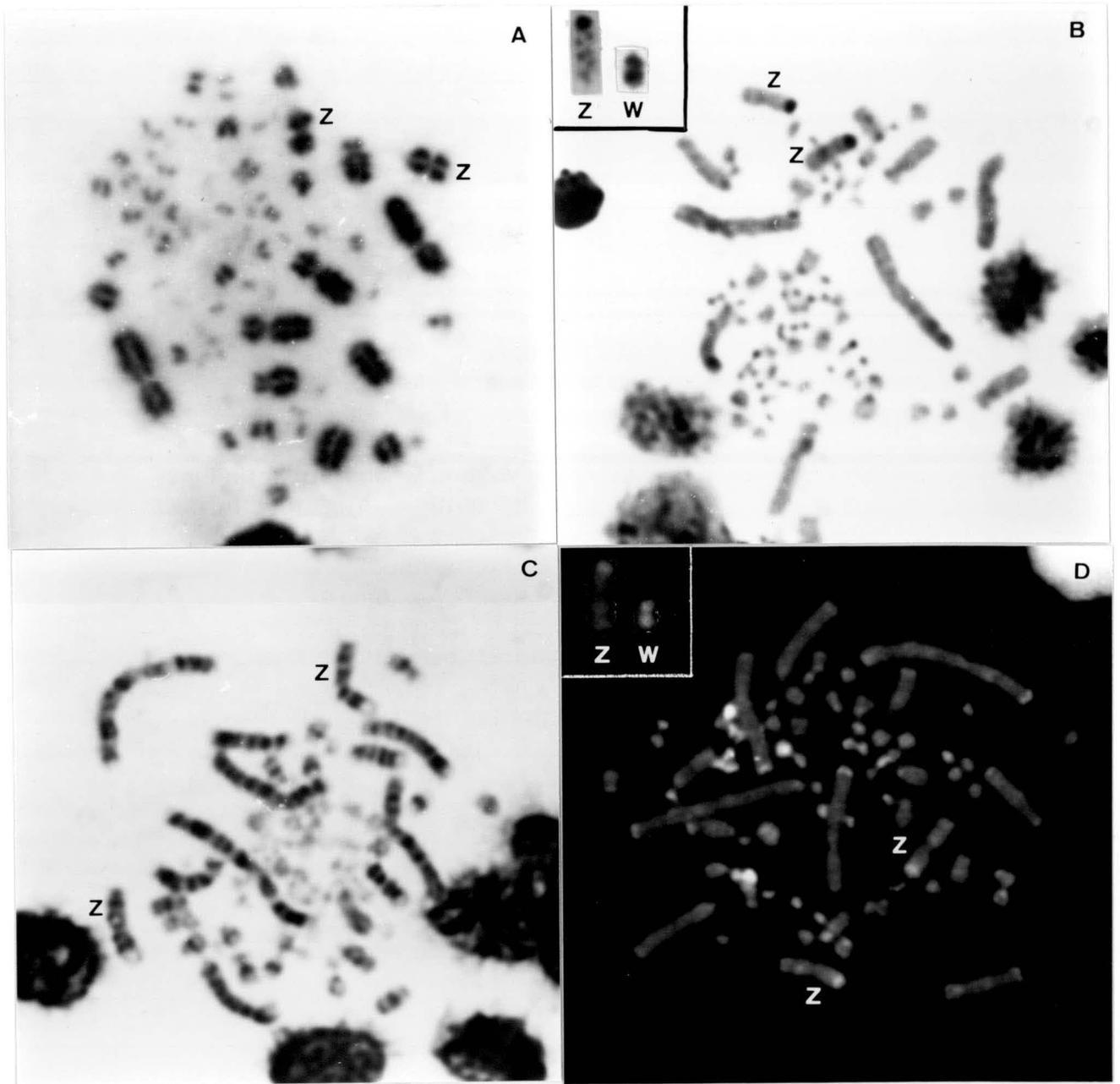


FIG 14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
11 NOV. 1991
COMISION DE POSTGRADO

cromosomas, solamente el Z muestra una banda telomérica. De entre los micro-cromosomas, sólo algunas pocas parejas muestran tinción positiva, mientras que la gran mayoría de ellos son C negativos.

El empleo de las técnicas de bandeo G produce un patrón de bandas característico que define claramente cada pareja de macro-cromosomas (figura 14c). Es de destacar la banda G negativa que aparece en el telómero del cromosoma Z, que se corresponde con la banda C positiva descrita anteriormente. Por otra parte, esta técnica no aporta información destacable sobre los micro-cromosomas, debido al exiguo tamaño de los mismos.

La tinción con cromomicina A₃ provoca la aparición de bandas teloméricas en todos los macro-cromosomas, entre las que destaca las correspondientes a las bandas C⁺ y G⁻ del cromosoma Z (figura 14d). Entre los micro-cromosomas, algunas parejas muestran también tinción positiva con este fluorocromo, destacando el cromosoma W que aparecía brillante en toda su longitud.

TRATAMIENTO *in vivo* DE LOS EMBRIONES

Con objeto de investigar el posible efecto de la administración *in vivo* de antígeno Sxs exógeno sobre embriones de pollo, se han realizado un total de ocho experimentos en los que se han probado las distintas fuentes de antígeno en diferentes dosis. La tabla IX resume los tratamientos usados y los resultados obtenidos en tales experimentos. Para la administración del antígeno Sxs, se siguieron protocolos en los que se introdujeron las siguientes variables:

- 1) tipo de fuente de antígeno utilizada (suero de rata macho,

líquido de epidídimo, sobrenadante de testículo, sobrenadante de ovario de gallina y medio condicionado por células de Sertoli),

2) volumen final suministrado (desde 200 hasta 1200 μ l),

3) número de dosis aplicadas (de una a tres) y

4) momento del desarrollo en el que se estudiaron los embriones.

De un total de 610 embriones analizados, 509 fueron tratados con alguna de las fuentes de antígeno en la forma que acabamos de mencionar. De los 101 embriones restantes, 61 fueron utilizados como controles negativos en los distintos experimentos, mediante la administración de diferentes dosis de PBS sin Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺, medio de cultivo (BME) o suero de rata hembra (carentes de antígeno Sxs), tres fueron simplemente manipulados, abriéndoseles una ventana en el cascarón similar a la del resto y, finalmente, 37 huevos fueron incubados sin ningún tipo de manipulación, para que sirvieran como blancos. De los 509 embriones tratados, todos fueron analizados el día 16 de incubación, excepto los 40 que habían sido tratados con 1200 μ l de MCS administrados en tres dosis, que fueron estudiados el día 9.

La manipulación y el tratamiento de los huevos, redujo considerablemente la viabilidad de los embriones, de manera que el porcentaje de supervivencia cayó hasta el 30% en los controles manipulados y hasta el 28% entre los tratados con alguna fuente de antígeno. Como consecuencia, el número total de embriones tratados con antígeno Sxs en los que fue posible estudiar la correspondencia entre los sexos genético y fenotípico fue de 142. Por otra parte, una proporción variable de los embriones que sobrevivieron al tratamiento

mostró algún tipo de malformación. Estas malformaciones afectaron generalmente al desarrollo de la región abdominal, que en numerosas ocasiones apareció abierta.

Los 142 embriones supervivientes fueron diseccionados y observados con la ayuda de un estereomicroscopio, con objeto de determinar posibles alteraciones en el sexo fenotípico. Para ello, se atendió a características tales como la morfología de las gónadas, presencia o no de los conductos de Wolff y de Müller y de la glándula de la cáscara. Tras este examen anatómico, no apareció ningún caso en que hubiera falta de correspondencia entre el sexo fenotípico del embrión y su sexo genético. Así, en los individuos de sexo masculino, tanto la gónada izquierda como la derecha muestran el mismo desarrollo, encontrándonos por tanto con dos testículos aproximadamente del mismo tamaño, ambos con apariencia cilíndrica (figura 15a). En individuos de sexo femenino, por el contrario, la gónada derecha está muy reducida mostrando un tamaño mucho menor que el ovario, situado a la izquierda, que a diferencia de los testículos, muestra un aspecto mucho más plano (figura 15b).

En el examen anatómico del sexo de los embriones, además del tipo de gónadas que presentaban, se estudiaron otras características relacionadas también con la diferenciación sexual. Así, se observó si estaban desarrollados los conductos de Müller junto con la glándula de la cáscara en las hembras, y los conductos de Wolff en los machos (figuras 15a y b). Sin embargo, quedaba aún la posibilidad de que se hubiese producido algún tipo de alteración no detectable mediante un simple examen anatómico de las gónadas. Por esta causa se realizó un estudio histológico de dichas gónadas, que confirmó plenamente los resultados anteriores. Así, ambos testículos de todos los machos tratados mostraban unas características histológicas típicas, con pleno desarrollo de la túnica albugínea y de túbulos seminíferos envueltos por

una matriz de células de Leydig (figura 15c). No obstante, solamente un embrión mostró algún tipo de anomalía que implicase la morfología de las gónadas. Este individuo presentaba sexo genético de macho y había sido tratado con 800 μ l de medio condicionado por células de Sertoli (MCS), administradas en tres dosis pero, a diferencia de los machos normales, su gónada izquierda apareció dividida en dos mitades de aproximadamente el mismo tamaño. El examen histológico demostró sin embargo, que tanto la gónada derecha como ambas mitades de la izquierda, presentaban unas características típicamente testiculares. Las hembras mostraban en su gónada izquierda una histología típica de ovario, con un cortex plenamente desarrollado y diferenciado de la médula formado por la proliferación de las oogonias rodeadas de una túnica (figura 15d) y la gónada derecha mostraba, como es típico, un tamaño reducido y su histología denotaba falta de desarrollo.

A pesar de estos resultados, es interesante destacar que, mientras que en los controles hubo el mismo número de machos que de hembras (28 de cada sexo), de los 142 embriones que sobrevivieron al tratamiento con antígeno Sxs, 84 fueron machos y 58 hembras, valores que se apartan significativamente de la proporción 1:1 esperada ($\chi^2=4.76$; $0.05 > p > 0.02$). Si consideramos los distintos tratamientos por separado, sólo encontramos diferencias significativas en el grupo de huevos tratados con MCS ($\chi^2=5.8$; $0.02 > p > 0.01$), lo que implica que esta desviación de la relación de sexos sólo se produjo por causa de este tratamiento.

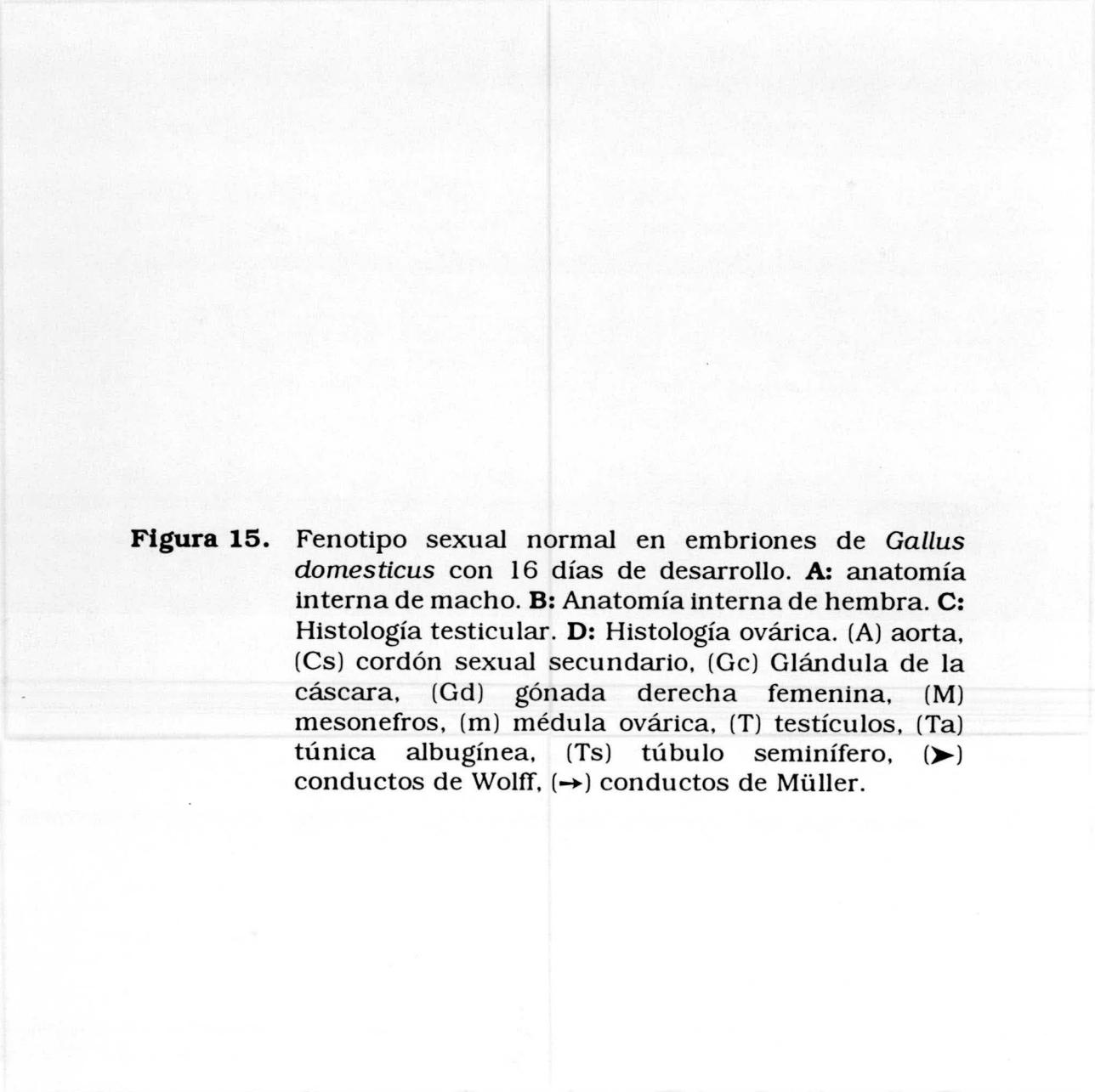


Figura 15. Fenotipo sexual normal en embriones de *Gallus domesticus* con 16 días de desarrollo. **A:** anatomía interna de macho. **B:** Anatomía interna de hembra. **C:** Histología testicular. **D:** Histología ovárica. (A) aorta, (Cs) cordón sexual secundario, (Gc) Glándula de la cáscara, (Gd) gónada derecha femenina, (M) mesonefros, (m) médula ovárica, (T) testículos, (Ta) túnica albugínea, (Ts) túbulo seminífero, (▶) conductos de Wolff, (→) conductos de Müller.

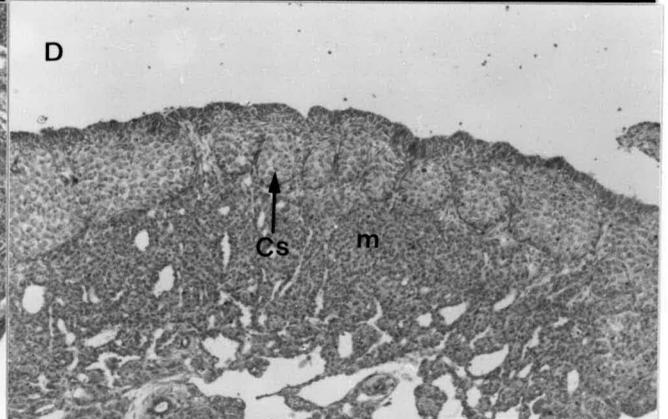
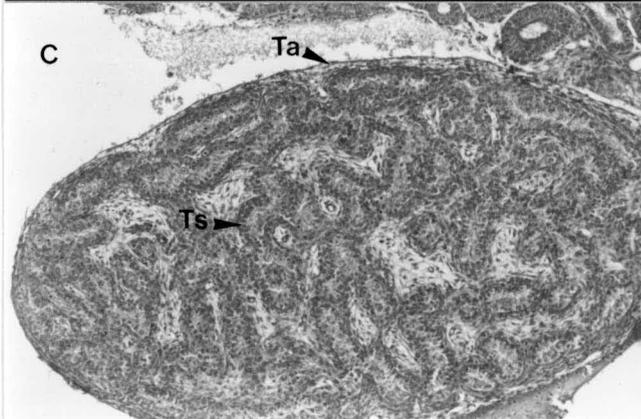
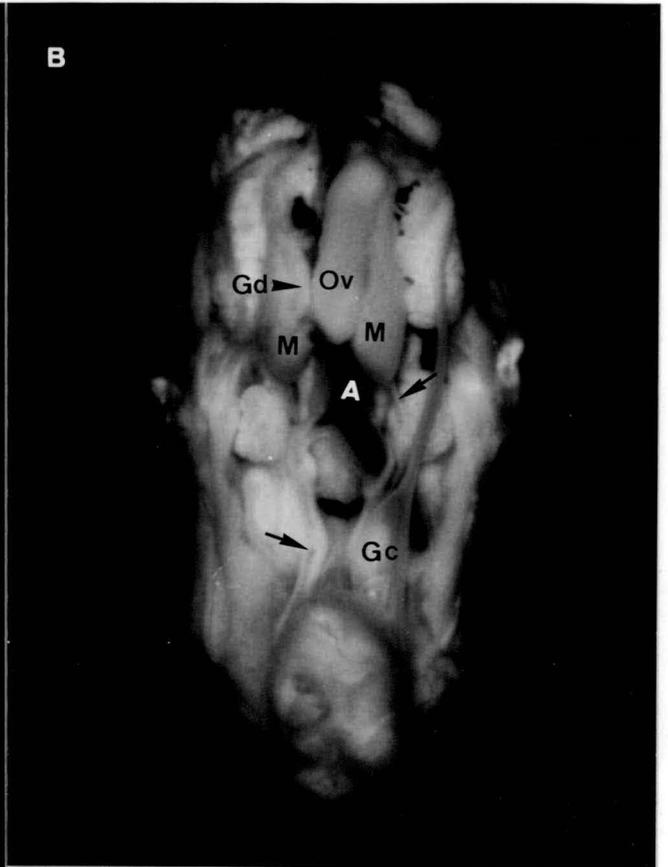
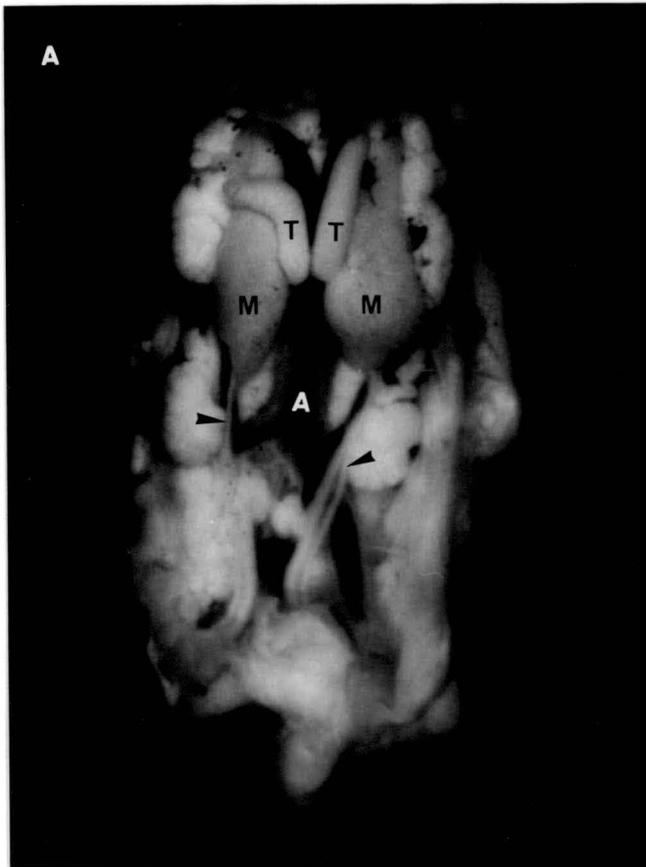


FIG 15

TRATAMIENTO *in vitro* DE LAS GONADAS EMBRIONARIAS

A la vista de los resultados obtenidos con embriones tratados *in vivo* con las diferentes fuentes de antígeno Sxs, resultaba obvia la necesidad de abordar este problema de un modo diferente. Así, con objeto de evitar los inconvenientes que plantea el tratamiento *in vivo*, que serán analizados en detalle en la discusión de este trabajo, comenzamos el tratamiento de las gónadas embrionarias *in vitro*. Para ello, las gónadas fueron extraídas junto con el mesonefros entre los días 7º y 9º de incubación, colocadas en una placa de petri que contenía el volumen de medio de cultivo necesario para cubrir la muestra y cultivadas durante 6 días en una estufa con una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C. Los resultados obtenidos demostraron que, en estas condiciones, los tejidos mas superficiales de la muestra, entre los que se encontraban los primordios gonadales, podían mantener su crecimiento y desarrollo, mientras que los más internos degeneraban.

En la tabla X se resumen los resultados de estos experimentos, en los que las gónadas de 72 embriones (27 machos y 45 hembras) fueron cultivadas en presencia de dos fuentes de antígeno Sxs diferentes, sobrenadante de testículo (600 µl por cada 10 ml de medio BME) y medio condicionado por células de Sertoli. Como controles de estos experimentos se cultivaron gónadas de 28 embriones (16 machos y 12 hembras) en medio de cultivo BME sin SBF. Como puede observarse en la tabla, no todas las muestras cultivadas pudieron ser estudiadas, ya que en algunas de ellas las gónadas degeneraron por estar cubiertas por restos de otros tejidos, lo que impidió su acceso directo al medio de cultivo.

Como controles de los posibles cambios que sufriesen las gónadas

al ser cultivadas, se realizó un estudio histológico de gónadas pertenecientes a individuos de 7, 8 y 9 días de incubación. En estos estadios del desarrollo, las gónadas de ambos sexos, presentaban ya características típicas de cada sexo aunque la diferenciación de las mismas era aún incipiente.

Así, en los embriones macho, ambas gónadas presentaban indicios de túbulos seminíferos, aunque el desarrollo y diferenciación de los mismos era aún escaso. Además, la gónada izquierda, a diferencia de lo que ocurre en la derecha, presentaba un cortex ovárico que estaba menos diferenciado que el de la gónada izquierda de las hembras (figuras 16a y b).

En las hembras, ambas gónadas mostraban aún un tamaño similar, presentando una médula compacta sin que se pudiera observar diferenciación alguna de los cordones sexuales secundarios. La gónada izquierda presentaba un cortex bien patente y desarrollado, mientras la derecha carecía por completo de dicho cortex (figuras 17a y b).

Gónadas cultivadas en ausencia de Sxs

Mediante estos experimentos hemos podido constatar que los primordios gonadales, tanto masculinos como femeninos continúan su proceso de diferenciación cuando son cultivados en medio BME sin suero bovino fetal. Así, en los machos se observó el desarrollo de túbulos seminíferos en ambas gónadas y la desaparición del cortex ovárico de la izquierda (figura 16c y g). Por su parte, en las hembras fué patente el desarrollo del cortex ovárico y la consiguiente diferenciación de cordones sexuales secundarios en la gónada izquierda (figuras 17c y g), mientras que la derecha no se desarrollaba (figura 17d). El desarrollo de estas gónadas fué, sin embargo, menos acusado que el que

se observó en embriones de trece a quince días de incubación *in vivo*, hecho que puede ser atribuido a las condiciones del experimento en general y no a la presencia o ausencia del antígeno Sxs (figuras 16g y h; figuras 17g y h).

Gónadas cultivadas en presencia de Sxs

Las gónadas de individuos ZZ (genéticamente machos) cultivadas en presencia de cualquiera de las dos fuentes de antígeno Sxs mencionadas anteriormente, sufren modificaciones en su proceso de diferenciación sexual. Así, de un total de 17 casos que pudieron ser estudiados, 14 de ellos mostraron alteraciones de dicho proceso, de los cuales 7 fueron tratados con sobrenadante de testículo y los otros 7 con medio condicionado por células de Sertoli. En ambos tratamientos el resultado obtenido fué similar observándose alteraciones que afectaron tanto a la médula como al cortex de las gónadas (figuras 16d, e y f). Por lo que respecta a la médula, la característica más llamativa fué la desaparición de cualquier signo de diferenciación de los túbulos seminíferos, resultando una médula compacta y totalmente indiferenciada, cosa que no ocurrió en las gónadas cultivadas en medio BME usadas como controles (figura 16c). Con relación al cortex de la gónada izquierda (recuérdese que la derecha carece de éste) y a diferencia de lo que ocurrió en dichos controles, se observó que éste se había mantenido conservando incluso sus células germinales (figuras 16d y f). Estas características histológicas pueden ser consideradas como un claro signo de feminización en unas gónadas que, en ausencia de tratamiento, se habrían desarrollado como testículos.

Las gónadas de individuos ZW (genéticamente hembras),

cultivadas en presencia de Sxs mostraron generalmente un desarrollo normal. Así, en la gónada izquierda, que normalmente da lugar al único ovario de las aves, se observó el desarrollo de cordones sexuales secundarios idénticos a los que aparecieron en las gónadas de los embriones ZW, cultivadas en medio BME (controles) (figuras 17c y g). La gónada derecha, por el contrario, no se desarrolló quedando en un estado indiferenciado (figuras 17c). Sin embargo, entre un total de 17 embriones hembra cultivados en medio condicionado por células de Sertoli, apareció uno que mostraba alteraciones en la diferenciación sexual. En este individuo, la gónada izquierda tuvo un escaso desarrollo ya que en su mayor parte no estuvo en contacto directo con el medio de cultivo por haber quedado oculta bajo otros tejidos. Sorprendentemente, en este individuo se produjo un desarrollo bastante acusado de la gónada derecha, que presentaba un cortex ovárico en el que se encontraban células germinales y cordones sexuales secundarios con cierto grado de diferenciación (figuras 17e y f). Este fenómeno podría ser observado como un caso de hipperfeminización en un individuo que, en ausencia de tratamiento, habría tenido un desarrollo femenino normal.

Figura 16. Efectos del cultivo de las gónadas de embriones de pollo macho en presencia y ausencia de antígeno Sxs. **A:** Testículo izquierdo en el momento de iniciar el cultivo (7-9 días de incubación); nótese la clara diferenciación entre el córtex y la médula, en la que aparecen indicios del desarrollo de túbulos seminíferos. **B:** Testículo derecho en el momento de iniciar el cultivo; nótese la ausencia de córtex. **C:** testículo cultivado en ausencia de Sxs; el córtex ha desaparecido y se han desarrollado los túbulos seminíferos de la médula. **D:** Testículo izquierdo feminizado tras haber sido cultivado en presencia de Sxs; el córtex ha permanecido, mientras que la médula ha quedado en un estado completamente indiferenciado. **E:** Testículo derecho feminizado, cultivado en presencia de Sxs; en este caso, la feminización se denota por la falta de desarrollo de los túbulos seminíferos. **F:** detalle del córtex y la médula de un testículo izquierdo feminizado por el antígeno Sxs; nótese la presencia de células germinales en el córtex (►). **G:** Detalle de un testículo cultivado en ausencia de Sxs, con claro desarrollo de los túbulos seminíferos. **H:** Detalle de un testículo desarrollado *in vivo*, perteneciente a un embrión de 13-15 días de incubación; en este caso, el desarrollo de los túbulos seminíferos es ligeramente superior al que muestra la figura G.

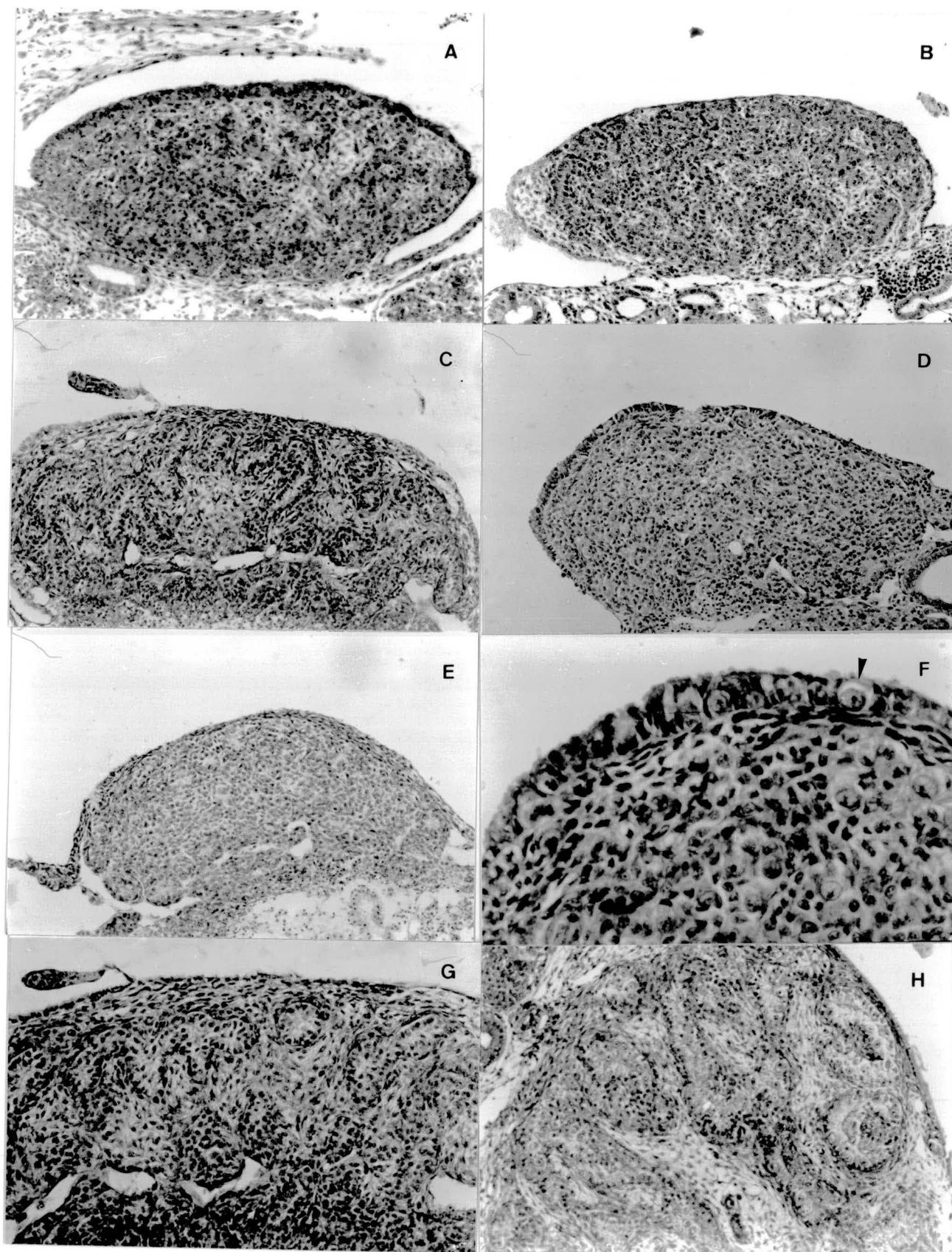


FIG 16

Figura 17. Efectos del cultivo de las gónadas de embriones de pollo hembra en presencia y ausencia de antígeno Sxs. **A:** Ovario izquierdo en el momento de iniciar el cultivo (7-9 días de incubación); nótese la clara diferenciación entre el córtex y la médula. **B:** Ovario derecho en el momento de iniciar el cultivo; nótese la ausencia de cortex. **C:** Aspecto que muestra un ovario izquierdo tras ser cultivado ya sea en presencia o en ausencia de Sxs; nótese la proliferación de los cordones sexuales secundarios. **D:** Aspecto de la gónada derecha tras haber sido cultivada ya sea en presencia o en ausencia de Sxs; siguiendo su curso natural, esta gónada queda reducida e indiferenciada. **E:** Gónada de una hembra cultivada en presencia de Sxs, en la que se puede observar el desarrollo ovárico de la gónada derecha (d) y la degeneración de la mayor parte de la izquierda (i). **F:** Aspecto general de la gónada derecha del individuo representado en la figura E; nótese el desarrollo del córtex y la incipiente formación de los cordones sexuales secundarios. **G:** Detalle de un ovario izquierdo cultivado en presencia o ausencia de Sxs, con claro desarrollo del córtex y proliferación de cordones sexuales secundarios. **H:** Aspecto general de un ovario desarrollado *in vivo*, perteneciente a un embrión de 13-15 días de incubación; en este caso, el desarrollo de los cordones sexuales secundarios es ligeramente superior al que muestra la figura G.

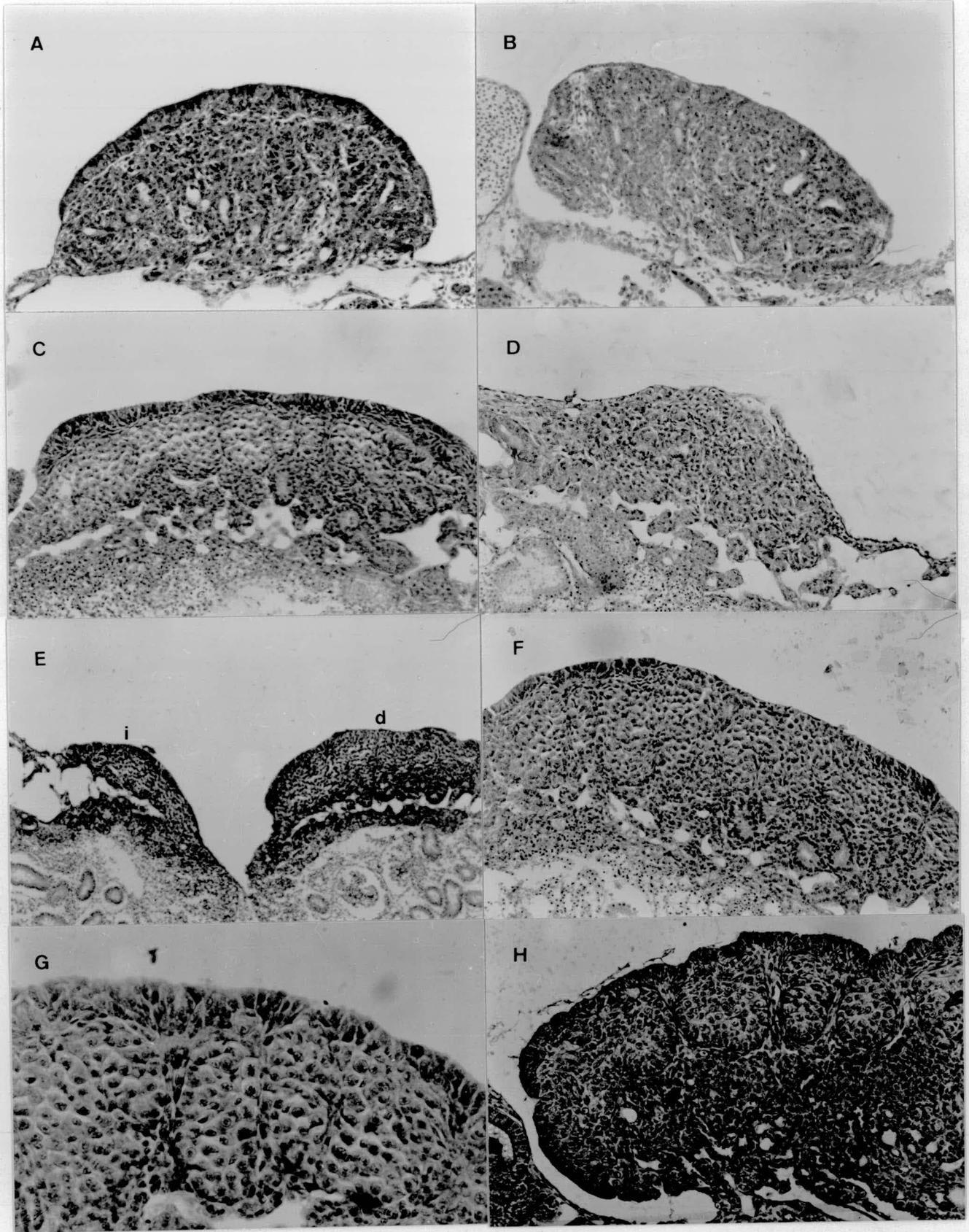


FIG17

UNIVERSIDAD DE GRANADA

11 NOV. 1991

COMISION DE DOCTORADO

TABLAS

Tabla I*. Comparación de los niveles de citotoxicidad del suero E en presencia de complemento absorbido (C'a) y no absorbido (C').

	Diluciones de suero anti-Sxs				C'	C'a
	1	1/2	1/4	1/8		
C'+S	56±4.0	56±3.5	57±5.1	40±2.5	32±2.9	18±3.2
C'a+S	54±3.5	54±4.3	42±2.8	38±2.2		
S	10±1.9	11±1.8	9±2.0	10±1.1		

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

C'+S: Suero E en presencia de complemento sin absorber.

C'a+S: Suero E en presencia de complemento absorbido.

S: Suero E en ausencia de complemento.

C': Control negativo de complemento sin absorber en ausencia de suero.

C'a: Control negativo de complemento absorbido en ausencia de suero.

Tabla II*. Comparación de los niveles de citotoxicidad de los sueros E, LE, MT y SM.

Dilución	Sueros							
	E		LE		MT		SM	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1	67±8.0	15±4.0	26±6.0	3±2.0	19±4.0	13±5.0	14±3.0	9±2.0
1/2	36±4.0	11±3.5	30±6.0	9±1.0	25±5.0	10±4.0	18±3.0	12±3.0

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

E: Suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos.

LE: Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con líquido de epidídimo.

MT: Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con macerado de testículo.

SM: Suero obtenido mediante inmunización subcutánea con suero de macho.

♂: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de macho.

♀: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de hembra.

Tabla III*. Comparación de los niveles de citotoxicidad de los sueros E, I, MP.

Suero		Diluciones del suero anti-Sxs				C'
		1	1/2	1/4	1/8	
E	♂	59±5.0	82±3.0	77±2.6	51±5.0	7±1.0
	♀	32±4.0	46±4.3	35±3.5	31±2.5	7±1.5
MP	♂	26±4.2	27±3.4	21±3.6	32±2.5	
	♀	17±3.5	30±2.7	23±2.5	22±3.4	
I	♂	23±2.5	16±2.3	16±1.0	20±3.8	
	♀	5±1.0	9±2.3	9±2.5	3±2.0	

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

E: Suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos.

MP: Suero obtenido de hembra múltipara.

I: Suero obtenido mediante inmunización intraesplénica con piel.

♂: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de macho.

♀: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de hembra.

C': Control negativo de complemento en ausencia de suero.

Tabla IV*. Comparación de los niveles de citotoxicidad de los sueros E, ITC, IPC y TC.

Suero		Diluciones del suero anti-Sxs					C'
		1	1/2	1/4	1/8	1/16	
E	♂	44±2.0	58±1.0	60±1.6	63±5.0	48±1.0	10±13
	♀	30±4.0	30±1.3	41±0.5	42±2.2	33±1.4	10±1.0
ITC	♂	24±5.0	30±2.3	33±2.6	37±4.5	34±1.2	
	♀	10±0.5	11±0.7	17±5.7	23±3.8	26±0.7	
IPC	♂	23±1.3	31±3.0	35±6.7	38±7.8	42±8.0	
	♀	10±1.4	16±5.0	23±2.0	21±5.0	26±3.0	
TC	♂	20±7.0	35±6.6	40±8.0	43±2.0	37±8.0	
	♀	10±1.0	19±7.0	21±3.3	29±9.9	27±5.0	

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

E: Suero obtenido mediante inmunización intraperitoneal con esplenocitos.

ITC: Suero obtenido mediante inmunización intraesplénica con una emulsión de sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund.

IPC: Suero obtenido mediante inmunización intraesplénica con piel más dosis de recuerdo con una emulsión de sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund.

TC: Suero obtenido mediante repetidas inmunizaciones subcutáneas con una emulsión de sobrenadante de testículo y coadyuvante de Freund.

♂: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de macho.

♀: Citotoxicidad del suero frente a esplenocitos de hembra.

Tabla V*. Niveles de citotoxicidad del suero anti-Sxs absorbido con medio RPMI, Medio condicionado por células de Sertoli, líquido de epidídimo y sobrenadante de testículo.

Fuente de Sxs	Diluciones de suero anti-Sxs					C'
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	
RPMI	34±8.0	42±6.0	54±9.0	51±5.0	40±9.9	8±3.0
MCS	32±9.9	34±9.8	44±5.0	22±9.7	23±9.9	
LE	22±4.0	20±7.0	19±8.0	20±4.0	20±9.0	
ST	8±2.0	6±1.0	7±6.5	1±1.0	5±3.5	

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

RPMI: Suero anti Sxs absorbido con medio RPMI.

MCS: Suero anti Sxs absorbido con medio condicionado por células de Sertoli.

LE: Suero anti Sxs absorbido con líquido de epidídimo.

ST: Suero anti Sxs absorbido con sobrenadante de testículo.

C': Control negativo de complemento en ausencia de suero.

Tabla VI*. Niveles de citotoxicidad del suero E tras ser absorbido con medio condicionado por células de Sertoli, sobrenadante de ovario de gallina y sobrenadante de testículo.

Fuente de Sxs	Diluciones de suero anti-Sxs				C'
	1/2	1/4	1/8	1/16	
RPMI	76±7.0	81±7.0	79±6.0	64±5.5	25±3.0
MCS	67±6.0	62±5.0	55±7.0	54±7.5	
SOG	53±6.0	51±7.0	51±6.5	47±6.0	
ST	15±4.0	10±3.0	14±3.5	8±2.0	

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

RPMI: Suero E absorbido con medio RPMI.

MCS: Suero E absorbido con medio condicionado por células de Sertoli.

SOG: Suero E absorbido con sobrenadante de ovario de gallina.

ST: Suero E absorbido con sobrenadante de testículo.

C': Control negativo de complemento en ausencia de suero.

Tabla VII*. Niveles de citotoxicidad del suero E tras ser absorbido con suero de rata macho sometido a diferentes pretratamientos.

Fuente de Sxs	Diluciones de suero anti-Sxs					C'
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	
RPMI	51±8.0	41±5.0	44±5.0	49±5.0	45±6.0	17±7.0
S	66±7.0	64±6.5	51±5.0	63±6.5	47±4.3	
Si	59±4.0	38±6.0	42±5.3	35±4.0	35±5.4	
Sia	48±3.0	27±2.0	38±4.5	40±5.0	30±3.5	

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

RPMI: Suero E absorbido con medio RPMI.

S: Suero E absorbido con suero de macho no pretratado.

Si: Suero E absorbido con suero de macho inactivado.

Sia: Suero E absorbido con suero de macho inactivado y absorbido con células de ratón.

C': Control negativo de complemento en ausencia de suero.

Tabla VIII*. Niveles de citotoxicidad del suero **E** tras ser absorbido con suero de macho inactivado y absorbido, líquido de epidídimo y sobrenadante de testículo.

Fuente de Sxs	Diluciones de suero anti-Sxs				C'
	1	1/2	1/4	1/8	
RPMI	38±7.0	36±5.0	29±6.0	21±3.1	11±3.0
Sia	19±5.0	16±4.0	14±4.0	16±2.7	
LE	15±4.0	12±3.0	11±3.0	6±2.0	
ST	7±2.0	7±1.0	7±2.5	7±1.0	
♀/RPMI	13±3.0	14±2.5	10±4.0	12±3.5	

*: Los datos consignados en esta tabla corresponden a los porcentajes de células muertas en las pruebas de citotoxicidad.

RPMI: Suero anti Sxs absorbido con medio RPMI.

Sia: Suero anti Sxs absorbido con suero de macho inactivado y absorbido.

LE: Suero anti Sxs absorbido con líquido de epidídimo.

ST: Suero anti Sxs absorbido con sobrenadante de testículo.

♀/RPMI: Nivel de citotoxicidad del suero **E** absorbido con RPMI, frente a células de hembra.

C': Control negativo de complemento en ausencia de suero.

Tabla IX. Tratamiento *in vivo* de embriones de pollo con distintas fuentes de antígeno Sxs.

Fuente	Tratamiento (μl)	Nº huevos	Superv. (%)	1 dosis	Superv. (%)	2 dosis	Superv. (%)	3 dosis	Superv. (%)	Sexo				
										Genético ♂	Genético ♀	Gonadal ♂	Gonadal ♀	
CONTROLES														
	---	37	100	---	---	---	---	---	---	19	18	19	18	
	ventana	3	33	---	---	---	---	---	---	1	0	1	0	
PBS sin Ca ⁺⁺ /Mg ⁺⁺	200	9	44	9	44	---	---	---	---	2	2	2	2	
	300	4	50	4	50	---	---	---	---	2	0	2	0	
	500	3	66	3	66	---	---	---	---	0	2	0	2	
	600	4	50	4	50	---	---	---	---	2	0	2	0	
	800	5	20	---	---	---	---	5	20	0	1	0	1	
Suero hembra	500	3	100	3	100	---	---	---	---	1	2	1	2	
	800	5	0	---	---	---	---	5	0	0	0	0	0	
BME	200	5	20	5	20	---	---	---	---	0	1	0	1	
	500	5	0	5	0	---	---	---	---	0	0	0	0	
	750	3	0	---	---	---	---	3	0	0	0	0	0	
	800	5	20	---	---	---	---	5	20	0	1	0	1	
	1000	5	20	2	0	3	33	---	---	0	1	0	1	
	1200	5	20	---	---	---	---	5	20	1	0	1	0	
SUBTOTAL		101	30	35	43	3	33	23	13	28	28	28	28	
TRATADOS														
SOG	500	9	22	9	22	---	---	---	---	2	0	2	0	
	800	10	40	---	---	---	---	10	40	1	3	1	3	
ST	500	22	14	14	21	8	0	---	---	1	2	1	2	
	800	10	20	---	---	---	---	10	20	1	1	1	1	
	1000	6	0	2	0	4	0	---	---	0	0	0	0	
LE	400	3	100	3	100	---	---	---	---	2	1	2	1	
	500	27	33	27	33	---	---	---	---	3	6	3	6	
	800	10	20	---	---	---	---	10	20	2	0	2	0	
MCS	300	10	30	---	---	10	30	---	---	3	0	3	0	
	500	37	46	17	18	20	70	---	---	11	6	11	6	
	800	10	30	---	---	---	---	10	30	2	1	2	1	
	1000	126	41	111	41	15	47	---	---	33	19	33	19	
	1200	*40	40	---	---	---	---	40	40	8	8	8	8	
SR♂	200	54	9	54	9	---	---	---	---	3	2	3	2	
	300	65	19	65	19	---	---	---	---	6	6	6	6	
	400	20	0	20	0	---	---	---	---	0	0	0	0	
	500	25	36	25	36	---	---	---	---	6	3	6	3	
	600	15	0	15	0	---	---	---	---	0	0	0	0	
	800	10	0	---	---	---	---	10	0	0	0	0	0	
	SUBTOTAL		509	28	362	26	57	37	90	26	84	58	84	58
TOTAL		610	32	397	27	60	42	113	27	112	86	112	86	

BME: Medio basal de Eagle sin suero bovino fetal.

SOG: Sobrenadante de ovario de gallina.

ST: Sobrenadante de testículo.

LE: Líquido de epidídimo.

MCS: Medio condicionado por células de Sertoli.

SR♂: Suero de rata macho.

*: Estos individuos fueron analizados a los 9 días de incubación

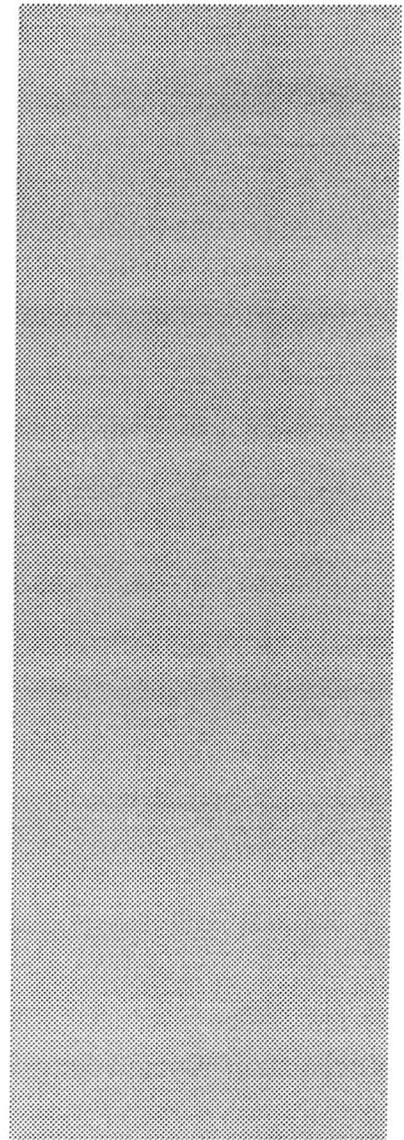
TABLA X. Tratamiento *in vitro* de gónadas embrionarias con antígeno Sxs.

Fuente de Sxs	Nº Embriones	Días de incubación previa						Subtotal		Total
		7		8		9		♂	♀	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀			
BME	Tratados	8	3	8	4	0	5	16	12	28
	Estudiados	3	0	4	2	0	3	7	5	12
	Feminizados	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	% Est/Fem.	0	0	0	0	0	0	0	0	--
MCS	Tratados	0	12	11	18	4	11	15	41	56
	Estudiados	0	7	7	5	2	5	9	17	26
	Feminizados	0	0	7	1	0	0	7	1	8
	% Est/Fem.	0	0	100	20	0	0	78	6	--
ST	Tratados	12	4	0	0	0	0	12	4	16
	Estudiados	8	0	0	0	0	0	8	0	8
	Feminizados	7	0	0	0	0	0	7	0	7
	% Est/Fem.	88	0	0	0	0	0	88	0	--

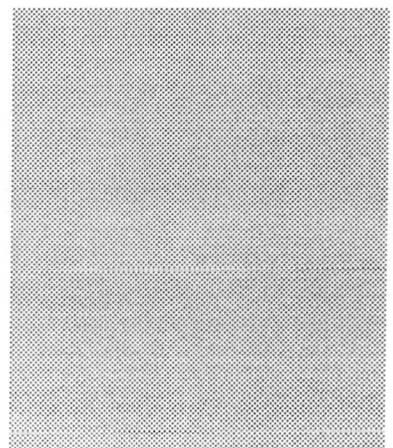
BME: Medio basal de Eagle sin suero bovino fetal.

MCS: Medio condicionado por células de Sertoli.

ST: Sobrenadante de testículo.



DISCUSSION



DISCUSION

CELULAS DIANA

Uno de los aspectos más importantes a la hora de estandarizar la realización de las pruebas de citotoxicidad consiste en la elección de células diana apropiadas. Las primeras células utilizadas con esta finalidad fueron los espermatozoides, que han sido utilizados ampliamente por la mayoría de los investigadores. Sin embargo este tipo de células presenta varios inconvenientes que las hacen inadecuadas para estas pruebas. Como se ha comentado anteriormente, resulta difícil distinguir entre espermatozoides vivos y muertos en las pruebas de citotoxicidad debido a la escasa cantidad de citoplasma que puede teñirse con azul tripán. Además, los espermatozoides reaccionan con gran facilidad con anticuerpos heterófilos, lo que exige un cuidadoso control de los antisueros utilizados, así como del suero fuente de complemento (Goodfellow y Andrews, 1982). Uno de los controles a los que deberían someterse estos sueros consiste en la determinación de su citotoxicidad inespecífica frente a células de hembra. Sin embargo, dado que los espermatozoides son células exclusivas del sexo masculino, se hace imposible determinar esta citotoxicidad de forma tal que pueda ser comparada con la citotoxicidad específica frente a espermatozoides.

Como una solución parcial a este problema ha sido norma general la absorción de estos sueros con células de hembra antes de su utilización en las pruebas. Aunque este procedimiento disminuye realmente la muerte celular inespecífica, también disminuye el título del antisuero ya que es un hecho comprobado que las células de hembra también absorben anticuerpos específicos anti-Sxs, aunque, por

supuesto, en cantidades mucho menores a lo que lo hacen las células de macho (Mayerová y col., 1984; Wachtel, 1983). Este hecho, reduce aún más los ya de por sí bajos títulos de estos antisueros.

Además, Hoppe y Koo (1984) demostraron que los espermatozoides van perdiendo Sxs durante el transporte a lo largo del epidídimo y vasos deferentes, eliminando totalmente su capacidad de ser lisados por un suero anti-Sxs tras la capacitación. Así, en las muestras de espermatozoides extraídas del epidídimo tendremos espermatozoides con niveles muy variables de antígeno y, por tanto, con distinta sensibilidad al suero. De hecho, Koo y col. (1973) demostraron la existencia en epidídimo de dos poblaciones de espermatozoides que diferían considerablemente en su contenido de antígeno Sxs, mediante marcaje inmunológico de los mismos y posterior observación al microscopio electrónico. Este hecho podría explicar los resultados de Hausman y Palm (1973) que, a través de técnicas de hemaglutinación con eritrocitos de carnero observaron que sólo el 50% de los espermatozoides formaban rosetas, aunque los autores utilizasen este resultado como prueba de una expresión postmeiótica del Sxs.

Esta variabilidad en los niveles de Sxs de los espermatozoides disminuye aparentemente los niveles de citotoxicidad específica, ya que el número de espermatozoides lisados disminuye considerablemente, limitando aún más la sensibilidad de las pruebas.

También se han utilizado en algunas ocasiones como células diana células epidérmicas obtenidas a través de complicados tratamientos de fragmentos de piel del rabo (Scheid y col., 1972; Worst y Fusening, 1973). Una de las mayores dificultades de su utilización radica precisamente en la dificultad de su obtención. Estos autores demostraron la sensibilidad de estas células frente a sueros anti-Sxs. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que los tratamientos

enzimáticos empleados en su obtención disminuyen considerablemente la viabilidad de estas células, y que son extremadamente sensibles al complemento, lo que las hace prácticamente inutilizables para estos fines. Además, debido al proceso de extracción las suspensiones celulares suelen presentar gran cantidad de células muertas de las capas más externas de la epidermis lo que hace que la muerte en los controles negativos sea muy alta. Estos hechos quizás han contribuido a que no hallan sido ampliamente utilizadas por otros investigadores.

Los eritrocitos también han sido utilizados como células diana para las pruebas de citotoxicidad. Estas células tenían la ventaja de que los niveles de lisis podrían estimarse mediante el porcentaje de hemoglobina liberado como consecuencia de la lisis celular (Wolf y col., 1980a y b). Sin embargo, Müller y col. (1980b) demostraron que, aunque los eritrocitos de individuos XY absorbían anticuerpos anti-Sxs, comprobando así la presencia de antígeno Sxs en su membrana, la unión de éste antígeno a la membrana de estas células es inespecífica no siendo por lo tanto una parte integrante de la misma. Así, tras los lavados necesarios para la preparación de las pruebas, los eritrocitos, o al menos una parte importante de ellos se convierten en Sxs negativos. Este hecho, junto con la observación de Müller y col. (1980b) de que el grado de lisis depende del grupo sanguíneo, conlleva los mismos problemas descritos anteriormente en relación con los niveles variables de Sxs en los espermatozoides, haciendo por tanto que este tipo de células no sea apropiado para la realización de las pruebas de citotoxicidad.

También han sido utilizadas para esta finalidad otros tipos de células, como células de cerebro disociadas (Schachner y Hämmerling, 1974), fibroblastos (Koo y col., 1981) y células de líneas preestablecidas que demostraron ser Sxs positivas, tales como células Raji (Fellous y

col., 1978). Sin embargo, los resultados obtenidos por estos autores no han sido generalmente reproducibles, por lo que estos tipos celulares no han sido de amplia utilización. De forma similar, la línea de células de Sertoli establecida en nuestro laboratorio (ver más adelante "Fuentes de antígeno Sxs"), ha demostrado ser inadecuada para su utilización como células diana por su facilidad para formar acúmulos celulares difícilmente disgregables y por su labilidad frente a los procesos de tripsinización. Por otra parte, en una supuesta prueba de citotoxicidad en que se utilizasen tales células como diana, no podría disponerse de células equivalentes de hembra para control negativo, ya que las células de Sertoli son exclusivas del sexo masculino.

Otro tipo de células dianas empleadas por diferentes autores han sido células linfoides obtenidas a partir de nódulos linfáticos y células esplénicas. Estas células también han presentado diversos problemas para su utilización en este tipo de técnicas. Así, Scheid y col. (1972) y Worst y Fusening (1973), mediante pruebas de citotoxicidad directas no pudieron poner de manifiesto la presencia de este antígeno en la superficie de estas células que, sin embargo, demostraron ser Sxs positivas mediante absorción de la capacidad citotóxica del suero y mediante técnicas de inmunofluorescencia.

Otros autores también demostraron la presencia de Sxs en estas células basándose en estas mismas técnicas (Engel y col., 1981, mediante absorción de la capacidad citotóxica, y Galbraith y col., 1978, mediante marcaje con FITC) y a través de la capacidad de unión de la proteína A de *Staphilococcus aureus* a la fracción Fc de las inmunoglobulinas G (Tokuda y col., 1977). Además, de forma indirecta, también es obvia la presencia de este antígeno en células esplénicas ya que han demostrado en repetidas ocasiones su poder inmunogénico en la obtención de sueros anti-Sxs.

Precisamente con este tipo de células Shapiro y Erickson (1981) y Shapiro y Goldberg (1984) demostraron mediante tratamientos enzimáticos que el determinante antigénico del Sxs es un carbohidrato.

Las células esplénicas han sido empleadas generalmente para determinar si un individuo es Sxs positivo, para lo cual se utilizaban invariablemente pruebas de citotoxicidad indirectas en las que el suero anti-Sxs era absorbido con estas células y posteriormente utilizado en una prueba directa con espermatozoides como células diana. Sin embargo, como ya hemos comentado no se obtenían resultados en este sentido utilizando estas células en pruebas de citotoxicidad directas.

Estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente trabajo, donde demostramos que, además de poseer capacidad para retirar anticuerpos anti-Sxs, este tipo de células es el más adecuado para su utilización como diana en las pruebas de citotoxicidad.

En nuestra opinión, existen dos causas que pueden explicar esta controversia:

- 1) Tal y como propusieron Ohno y col. (1981), el reconocimiento del antígeno Sxs puede estar restringido por el sistema mayor de histocompatibilidad. Prueba de ello es que células Sxs positivas de determinados haplotipos H-2 son incapaces de retirar la citotoxicidad de sueros anti-Sxs. Así, el suero anti-Sxs obtenido de una mujer HLA-A2 era capaz de lisar células de varón que tuviese este mismo haplotipo, pero no otro (Goulmy y col., 1977a). Igualmente, Scheid y col. (1972) demostraron que los sueros anti-Sxs originados en ratones H-2^b podían lisar células de machos H-2^b y H-2^d, pero en ningún caso lisaban células H-2^k. Por tanto, los sueros anti-Sxs podrían

reconocer una determinada asociación Sxs-H-2 (en ratón) o Sxs-HLA (en humanos), más que al Sxs propiamente dicho. Esto implicaría que probablemente, cualquier suero anti-Sxs fuese más citotóxico frente al mismo tipo de células usadas para la inmunización que frente a cualquier otro tipo celular. Por tanto, el hecho de que en aquellos casos en que los esplenocitos fueron utilizados sin éxito como células diana, los antisueros habían sido obtenidos mediante inmunización por trasplantes de piel podría explicar la citotoxicidad de los mismos frente a células epidérmicas y pero no frente a células esplénicas.

- 2) Excepto en el presente trabajo, en todos aquellos casos en los que se han usado células esplénicas como diana para pruebas de citotoxicidad, éstas se han obtenido por simple maceración del bazo sin purificación posterior, por lo que presentaban un alto grado de contaminación por eritrocitos. El hecho de que estas células pueden absorber o perder libremente el antígeno, junto con su alto grado de lisis inespecífica, puede distorsionar el resultado de los recuentos hasta el punto de que las diferencias debidas al antígeno Sxs quedasen enmascaradas.

Por tanto y en función de los resultados del presente trabajo, proponemos la utilización de células esplénicas purificadas como diana en pruebas de citotoxicidad donde se utilicen antisueros obtenidos mediante inmunización con este mismo tipo de células.

FUENTE DE COMPLEMENTO

Debido a las características peculiares del material objeto de este estudio (la presencia del antígeno Sxs en todos los machos de mamíferos y los bajos títulos mostrados por los sueros anti-Sxs), en nuestra opinión resulta imprescindible prestar una atención especial en la elección y preparación de la fuente de complemento.

En primer lugar, en ningún caso deberá utilizarse suero procedente de un macho como fuente de complemento, ya que en éste existe antígeno Sxs libre que coparía los anticuerpos anti-Sxs del antisuero. De hecho, la presencia de antígeno Sxs libre en suero de macho, ha sido puesta de manifiesto en todas las especies de mamíferos analizadas (Wachtel y col., 1980c; Müller, 1981; Páramo y Páramo, 1985; y el presente trabajo, entre otros). En segundo lugar, es necesario que el suero utilizado como fuente de complemento muestre los niveles de citotoxicidad inespecífica más bajos posibles, para no enmascarar los niveles de citotoxicidad específica del antisuero.

Así, hemos demostrado que la absorción de la fuente de complemento con células de hembra de la misma línea de la que procedan las células diana en ausencia de iones divalentes, con objeto de evitar la pérdida de complemento durante este proceso, disminuye sensiblemente su citotoxicidad inespecífica. Las células de macho no son adecuadas para este fin, ya que pueden liberar antígeno Sxs que, como ya hemos comentado, interferiría en los resultados de la prueba.

En relación con las condiciones en que han de usarse los sueros como fuente de complemento, nuestros resultados coinciden plenamente con los obtenidos por Boyse y col. (1970), con la particularidad de que en nuestro caso, las absorciones deben realizarse exclusivamente con células de hembra.

SUEROS ANTI-Sxs

Dadas las características del antígeno Sxs, la obtención de sueros anti-Sxs ha resultado siempre bastante problemática, debido a que se trata de un antígeno menor de histocompatibilidad. La inmunización con antígenos de estas características hace que sólo un 30% de los individuos produzcan sueros con títulos lo suficientemente altos como para ser utilizados en las pruebas de citotoxicidad (Koo, 1981). Además, el hecho de que estos sueros se obtienen tras una hiperinmunización de las hembras, acarrea la aparición de anticuerpos inespecíficos e incluso de autoanticuerpos (Wiberg, 1987), que introducirán un "ruido de fondo" en las pruebas de citotoxicidad y que posiblemente sean la causa de que lisen también un cierto porcentaje de células de hembra en las pruebas de citotoxicidad. Por otra parte, los determinantes antigénicos del Sxs son de naturaleza glucídica (Shapiro y Erickson, 1981; Shapiro y Goldberg, 1984) y se encuentran en baja densidad en la superficie de la célula, hechos que dificultan aún más la obtención de sueros anti-Sxs. Estos hechos son la causa del gran número de protocolos de inmunización diferentes que se han descrito en la bibliografía (ver Introducción), protocolos que, sin embargo, producían resultados difícilmente reproducibles en diferentes laboratorios. Este hecho probablemente fuese debido a que, aún reproduciendo exactamente las técnicas de inmunización, se introducían variaciones en diversos factores, que afectaban tanto a la propia obtención de los sueros, como a las pruebas utilizadas para medir sus títulos, tales como: 1) Tipo de células utilizadas para la inmunización, 2) línea consanguínea de la que se obtenían estas células, 3) tipo de células diana, 4) línea de la que procedían, 5) fuente de complemento, 6) modo de preparación del complemento, 7) técnica empleada para medir la citotoxicidad.

En el presente trabajo, tras haber utilizado diferentes protocolos de inmunización, hemos comprobado que el suero obtenido por repetidas inyecciones intraperitoneales con esplenocitos de macho, es el que proporciona los mayores niveles de citotoxicidad específica anti-Sxs. Estos resultados coinciden con los de la mayoría de autores, que también han utilizado este mismo protocolo de inmunización. Además, según Wachtel y col. (1974) este tipo de sueros tienen la ventaja de que presentan menor proporción de autoanticuerpos que los obtenidos mediante transplantes. No obstante, consideramos interesante reseñar que el título de un suero concreto no depende solamente de su concentración en anticuerpos, sino también del tipo de células diana que se usen en las pruebas de citotoxicidad. En nuestro caso, los mejores resultados se han obtenido utilizando también los esplenocitos como células diana, lo que puede ser debido a la influencia de los antígenos mayores de histocompatibilidad en el reconocimiento del antígeno Sxs, tal como ya se discutió anteriormente.

Por otra parte, es interesante comentar determinados aspectos sobre otros protocolos de inmunización que, si bien han proporcionado buenos resultados en otros laboratorios, en nuestro caso no han permitido obtener sueros con títulos aceptables. Así, Bradley y Heslop (1985) obtuvieron sueros anti-Sxs de títulos muy altos, mediante inmunización intraesplénica de hembras de las líneas de rata BN y HS, con trozos de piel de macho. Estos autores observaron la existencia de una amplia variabilidad interracial e incluso interindividual, que afectaba tanto a los títulos como al momento, dentro del proceso de inmunización, en el cual se obtenía el máximo nivel de anticuerpos. Este hecho obliga a una cuidadosa selección de las líneas consanguíneas a utilizar e incluso de aquellos individuos que demuestren poseer la capacidad de dar una rápida respuesta inmune frente a los transplantes

de piel. Por otra parte, existe un punto de máxima producción de anticuerpos de muy corta duración en el tiempo y cuyo momento de aparición es variable de unos individuos a otros, por lo que se hace obligado realizar un cuidadoso seguimiento de los títulos del suero del animal que está siendo inmunizado, con objeto de sacrificarlo en el momento adecuado. Todo esto hace que este método sea muy laborioso, poco reproducible y generalmente de escaso rendimiento y explica los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Resulta especialmente llamativo el hecho de que el tejido testicular, ya sea en forma de macerado o de extracto (sobrenadante), siendo uno de los más ricos en antígeno Sxs, es sin embargo uno de los que peor funciona como inmunógeno, dado el bajo título de los sueros que se obtienen inyectándolo a hembras singénicas. De hecho, nuestros resultados han demostrado el alto contenido en Sxs del macerado y sobrenadante de testículo, así como del líquido de epidídimo, tal como se deduce de su capacidad para retirar poder citotóxico de los sueros anti-Sxs (ver más adelante, "Fuentes de Sxs"). Müller y col. (1978a) demostraron que es el testículo el órgano productor de antígeno Sxs, mientras que numerosos autores (Müller y col., 1978b; Wachtel y Hall, 1979; Wachtel y col., 1980a y c; Brunner y col., 1984; Bradley y col., 1987a) han empleado el extracto de testículo y el líquido de epidídimo como fuente de antígeno Sxs en muy diversos experimentos. A pesar de su riqueza en Sxs, los antisueros obtenidos mediante inmunización con este tejido, han mostrado bajos niveles de citotoxicidad específica anti-Sxs. En este sentido, nuestros resultados coinciden plenamente con los obtenidos por Wiberg y Lattermann (1987), quienes sugirieron que esta falta de respuesta podría ser debida a un posible efecto inmunosupresor de determinadas células testiculares. Para ello se basaron en los resultados de Shearer y Hunterbach (1982), que habían demostrado que

la inyección de espermatozoides singénicos o alogénicos, provocaba una inmunodepresión en las hembras receptoras.

Finalmente y en relación con los niveles de citotoxicidad anti-Sxs que según Kraupen-Brown y Wachtel (1979) mostraban las hembras múltiparas de ratón, nuestros resultados son claramente contradictorios puesto que ninguna de las hembras analizadas en nuestro laboratorio, demostró haber desarrollado suero citotóxico tras repetidos partos múltiples. Además, conviene destacar aquí que, aparte de los autores antes citados, ninguna otra referencia bibliográfica ha aparecido posteriormente en relación a tal fenómeno. Aunque de difícil explicación, es posible que esta controversia sea debida a diferencias entre las líneas consanguíneas de rata utilizadas en los distintos casos.

FUENTES DE ANTIGENO Sxs

Numerosos autores han utilizado fluidos muy diversos como fuentes de antígeno Sxs. De éstos, los más importantes son:

- 1) sobrenadante de testículo (Wachtel y Hall, 1979; Müller y col., 1980b; Wachtel y col., 1980 a y c; Wachtel, 1981; Brunner y col., 1984; Wachtel y col., 1984; Bradley y col., 1987a; entre otros),
- 2) líquido de epidídimo (Müller y col., 1978 a, b y c), sobrenadante de ovario de gallina (Wachtel y col., 1980a; Wachtel y col., 1984),
- 3) suero de rata macho (Wachtel y col., 1980c; Müller y col.

1980b; Wachtel, 1981; Müller, 1981),

- 4) medio condicionado por células de Sertoli, tanto de cultivos primarios (Brunner y col., 1984; Zenzes y col., 1978a y b; Bradley y col., 1987) como de cultivos estabilizados (Brunner y col. 1984) y
- 5) medio de cultivo condicionado por células Daudi (Iwata y col., 1979; Nagai y col., 1979; Zenzes y col., 1980; Casanova-Bettane y col. 1981; Wachtel, 1981).

Sin embargo, aunque todos ellos han demostrado poseer antígeno Sxs por su capacidad para reducir la citotoxicidad de los antisueros, nunca se había llevado a cabo hasta ahora un estudio comparativo sobre la riqueza antigénica de cada uno de ellos.

Nuestros resultados han demostrado que el sobrenadante de testículo es el fluido que mayor riqueza en antígeno Sxs posee, dado que en comparación con el resto de líquidos probados (todos los mencionados anteriormente, excepto el medio condicionado por células Daudi), era el que en mayor medida reducía la citotoxicidad de los sueros anti-Sxs. Estos resultados están en consonancia con el hecho de que son las células de Sertoli las únicas productoras de antígeno Sxs, tal como ha sido demostrado en diversas ocasiones (Müller y col., 1978b; Zenzes y col., 1978a; Brunner y col., 1984) y que son éstas unas de las componentes mayoritarias del tejido testicular.

El hecho de que las células de Sertoli son las únicas productoras de Sxs, plantea una interesante cuestión: ¿cual es la procedencia del antígeno Sxs presente en el resto de las fuentes investigadas?

En relación con el líquido de epidídimo, Müller y col. (1978b)

demonstraron que su contenido en Sxs aumenta a medida que avanza la edad del animal. Es lógico pensar que parte del mismo provenga del fluido testicular que llega a través de la "rete testis", acompañando a los espermatozoides. Por otra parte, Hoppe y Koo (1984) demostraron que los espermatozoides van perdiendo su antígeno Sxs conforme van recorriendo el conducto epididimario, antígeno que inevitablemente deberá quedar en el líquido que lo rellena. Estos dos aportes de Sxs hacen que esta fuente sea la segunda en riqueza antigénica, después del sobrenadante de testículo.

Por lo que respecta al suero de macho (mamíferos), su contenido en Sxs tiene un origen que no está del todo claro. Según Müller y col. (1980b) este antígeno podría proceder bien de la liberación pasiva desde las membranas celulares o bien de un proceso de secreción activa que llevarían a cabo los testículos, en cuyo caso este antígeno adquiriría prácticamente un carácter hormonal (Müller y col., 1978a y b; Ohno y col., 1978). Tal y como se ha comentado anteriormente en relación con la absorción del suero fuente de complemento, el suero de macho a utilizar como fuente de antígeno Sxs debe ser absorbido exclusivamente por células de hembra, con objeto de evitar un posible aporte de Sxs al suero por parte de células de macho.

En relación con los niveles de Sxs en el medio de cultivo de células de Sertoli, hay que destacar que aunque son inferiores a los del sobrenadante de testículo, sin embargo es de esperar que su pureza en antígeno sea mucho mayor. De hecho, numerosos investigadores han preferido esta fuente de antígeno Sxs, procedente tanto de cultivos primarios (Zenzes y col. 1978b y c; Zenzes y col. 1980) como de líneas preestablecidas de células de Sertoli (Brunner y col. 1984) para la realización de sus experimentos. Así, Brunner y col. (1984) pusieron de manifiesto que se requiere mucha más cantidad de sobrenadante de

testículo que de medio condicionado por células de Sertoli o Daudi para poner de manifiesto la presencia de Sxs mediante ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal.

Por lo que respecta a las condiciones idóneas en las que debe utilizarse esta fuente de antígeno Sxs, es interesante puntualizar la conveniencia de no suplementar con suero bovino fetal el medio de cultivo. Las razones de esto son, por un lado, mantener la pureza del antígeno Sxs en el medio ya que la adición de éste suero, de composición indefinida, aportaría numerosos componentes cuyo efecto sería imprevisible. Entre estos componentes probablemente se encuentren hormonas femeninas, que podrían falsear cualquier efecto feminizante del experimento (recuérdese que los sueros comerciales son producto de la mezcla de sueros de individuos de ambos sexos). De hecho, Erickson (1974) demostró la feminización de testículos embrionarios de pollo cultivados en un medio que simplemente había sido suplementado con suero bovino fetal, responsabilizando de tal efecto a las hormonas femeninas que probablemente había en tal suero. Finalmente, el suero bovino fetal podría suponer también un aporte extra de Sxs, que falsearía los niveles reales de antígeno obtenidos en la fuente. Por esta última razón, los medios de cultivo usados en las pruebas de citotoxicidad, tampoco fueron suplementados con suero bovino fetal.

Por otra parte, independientemente del tipo de fuente de antígeno Sxs que se utilice, es importante comprobar que la citotoxicidad que estas fuentes retiran de los sueros anti-Sxs, es específica para las células de macho, y no se trata de una citotoxicidad inespecífica. El hecho de que los porcentajes de lisis observados en el control ♀/RPMI (figura 11) fueron claramente inferiores a los mostrados por el control positivo (células de macho expuestas a la acción del suero E en las

mismas condiciones; curva RPMI) demuestra la especificidad anti-Sxs del citado suero. Por lo tanto, podemos afirmar que la pérdida de capacidad citotóxica que sufre el suero anti-Sxs tras ser absorbido con las distintas fuentes de antígeno, es debida exclusivamente a su contenido en el mismo.

Otro aspecto interesante que, en nuestra opinión, merece ser discutido, está en relación con la conveniencia o no de utilizar antígeno Sxs procedente de un mamífero (rata), para llevar a cabo experimentos en los que la especie receptora es un ave (pollo). Por una parte, como ya se expuso en la "Introducción" de este trabajo, se ha demostrado un alto grado de conservadurismo evolutivo del antígeno Sxs (Wachtel y col., 1975a), de manera que sueros anti-Sxs obtenidos en mamíferos perdían su poder citotóxico tras ser absorbidos con células de muy distintos grupos zoológicos, entre los que se incluyen las aves. Este conservadurismo no sólo afecta al antígeno sino también su receptor específico, tal como quedó patente en los experimentos realizados por Wachtel en 1981. Las células Sxs negativas pertenecientes a individuos del sexo homogamético de diversas especies, se convertían en positivas tras ser puestas en contacto con una fuente de Sxs libre obtenido de un mamífero como la rata. Es de esperar por tanto que el antígeno Sxs de una especie pueda ejercer su función en otra distinta a través de su receptor, incluso en el caso de que ambas estén muy separadas filogenéticamente. De hecho, se han realizado diversos experimentos que han dado resultados positivos bajo esta premisa, tal como se discutirá más adelante (ver "efecto del antígeno Sxs en el desarrollo gonadal").

Sobre la base de lo que acabamos de exponer y teniendo en cuenta que en nuestros experimentos íbamos a utilizar embriones de pollo, resultó extraordinariamente ventajoso el hecho de poder emplear antígeno Sxs de rata, ya que esta especie ofrece varias ventajas

obtener mayores cantidades de Sxs en menos tiempo.

Finalmente, el antígeno Sxs de rata macho presenta otra interesante ventaja frente al obtenido en gallina. A pesar de la discordancia existente entre aves y mamíferos en cuanto el sexo que es heterogamético, no existe sin embargo discordancia alguna en relación con las hormonas características de cada sexo en ambos grupos filogenéticos, esto es, las hormonas sexuales masculinas son las mismas en los machos de rata que en los de pollo, ocurriendo lo mismo con respecto a las femeninas (Akram y Weniger, 1969). Por otra parte, se ha demostrado que las hormonas sexuales femeninas son capaces de inducir la feminización de los testículos embrionarios de pollo (ver Müller y col. 1979). Por tanto, cualquier efecto de feminización que se obtuviera en gónadas embrionarias de individuos ZZ de pollo, tras su tratamiento con una fuente de Sxs obtenida en gallina, podría ser atribuido a las hormonas sexuales femeninas presentes en la misma. Sin embargo, este problema no se presenta cuando la fuente de Sxs se obtiene de ratas macho, ya que éstas carecen obviamente de hormonas sexuales femeninas.

EFFECTO DEL ANTIGENO Sxs EN EL DESARROLLO GONADAL

Los casos de freemartinismo constituyen un ejemplo natural de que el aporte exógeno de sustancias de origen masculino puede dar lugar a una masculinización de la gónada femenina en mamíferos (Wachtel y col., 1980c), o de que el aporte de sustancias de origen femenino puede dar lugar a una feminización de la gónada masculina en aves (Lutz y Lutz-Ostertag, 1958). Aunque en un principio se

en aves (Lutz y Lutz-Ostertag, 1958). Aunque en un principio se responsabilizó de este efecto a las hormonas sexuales, la demostración de que tales hormonas son incapaces de inducir la masculinización de tejido ovárico de embriones de mamíferos, hizo recaer esta responsabilidad sobre el antígeno Sxs (Wachtel y col., 1980c).

Hasta el presente trabajo, los experimentos realizados para abordar el estudio del posible efecto de la administración artificial de antígeno Sxs sobre el desarrollo gonadal embrionario, se han basado principalmente en técnicas de disgregación y reasociación de células de gónadas embrionarias en presencia o ausencia de Sxs (Müller y col., 1978c; Zenzes y col., 1978b y c). Estos autores observaron que las células ováricas se reasociaban dando lugar a estructuras semejantes a túbulos seminíferos cuando en el medio se añadía antígeno Sxs y que las células testiculares formaban estructuras ováricas si se añadía un suero anti-Sxs. Sólo existen dos excepciones a la utilización de este tipo de técnicas. Por una parte, los trabajos de Weniger (1963) y de Akram y Weniger (1968) que demuestran que testículos embrionarios de pollo, cultivados conjuntamente con testículos embrionarios de ratón o de toro, sufrían un proceso de feminización atribuible al aporte de antígeno Sxs por parte de éstos últimos. Por otra parte, el de Nagai y col. (1979) en el que demostraron que el cultivo de gónadas embrionarias de vaca en medio condicionado por células Daudi, como aporte de antígeno Sxs, inducía una masculinización que se manifestaba con el desarrollo de túnica albugínea y túbulos seminíferos.

Lo expuesto anteriormente nos planteó la cuestión de si era posible inducir alteraciones en el desarrollo gonadal mediante el tratamiento *in vivo* de embriones con antígeno Sxs.

Con objeto de dilucidar este tema, se trataron embriones de pollo con diferentes fuentes de antígeno Sxs en dosis comprendidas entre

200 μ l y 1200 μ l que fueron administradas en el intervalo comprendido entre el 3º y 5º días de incubación. Este protocolo asegura por una parte, que el tratamiento es anterior a la diferenciación sexual del embrión, que se produce entre el 6º y 8º días con la aparición del antígeno Sxs (Wolf, 1978) y por otra, que el antígeno alcanza al embrión ya que en estos estadios del desarrollo aún no está cubierto por las membranas extraembrionarias. A pesar de ello, en ningún caso se ha observado falta de correspondencia entre el sexo genético y el sexo gonadal que presentaban los embriones. No obstante y dado que las diferencias a nivel anatómico entre un testículo normal y un ovoteste son mínimas (Müller y col., 1979), cabría aún la posibilidad de que se hubiesen producido alteraciones a nivel histológico, no detectables anatómicamente. El correspondiente estudio permitió comprobar que tampoco a este nivel se habían inducido alteraciones significativas.

Sin embargo, estos resultados no permiten afirmar que el antígeno Sxs no tiene papel alguno en la diferenciación sexual primaria. La falta de efectos apreciables en estos experimentos *in vivo* puede deberse a otras muchas causas. Por ejemplo, es posible que la concentración de Sxs necesaria para la producción del efecto deseado sea más alta que la empleada. Para solventar un problema similar, Nagai y col. (1979) concentraban mediante dialisis el medio condicionado por células Daudi. Sin embargo, dado que el antígeno Sxs es una molécula altamente hidrofóbica, tiende a formar agregados que finalmente dan lugar a grandes polímeros incapaces de interactuar con el receptor específico de la gónada.

Por otra parte, dado que el tratamiento administrado es puntual en el tiempo y que se trata de un experimento *in vivo*, el antígeno debió competir con los productos implicados en la diferenciación sexual producidos por el embrión, los cuales debieron tender a conseguir un

desarrollo normal y acorde con el genotipo. Dado que el Sxs se encuentra en baja concentración en las diferentes fuentes disponibles, hubiese sido necesario tratar los embriones con grandes volúmenes para alcanzar la concentración idónea del mismo, lo cual causaría serias alteraciones del desarrollo, con la consiguiente muerte del embrión.

Además, cabría también la posibilidad de que, debido de nuevo a la condición puntual del tratamiento, cualquier efecto que hipotéticamente hubiera podido producirse, se hubiese visto contrarrestado a lo largo del desarrollo del embrión, habiendo ya desaparecido en el momento en que se estudiaron los embriones (16 días de incubación). Sin embargo, el hecho de que entre los embriones analizados el noveno día de incubación, tampoco se observó alteración alguna del fenotipo sexual, parece descartar esta posibilidad.

A pesar de que en estos experimentos no se ha conseguido provocar ningún caso de alteración en la diferenciación sexual de los embriones tratados con distintas fuentes de antígeno Sxs, sí hemos podido observar no obstante una clara desviación, favorable a los machos, en la relación de sexos entre los embriones que sobrevivieron al tratamiento con medio condicionado por células de Sertoli. Sin embargo, esta desviación no existió ni entre los controles, ni entre los embriones tratados con cualquiera de las demás fuentes de Sxs. De este hecho podemos deducir por tanto que las células de Sertoli producen y secretan alguna sustancia capaz de provocar la muerte selectiva de las hembras.

Solamente se conocen dos sustancias relacionadas con el desarrollo sexual, que sean secretadas por las células de Sertoli de mamíferos; estas sustancias son el antígeno Sxs (Müller y col., 1978b; Zenzes y col., 1978a) y la hormona anti-Mülleriana (AMH) (Blanchard y Josso, 1974; Hayashi y col., 1984), responsable de la regresión de los

conductos de Müller en el desarrollo embrionario de los machos. La muerte selectiva de las hembras, difícilmente podría explicarse en base a un efecto del antígeno Sxs, dado que son precisamente éstas las que poseen dicho antígeno en aves. Sin embargo, la producción de AMH es exclusiva de los testículos de embriones masculinos, tanto de mamíferos como de aves, así como de testículos y ovarios de individuos adultos. En este último caso, es producida por las células de la granulosa, y su función en hembras adultas es aún desconocida. Resulta evidente pues, que dicha hormona solamente está ausente durante el desarrollo embrionario de las hembras, por lo que un aporte exógeno de la misma durante este período, podría causar su muerte, cosa que no ocurriría en los machos.

Según lo expuesto anteriormente, sería de esperar que también se hubiese observado desviación en la relación de sexos en los embriones tratados con sobrenadante de testículo, líquido de epidídimo y suero de rata macho, ya que estos fluidos probablemente contienen cierta cantidad de AMH. La falta de tal desviación, podría deberse a la existencia en estos líquidos de otras muchas sustancias desconocidas de origen masculino que, de alguna manera, podrían enmascarar el efecto antes mencionado.

A la vista de las dificultades que conlleva el estudio del efecto *in vivo* del antígeno Sxs en embriones, podemos concluir que tales experimentos quedan supeditados a la posibilidad de disponer del antígeno purificado y en condiciones tales que se evite la formación de polímeros. En nuestra opinión, sólo entonces será posible abordarlos con las suficientes garantías de éxito.

De acuerdo con estas consideraciones, la alternativa de estudio fué el tratamiento *in vitro* de gónadas embrionarias de pollo. Para ello, cultivamos gónadas de embriones de pollo de ambos sexos en medio

BME sin SBF (suero bovino fetal). En estas condiciones, tanto los ovarios como los testículos pueden seguir su desarrollo normal. En los testículos el cortex ovárico degenera y a partir de los cordones sexuales primarios se originan los túbulos seminíferos típicos. Por su parte, en los ovarios degeneran los cordones sexuales primarios, y el cortex se desarrolla produciendo los cordones sexuales secundarios por proliferación rápida de las oogonias.

Sin embargo, cuando cultivamos testículos en presencia de antígeno Sxs procedente de un medio condicionado por células de Sertoli o de sobrenadante de testículo, no sólo no se produjo la diferenciación de los túbulos seminíferos sino que desaparecieron los túbulos incipientes que presentaba la gónada en el momento de iniciar el tratamiento. Se observó además que se mantenía el cortex ovárico de la gónada izquierda. Estos resultados denotan una clara feminización de unas gónadas que, en condiciones normales se habrían convertido en testículos, de acuerdo con su sexo genético.

Weniger (1963) y Akram y Weniger (1968) obtuvieron un efecto similar cuando cultivaron conjuntamente testículos embrionarios de mamífero (ratón y toro) y de pollo, de forma que este último se feminizaba. Los autores concluyeron que el testículo de mamífero secretaba al medio una sustancia capaz de inducir la diferenciación ovárica de un primordio gonadal de constitución genética masculina. Numerosas investigaciones posteriores han confirmado y complementado estos resultados. Así, Zenzes y col. (1980) demostraron que al cultivar conjuntamente células disociadas de testículo embrionario de ratón y de pollo, éstas se reasociaban dando lugar a una estructura similar a un ovoteste. Estos autores obtuvieron resultados similares cultivando células disociadas de testículo embrionario de pollo en presencia de Sxs procedente de un medio condicionado por células Daudi.

También hemos cultivado gónadas de embriones hembra en medio condicionado por células de Sertoli, las cuales proseguían generalmente su desarrollo normal, formando los cordones sexuales secundarios en la gónada izquierda y degenerando la derecha. Sin embargo, no siempre ocurría así, ya que en un caso, además del ovario izquierdo, se desarrollaba también el ovario derecho apareciendo en éste un cortex ovárico típico. Esto indica que posiblemente el antígeno Sxs no solo no interfiere en el desarrollo ovárico normal de la gónada izquierda, sino que es capaz además de conducir en el mismo sentido a la derecha, ya que este efecto no apareció en ausencia de Sxs. Sin embargo, la sólo presencia del Sxs, aunque necesaria, no parece ser suficiente para inducir la feminización de la gónada derecha, puesto que este efecto sólo ocurrió en uno de los 14 casos estudiados. Sin embargo, este único caso presentó un escaso desarrollo de la gónada izquierda por haber quedado semioculta bajo el mesonefros. Una condición similar podría darse cuando a un embrión femenino de pollo se extirpa la gónada izquierda. En estas condiciones, la gónada derecha se desarrolla generalmente como un testículo, dando lugar a la masculinización del individuo (ver Romanoff, 1960). Tanto este hecho, como nuestros resultados referentes a la hiperfeminización antes mencionada podrían explicarse si la gónada izquierda ejerciera una inhibición activa sobre desarrollo de la derecha (inhibición que podría darse igualmente *in vitro* gracias a la proximidad de ambas gonadas). De esta forma, la ausencia, o el escaso desarrollo de ésta gónada izquierda permitiría el desarrollo de la derecha. *In vivo*, la eliminación del ovario supondría por una parte la desaparición de esta inhibición, y por otra, la desaparición del único órgano productor de Sxs. Por lo tanto, en estas condiciones la gónada derecha podría desarrollarse como testículo. *In vitro*, con un aporte externo de Sxs, la gónada derecha se desarrollaría como ovario.

Los resultados del presente trabajo, junto con el volumen de conocimientos que sobre el antígeno Sxs había acumulados hasta la fecha, demuestran claramente que éste debe desempeñar algún papel importante en el proceso de diferenciación sexual tanto de aves como de mamíferos. Sin embargo, y en contra de lo que se había pensado durante muchos años, éste antígeno no es el producto del gen sobre el que reside el determinismo del sexo (TDF en humanos, Tdy en ratones), conclusión a la que se llegó tras comprobar la existencia de diversos casos en que faltaba la necesaria correlación entre ambos genes (ver Introducción). Más recientemente, el gen determinante de testículo ha sido clonado y localizado en el brazo corto del cromosoma Y (gen SRY, Sinclair y col., 1990; Gubbay y col., 1990), mientras que el gen Sxs, también clonado, es autosómico y en humanos se localiza en el cromosoma 6 (Lau y col., 1986, 1987).

Actualmente se piensa que el gen Sxs debe formar parte de la cascada de activación génica que, comenzando en el SRY, da lugar a la diferenciación testicular del primordio gonadal de los mamíferos (Goodfellow y Darling, 1988; McLaren, 1988). Una cascada similar originaría la diferenciación ovárica en el caso de las aves.

Por ahora no existen datos concluyentes acerca del papel que juega el antígeno Sxs ni de su mecanismo de actuación, dentro del proceso de diferenciación gonadal. No obstante, nuestros resultados indican que este papel del antígeno Sxs podría ser más relevante en el desarrollo sexual primario de aves que de mamíferos. Existen varios argumentos que apoyan esta hipótesis. Por una parte, se ha demostrado que la administración artificial de hormonas femeninas puede producir reversión sexual en aves e induce una producción secundaria de antígeno Sxs (Müller y col., 1979), fenómeno que no ocurre en mamíferos. Dado que nuestros experimentos han demostrado que el

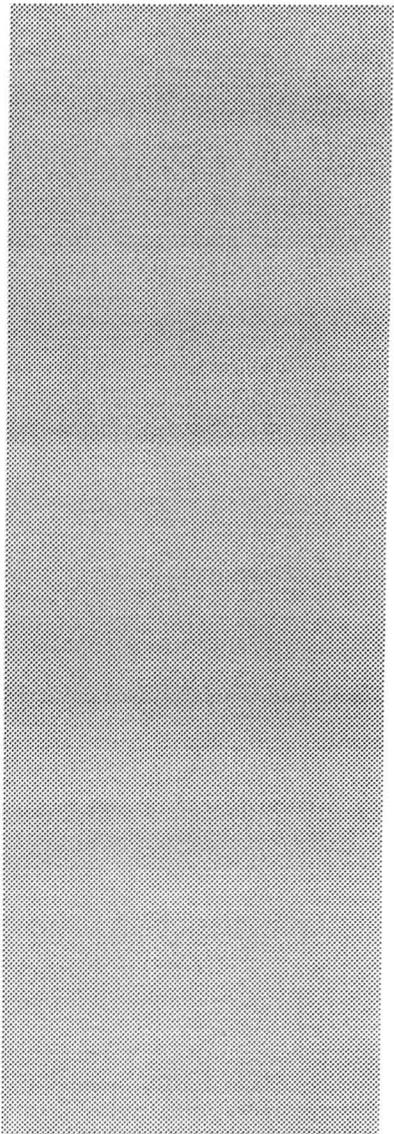
antígeno Sxs puede, por sí mismo y en ausencia de hormonas, inducir la feminización de testículos embrionarios, es posible que la feminización producida tras la administración de hormonas fuese inducida por el antígeno Sxs y no por la acción directa de dichas hormonas. Esta circunstancia haría que, en el caso de las aves, el control del Sxs no estuviera bajo la influencia de un gen determinante de ovario, "análogo" al SRY de mamíferos. De hecho, recientes investigaciones han demostrado que, excepto en mamíferos, las secuencias SRY no son específicas del sexo heterogamético (Tiersch y col., 1991), por lo que en aves, reptiles y anfibios el control de la diferenciación sexual primaria debe depender de otros factores, entre los que podría encontrarse el antígeno Sxs.

Mittwoch (1969, 1983, 1986, 1990) ha defendido durante bastantes años la idea de que el determinismo del sexo, está en función de la tasa de crecimiento del primordio gonadal, de forma que ésta siempre es más elevada en el sexo heterogamético, dando lugar a testículos en los mamíferos y a ovarios en las aves. De acuerdo con su hipótesis, Mittwoch considera que el antígeno Sxs, junto con el resto de productos génicos implicados en la diferenciación gonadal, contribuiría a incrementar dicha tasa de crecimiento en relación con la del sexo homogamético, en el que tales productos están ausentes.

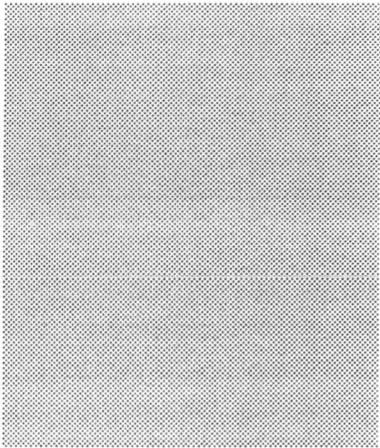
Wachtel (1981) postuló que el antígeno Sxs podría estar implicado en el reconocimiento entre células somáticas, necesario para la organogénesis gonadal. Además del antígeno, en dicho reconocimiento debería intervenir el receptor específico del mismo, siendo necesarios ambos para el establecimiento de las conexiones celulares.

No existe, sin embargo, evidencia experimental alguna que demuestre concluyentemente ninguna de estas dos hipótesis, por lo que persiste la necesidad de continuar la investigación sobre este y otros

aspectos del antígeno Sxs que aún quedan por dilucidar.

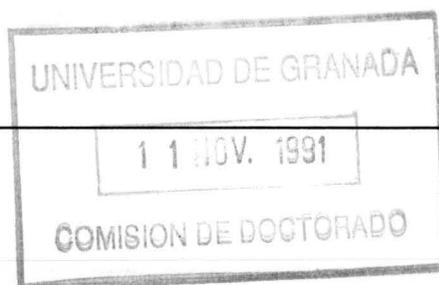


CONCLUSIONES

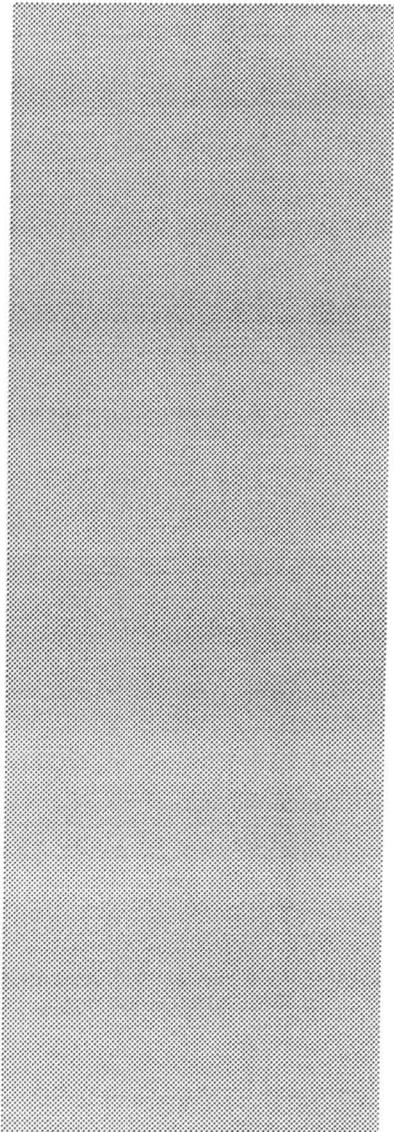


CONCLUSIONES

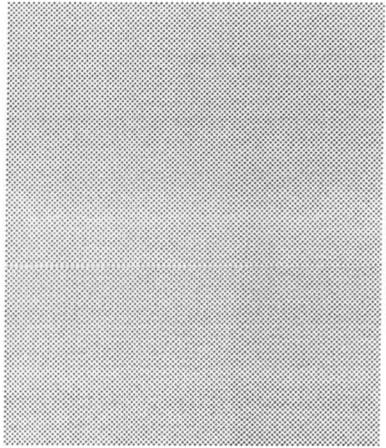
- 1ª Los esplenocitos han demostrado ser las células diana más apropiadas para la realización de las pruebas de citotoxicidad. Sin embargo, para su utilización es necesaria la obtención del suero anti-Sxs mediante inmunización con este mismo tipo de células. Proponemos que este hecho puede ser debido a que este antígeno presente en estas células una determinada asociación con antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad.
- 2ª Dadas las características del antígeno Sxs, el suero utilizado como fuente de complemento debe ser extraído exclusivamente de hembras y absorbido con células de hembra antes de ser usado en las pruebas de citotoxicidad.
- 3ª La línea de células de Sertoli establecida en el transcurso de este trabajo posee la capacidad de producir y liberar al medio antígeno Sxs biológicamente activo, parte del cual queda retenido en su membrana celular, convirtiéndolas en Sxs positivas.
- 4ª Siguiendo la metodología indicada en este trabajo, el sobrenadante de testículo es el fluido que presenta mayor concentración de antígeno Sxs, aunque se encuentra en mayor pureza en el medio condicionado por células de Sertoli. Por lo tanto, ésta última sería la fuente de antígeno de elección para llevar a cabo estudios sobre su efecto en el desarrollo gonadal embrionario.



- 5ª El tratamiento *in vivo* de embriones con medio condicionado por células de Sertoli como fuente de antígeno Sxs, si bien no produce alteraciones en el desarrollo sexual primario, sí causa una desviación significativa, favorable a los machos, de la relación de sexos entre los embriones que sobreviven al tratamiento. Puesto que es improbable que esta desviación sea debida a un efecto del antígeno Sxs, y dado que las células de Sertoli tienen la capacidad de producir y liberar hormona antimülleriana, podría ser ésta la causante de dicho fenómeno.
- 6ª El antígeno Sxs posee capacidad para producir la feminización de testículos embrionarios de pollo cuando es administrado *in vitro*, lo que se manifiesta mediante el desarrollo de un cortex ovárico y la regresión de los túbulos seminíferos de la médula.
- 7ª El ovario izquierdo de las aves probablemente ejerza una inhibición activa de la gónada derecha, ya que el desarrollo de ésta sólo se produce cuando el de aquella es insuficiente o nulo.
- 8ª El antígeno Sxs posee capacidad para dirigir en el sentido ovárico el desarrollo de la gónada derecha de las hembras de pollo, cuando falta la inhibición que sobre la misma ejercería la izquierda. En tales circunstancias y en ausencia de este antígeno, dicha gónada derecha se desarrollaría como testículo.



BIBLIOGRAFIA



BIBLIOGRAFIA

- Adinolfi, M., Polani, P. & Zenthon, J. (1982) Genetic control of H-Y antigen synthesis. A hypothesis. *Hum. Genet.* 61:1-2.
- Akram, H. & Weniger, J.P. (1968) Feminisation, en culture in vitro, du testicule embryonnaire de poulet par le testicule embryonnaire de veau. *Archives d'Anatomie microscopique* 57:369-378.
- Akram, H. & Weniger, J.P. (1969) Sécrétion d'oestrone et d'oestradiol par les gonades embrionnaires d'oiseaux. *General and comparative endocrinology* 12:568-573.
- Bacon, L.D. & Craig, J.V. (1966) Evidence for a histocompatibility locus on the W chromosome in chickens. *Poult. Sci.* 45:1066-1067.
- Bennett, D. & Boyse, E. (1973) Sex ratio in progeny of mice inseminated with sperm treated with H-Y antiserum. *Nature* 246:308-309.
- Bennet, D., Boyse, E.A., Lyon, M.F., Mathieson, B.J., Scheid, M. & Yanagisawa, K. (1975) Expression of H-Y (Male) antigen in phenotypically female *Tfm/Y* mice. *Nature* 257:236-238.
- Bergstresser, P.R., Fletcher, C.R. & Streilein, J.W. (1980) Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunological properties. *J. Invest. Dermatol.* 74:77-80.

- Bernstein, R., Jenkins, T., Dawson, B., Wagner, J. Dewald, G., Koo, G.C. & Wachtel, S.S. (1980) Female phenotype and multiple abnormalities in sibs with a Y chromosome and partial X chromosome duplication: H-Y antigen and Xg blood group findings. *J. Med. Genet.* 17:291-300.
- Billingham, R.E. & Silvers, W.K. (1960) Studies on tolerance of the Y chromosome antigen in mice. *J. Immunol.* 85:14-26.
- Blanchard, M.G. & Josso, N. (1974) Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediat. Res.* 8:968-971.
- Boyse, E.A., Old, L.J. & Stockert, E. (1968) An approach to the mapping of antigen on the cell surface. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 60:886-889.
- Boyse, E.A., Hubbard, L., Stockert, E. & Lamm, M.E. (1970) Improved complementation in the cytotoxic test. *Transplantation* 10:446-449.
- Bradley, M.P. & Heslop, B.F. (1984) An improved urease ELISA protocol for the screening of monoclonal H-Y antibodies. *Proc. Univ. Otago Med. Sch* 62:14-16.
- Bradley, M.P. & Heslop, B.F. (1985a) A biochemical and immunological approach to the identification of H-Y antigenic proteins secreted from Daudi cells. *Hum. Genet.* 71:117-121.

- Bradley, M.P. & Heslop, B.F. (1985b) Elicitation of a rapid and transient antibody response to Hh-Y antigen by intrasplenic immunization. *Transplantation* 39:634-638.
- Bradley, M. P. & Heslop, B.F. (1988) The distribution of sex-specific (H-Y) antigens within the seminiferous tubules of the testis: an immunohistochemical study. *Hum. Genet.* 79:347-351.
- Bradley, M.P., Ebensperger, C. & Wiberg, U.H. (1987a) Determination of the serological sex-specific (Sxs) antigen ("H-Y antigen") in birds and mammals using high-titer antisera and a sensitive urease ELISA. *Hum. Genet.* 76:352-356.
- Bradley, M.P., Forrester, I.T. & Heslop, B.F. (1987b) Identification of a male-specific (H-Y) antigen on the flagellar plasma membrane of rat epididymal spermatozoa. *Hum. Genet.* 75:362-367.
- Brunner, M., Moreira-Filho, C.A., Wachtel, G. & Wachtel, S. (1984) On the secretion of H-Y antigen. *Cell* 37:615-619.
- Bunker M.C. (1966) Y-chromosome loss in mice teratomas. *Can. J. Genet Cytol.* 8:312-315.
- Burgos, M., Jiménez, R. & Díaz de la Guardia, R. (1986) A rapid, simple and reliable combined method for G-Banding mammalian and human chromosomes. *Stain Technology* 61(5):257-260.
- Burgoyne, P.S., Levy, E.R. & McLaren, A. (1986) Spermatogenic failure in male mice lacking H-Y antigen. *Nature* 320:170-172.

- Casanova-Bettane, M. & Fellous, M. (1981) Antigène H-Y et dysgénésies sexuelles chez l'homme. *CR. Soc. Biol. (Paris)* 175:8-18.
- Casanova-Bettane, M., Latron, F., Jakob, H. & Fellous, M. (1981) A quantitative radioimmunoassay for membranous and soluble H-Y antigen typing. *Hum. Genet.* 58:21-24.
- Celada, F. & Welshons, W.J. (1963) An immunogenetic analysis of the male antigen in mice utilizing animals with an exceptional chromosome constitution. *Genetics* 48:139-156.
- Chai, (1968) The effect of inbreeding in rabbits. *Transplantation* 6:689-693.
- Eichwald, E.J. & Silmsler, C.R. (1955) Communication. *Transplant Bull.* 2:148-149.
- Engel, W.B., Pfafflin, F. & Wiedeking, C. (1980) H-Y antigen transsexuality, and how to explain testis differentiation in H-Y negative males and ovary differentiation in H-Y antigen positive females. *Hum. Genet.* 55:315-319.
- Engel, W.B., Klemme, B. & Ebrecht, A. (1981) Serological evidence for H-Y antigen in XO female mice. *Hum. Genet.* 57:68-70.
- Epstein, C.J., Smith, S. & Travis, B. (1980) Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Tissue Antigens.* 15:63-68.

- Erickson, G.F. (1974) Spontaneous sex reversal in organ culture of the embryonic male gonads of the bird. *J. Embryol. exp. Morph.* 31:611-620.
- Erickson, R.P. (1977) Androgen-modified expression compared with Y linkage of male specific antigen. *Nature* 265:59-61.
- De la Chapelle, A. (1981) The etiology of maleness in XX men. *Hum. Genet.* 58:105-116.
- De la Chapelle, A., Koo, G.C. & Wachtel, S.S. (1978) Recessive sex-determining genes in human XX male syndrome. *Cell* 15:837-842.
- Faggiano, M., Ferraro, M., Criscuolo, T., Sinisi, A.A. & Capoa, A. de (1980) Cytological evidence for the location of male-determining and H-Y genes on the short arm of Y chromosome. *Hum. Genet.* 54:323-326.
- Fellous, B.M., Günther, E., Kemler, R., Wiels, J., Berger, R., Guenet, J.L., Jacob, H. & Jacob, F. (1978) Association of the H-Y male antigen with β_2 -microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse teratocarcinoma cell lines. *J. Exp. Med.* 147:58-70.
- Fierz, W.A., Brenan, M., Müllbacher, A. & Simpson, E. (1982) Non-H-2 and H-2-linked immune response genes control the cytotoxic T-cell response to H-Y. *Immunogenetics* 15:261-270.

- Fredga, K., Gropp, A., Winking, H. & Frank, F. (1976) Fertile XX and XY-type females in the wood lemming *Myopus schisticolor*. *Nature* 261:225-227.
- Galbraith, G.M.P., Galbraith, R.M., Faulk, W.P. & Wachtel, S.S. (1978) Detection of H-Y antigen by fluorescence microscopy. *Transplantation* 26:25-27.
- Geib, R., Goldberg, E.H. & Klein, J. (1977) Membrane-bound H-2 and H-Y antigens move independently of each other. *Nature* 270:352-354.
- Gilmour, D.G. (1967) Histocompatibility antigen in the heterogametic sex in the chicken. *Transplantation* 5:699-706.
- Goldberg, E.H., Boyse, E.A., Bennett, D., Scheid, M. & Carswell, E.A. (1971) Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature* 232:478-480.
- Goldberg, E.H., Shen, F. & Tokuda, S. (1973) Detection of H-Y (male) antigen on mouse lymph node cells by the cell to cell cytotoxicity test. *Transplantation* 15:334-336.
- Goodfellow, P.J. (1983) Why study H-Y? *Nature* 304:380.
- Goodfellow, P.N. & Andrews, P.W. (1982) Sexual differentiation and H-Y antigen. *Nature* 295:11-13.
- Goodfellow, P.N. & Darling, S.M. (1988) Genetics of sex determination in man and mouse. *Development* 102:251-258.

- Gordon, R.D., Simpson, E. & Samelson, L.E. (1975) In vitro cell-mediated immune responses to the male specific (H-Y) antigen in mice. *J. Exp. Med.* 142:1108-1120.
- Goulmy, E., Bradley, B.A., Leeuwen, A. van, Lansberg, Q., Munro, A., Termigtelen, A., Rood, J.T. van (1977a) The immunogenicity in women of male cells bearing H-Y and HLA-A2. I. Serology. *Tissue Antigens* 10:248-251 .
- Goulmy, E., Termijtelen, A., Bradley, B.A. & Food, J.J. van (1977b) Y-antigen killing by T cells of woman is restricted by HLA. *Nature* 266:544-545.
- Goulmy, E., Leeuwen, A. van, Blokland, E., Sachs, E.S. & Geraedts, J.P.M. (1983) The recognition of abnormal sex chromosome constitution by HLA-restricted anti-H-Y cytotoxic T cells and antibody. *Immunogenetics* 17:523-531.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munstersberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.
- Hall, J.L. & Wachtel, S.S. (1980) Primary sex determination: genetics and biochemistry. *Molec. Cell Biochem.* 33:49-66.
- Hall, J.L., Bushkin, Y. & Wachtel, S.S. (1981) Immunoprecipitation of human H-Y antigen. *Hum. Genet.* 58:34-36.

- Harnasch, D. (1979) A rapid method for preimmunisation and grafting of mice with ear skin. *Transplantation* 28:402-404.
- Haughton, G., Daly, J.A. & Wikstrand, C.J. (1979) An investigation of allograft tolerance: discordant reactivity to murine H-Y incompatible lymphoid cell (PEC) and skin grafts. *Transplantation* 27:203-207.
- Hausman, B.S.J. & Palm, J. (1973) Serologic detection of a male-specific cell membrane antigen in the rat. *Transplantation* V:307-310.
- Hayashi, H., Shima, H., Hayashi, K., Trelstad, R.L. & Donahoe, P.K. (1984) Immunocytochemical localization of Müllerian inhibiting substance in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in Sertoli cells of the neonatal calf testis using a monoclonal antibody. *J. Histochem. Cytochem.* 32:649-654.
- Hoppe, P.C. & Koo, G. (1984) Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized *in vitro*. *Journal of Reproductive Immunology* 6:1-9.
- Iwata, H., Nagai, Y., Stapleton, D.D. Smith, R.C. & Ohno, S. (1979) Identification of human H-Y antigen and its testis-organizing function. *Arthritis and Rheumatism* 22:1211-1216.
- Jiménez, R., Burgos, M., Caballero, L. & Díaz de la Guardia, R. (1988) Sex reversal in a wild population of *Talpa occidentalis* (Insectivora, mammalia). *Gent. Res. Camb.* 52:135-140.

- Jost, A. (1947) Recherche sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. Arch. Anat. Microscop. Morphol. Exptl. 36:271-315.
- Jost, A. (1960) Hormonal influence in the sex development of bird and mammalian embryos. En "sex différenciation and development (C.R. Austin, editor), pp. 49-61. Cambridge Univer. Press London.
- Kallman, K.D. (1970) Sex determination on the restriction of sex-linked pigment patterns to the X and Y chromosomes in populations of a poeciliid fish *Xiphophorus maculatus*, from the Belize and Siburn Rivers of British Honduras. Zoologica 55:1-6.
- Klein, J. (1982) Immunology: The science of self-nonsel self discrimination. Wiley, New York, pp:349-478.
- Klein, E. & Linder, O. (1961) Factorial analysis of the reactivity of C57BL females against isologous male Skin grafts. Transplant Bull. 27:457-459.
- Koo, G. (1981) Serology of H-Y antigen. Hum. Genet. 58:18-20.
- Koo, G. & Varano, A. (1981) Inhibition of H-Y cell-mediated cytotoxicity by monoclonal H-Y-specific antibody. Immunogenetics 14:183-188.
- Koo, G., Stackpole, CW., Boyse, EA., Hammerling, U. & Lardis, M. (1973) Topographical location of H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronmicroscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:1502-1505.

- Koo, G., Wachtel, S.S., Krupen-Brown, K. Mittl, L.R., Breg, W.R., Genel, M., Rosenthal, I.M., Borgaonkar, D.S., Miller, D.A., Tantravahi, R., Schreck, R.R., Erlanger, B.F. & Miller, O.J. (1977) Mapping the locus of the H-Y gene of the human Y chromosome. *Science* 198:940-942.
- Koo, G., Mittl, L.R. & Goldberg, G.L. (1979) Expression of H-Y antigen during spermatogenesis. *Inmunogenetics* 9:293-296.
- Koo, G., Tada, N., Chaganti, R. & Hämmerling, U. (1981) Application of monoclonal anti H-Y antibody for human H-Y typing. *Hum. Genet.* 57:64-67.
- Koo, G., Reidy, J.A. & Nagamine, C.M. (1983) H-Y antigen in XO mice. *Inmunogenetics* 18:37-44.
- Koopman, P., Gubbay, J., Collignon, J. & Lovell-Badge, R. (1989) *Zfy* gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 342:940-942.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. & Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121.
- Kraupen-Brown, K.K. & Wachtel, S. (1979) Citotoxic and agglutinating H-Y antibodies in multiparous female mice. *Transplantation* 27:406-409.
- Krco, C.J. & Goldberg, E.H. (1976) Detection of H-Y (male) antigen on 8-cells mouse embryos. *Science* 193:1134-1135.

- Lau Y.F., Chan, K., Kan Y.W. & Goldberg, E. (1986) Isolation of a male-specific and conserved gene using an anti-H-Y antibody. *Am. J. Hum. Genet.*(suppl) 39:A142.
- Lau Y.F., Chan, K., Kan Y.W. & Goldberg, E. (1987) Male-enhanced expression and genetic conservation of a gene isolated with an anti-H-Y antibody. *Trans. Assoc. Am. Physicians C*:45-53.
- Lutz, H & Lutz-Ostertag, Y. (1958) Etude d'un free-martin chez les oiseaux. *Archives d'Anatomie Microscopique et de morphologie experimentale* 47:205-208.
- Mardon, G. & Page, D.C. (1989) The sex-determining region of the mouse Y chromosome encodes a protein with a highly acidic domain and 13 zinc fingers. *Cell* 56:765-770.
- Mather, J.P. & Sato, G. (1979) The growth of mouse melanoma cells in serum-free hormone supplemented medium. *Exp. Cell Res.* 120:191-193.
- Mayerová, A., Müller, U., Wiberg, U., Wolf, U. & Fraccaro, M. (1984) Variability in the amount of serologically detectable H-Y antigen. *Hum. Genet.* 66:110-112.
- McCarrey, J.R., Abplanalp, H. & Abbott, U.K. (1981) Studies on the H-W(H-Y) antigen in chickens. *The journal of heredity* 72:169-171.
- McLaren, A. (1988) Sex determination in mammals. *Trends in Genet.* 4(6):153-157.

- McLaren, A., Simpson, E., Tomonari, K., Chandler, P. & Hogg, H. (1984) Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312:552-555.
- McLaren, A., Simpson, E., Epplen, J.T., Studer, R., Koopman, P., Evans, E.P. & Burgoyne, P.S. (1988) Location of the genes controlling H-Y antigen expression and testis determination on the mouse Y chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6442-6445.
- Melvold, R.W., Kohn, H.I., Yerganian, G. & Fawcett, D.W. (1977) Evidence suggesting the existence of two H-Y antigens in the mouse. *Immunogenetics* 5:33-41.
- Michie, D. & McLaren, A. (1958). Genetics and immunology of sex-linked antigens. *Transplant. Bull.* 5:17.
- Mintz, B. & Silvers, W.K. (1983) Graft evidence for H-Y transplantation antigen similarity in different mouse strains. *Immunogenetics* 17:533-535.
- Mittwoch, U. (1969) Do genes determine sex? *Nature* 221:446-448.
- Mittwoch, U. (1983) Heterogametic sex chromosomes and the development of the dominant gonad in vertebrates. *Am. Nat.* 122:159-180.
- Mittwoch, U. (1986) Males, females and hermaphrodites. *Ann. Hum. Genet.* 50:103-121.

- Mittwoch, U. (1988) Y Chromosome and sex determination. *The Lancet* pp:52-53.
- Mittwoch, U. (1990) Sex, growth and chance. *Nature* 344:389-390.
- Moreira-Filho, C.A., Otto, P.G., Mustacchi, Z., Frota-Pessoa, O. & Otto, P.A. (1980) H-Y antigen expression in a case of XX true hermaphroditism. *Hum. Genet.* 55:309-314.
- Müller, U. (1981) Immunological and functional aspects of H-Y antigen. *Hum. Genet.* 58:29-33.
- Müller, U. & Bross, K. (1979) A highly sensitive peroxidase-antiperoxidase method for detection of H-Y antigen on cultivated human fibroblasts. *Hum. Genet.* 52:143-147.
- Müller, U. & Wolf, U. (1979) Cross-reactivity to mammalia anti-H-Y antiserum in Teleostean fish. *Differentiation* 14:185-187.
- Müller, U., Aschmoneit, I., Zenzes, M.T. & Wolf, U. (1978a) Binding studies of H-Y antigen in rat tissues. Indications for a gonad-specific receptor. *Hum. Genet.* 43:151-157.
- Müller, U., Siebers, J.W., Zenzes, M.T. & Wolf, U. (1978b) The testis as a secretory organ for H-Y antigen. *Hum. Genet.* 45:209-213.
- Müller, U., Zenzes, M.T., Bauknecht, T., Wolf, U., Siebers, J.W. & Engel, W. (1978c) Appearance of hCG-receptor after conversion of newborn ovarian cells into testicular structures by H-Y antigen in vitro. *Hum. Genet.* 45:203-207.

- Müller, U., Zenzes, M.T, Wolf, U., Engel, W. & Weniger, J.P. (1979) Appearance of H-W (H-Y) antigen in the gonads of oestradiol sex-reversed male chicken embryos. *Nature* 280:142-144.
- Müller, U., Guichard, A., Reyss-Brion, M. & Scheid, D. (1980a) Induction of H-Y antigen in the gonads of male quail embryos by diethylstilbestrol. *Differentiation* 16:129-133.
- Müller, U., Mayerová, A., Siebers, J.W. & Wolf, U. (1980b) Phenotypic conversion of human erythrocytes by H-Y antigen. *Hum Genet.* 56:177-181.
- Müller, U., Donlon, T.A., Kunkel, S.M., Lalande, M. & Latt, S.A. (1987) Y-190, a DNA probe for the sensitive detection of Y-derived marker chromosomes and mosaicism. *Hum. Genet.* 75:109-113.
- Nagai, Y., Ciccarese, S. & Ohno, S. (1979) The identification of human H-Y antigen and testicular transformation induced by its interaction with the receptor site of bovine fetal ovarian cells. *Differentiation* 13:155-164.
- Nagamine, C., Reidy, J. & Koo, G.C. (1984) A radiobinding assay for human H-Y antigen using monoclonal antibodies. *Transplantation* 37:13-17.
- Ohno, S. (1979) Major sex determining genes. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. New York.

- Ohno, S., Nagai, Y. & Ciccarese, S. (1978) Testicular cells lysostripped of H-Y antigen organize ovarian follicle-like aggregates. *Cytogenetics and Cell Genetics* 20:351-364.
- Ohno, S., Nagai, I., Ciccarese, S. & Iwata, H. (1979) Testis- Organizing H-Y antigen and the primary sex-determining mechanism of mammals. *Rec. Progr. Horm. Res.* 35:449-476.
- Ohno, S., Epplen, J.T. & Sutton, S. (1981) Testis-organizing H-Y antigen as a discrete protein, its MHC restricted immune recognition and the genomic environment in which H-Y gene operates. *Hum. Genet.* 58:37-45.
- Page, D.C. (1988) Is *ZFY* the sex-determining gene on the human Y chromosome? *Phil. Trans. R. Soc. Lon.* 322:155-157.
- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E.M., Fisher, E.M.C., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., Chapelle, A. de la & Brown, L.G. (1987) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104.
- Palmer, M.S., Sinclair, A.H., Ellis, N.A., Goodfellow, P.N., Abbas, N.E. & Fellous, M. (1989) Genetic evidence that *ZFY* is not the testis-determining factor. *Nature* 342:937-939.
- Palmer, M.S., Berta, P., Sinclair, A.H., Prym, B. & Goodfellow, P.N. (1990) Comparison of human *ZFY* and *ZFX* transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1681-1685.

- Páramo, P.G. & Páramo, P.S.Jr. (1985) Panorama etiopatogénico de la diferenciación gonadal. *Actas Urol. Esp.* 9:39-52.
- Pechan, P. & Tracey, M. (1980) H-Y evolutions. *Experientia* 36:356-358.
- Peter, K.M., Worst, P.K.M. & Fusening, N.E. (1973) Histocompatibility antigen on the surface of cultivated epidermal cells from mouse embryo skin. *Transplantation* 15(4):375-382.
- Polani, P.E. & Adinolfi, M. (1983) The H-Y antigen and its functions: a review and a hypothesis. *J. Immunogenetics* 10:85-102.
- Roberts, C., Weith, A., Passage, E., Michot, J.L., Mattei, M.G. & Bishop, C.E. (1988) Molecular and cytogenetic evidence for the location of *Tdy* and *Hya* on the mouse Y chromosome short arm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6446-6449.
- Romanoff, A.L. (1960) The avian embryo, structural and functional development. The Macmillan company. New York.
- Rosenfeld, R.G., Luzatti, L., Hintz, R.L., Miller, O.J., Koo, G.C. & Wachtel, S.S. (1979) Sexual and somatic determinants of the human Y chromosome: studies in a 46,XYp- phenotypic female. *Am. J. Hum. Genet.* 31:458-468.
- Schachner & Hämmerling, U. (1974) Surface antigens of brain cells. *Brain Res.* 73:362-371.

- Scheid, M., Boyse, E.A., Carswell, E.A. & Old, L.J. (1972) Serologically demonstrable alloantigens of mouse epidermal cells. *J. Exp. Med.* 135:938-955.
- Schneider-Gädicke, A., Beer-Romero, P., Brown, L.G., Nusbaum, R. & Page, D. (1989) ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247-1258.
- Schweizer, D., (1980) Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic regions (DA/DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenet Cell Genet.* 27:190-193.
- Schweizer, D., (1981) Counterstain-enhanced chromosome banding. *Hum. Genet.* 57:1-14.
- Shalev, A., Goldenberg, P.Z. & Huebner, E. (1980) Evidence for an H-Y crossreactive antigen in invertebrates. *Differentiation* 16:77-80.
- Selden, J.R., Moorhead, P.S., Koo, G.C., Wachtel, S.S., Haskins, M.E. & Patterson, D.F. (1984) Inherited XX sex reversal in the cocker spaniel dog. *Hum. Genet.* 67:62-69.
- Shapiro, M. & Erickson, R.P. (1981) Evidence that the serological determinant of H-Y antigen is carbohydrate. *Nature* 290:503-505.
- Shapiro, M. & Goldberg, E.H. (1984) Analysis of a serological determinant of H-Y antigen: evidence for carbohydrate specificity using an H-Y specific monoclonal antibody. *Journal of Immunogenetics* 11:209-218.

- Sharp, A.J., Wachtel, S.S. & Benirschke, K. (1980) H-Y antigen in a fertile XY female horse. *J. Reprod. Fert.* 58:157-160.
- Shearer, G.M. & Hunterbach, U. (1982) Is sperm immunosuppressive in male homosexual and basectomized men? *Immunol. Today* 3:153-154.
- Shelton, J.A. & Goldberg, E.H. (1984) Male-restricted expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. *Transplantation* 37:7-8.
- Siebers, J.W., Peters, F., Zenzes, M.T., Schmidtke, J., & Engel, W. (1977) Binding of human chorionic gonadotrophin to rat ovary during development. *J. Endocrinol.* 73:491-496.
- Silvers, W.K. & Yang, S.L. (1973) Male specific antigen: homology in mice and rats. *Science* 181:570-572.
- Silvers, W.K., Gasser, D.L. & Eicher, E.M. (1982) H-Y antigen, serologically detectable male antigen and sex determination. *Cell* 28:439-440.
- Simpson, E., McLaren, A. & Chandler, P. (1982) Evidence for two male antigens in mice. *Immunogenetics* 15:609-614.
- Simpson, E., Chandler, P., Hunt, R., Hogg, H., Tomonari, K. & McLaren, A. (1986) H-Y status of X/XSxr' male mice: in vivo tests. *Immunology* 57:345-349.

- Simpson, E., Chandler, P., Goulmy, E., Disteche, C.M., Ferguson Smith, M.A. & Page, D. (1987) Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on human Y chromosome. *Nature* 326:876-878.
- Sinclair, A.H., Foster, J.W., Spencer, J.A., Page, D.C., Palmer, M., Goodfellow, P.N. & Graves, J.A.M. (1988) Sequences homologous to *ZFY*, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336:780-783.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. & Goodfellow, P.N. (1990) A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Smith, R.N. & Powell, E.A. (1977) The adoptive transfer of pregnancy-induced unresponsiveness to male skin grafts with thymus-dependent cells. *J. Exp. Med.* 146:899-904.
- Steinmuller, D. & Burlingham, W. (1984) Expression of cell-defined H-Y antigen on mouse epidermal cells *Transplantation* 37:22-28.
- Sumner, A.T. (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Expl. Cell Res.* 75:304-306.
- Sutcliffe, M.J. & Burgoyne, P.S. (1989) Analysis of the testes of H-Y negative X0Sxr^b mice suggests that the spermatogenesis gene (*Spy*) acts during the differentiation of the A spermatogonia. *Development* 107:373-380.

- Tierschr, T.R., Mitchell, M.J. & Wachtel, S.S. (1991) Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum. Genet.* 87:571-573.
- Tokuda, S., Arrington, T., Goldberg, E.H. & Richey, J. (1977) Simpler technique for serological detection of H-Y antigen on mouse lymphocytes. *Nature* 267:433-434.
- Tung, P.S., Gore-Langton, R.E. & Fritz, I.B. (1982) An objective sperm cytotoxic assay for male-specific antisera based on ATP levels of unlysed cells: Application to assay of H-Y antigen. *Journal of Reproductive Immunology* 4:315-324.
- Wachtel, S.S. (1981) Conservatism of the H-Y/H-W receptor. *Hum. Genet.* 58:54-58.
- Wachtel, S.S. (1983) H-Y antigen and the biology of sex determination. Grune & Stratton, New York.
- Wachtel, S.S. & Hall, J.L. (1979) H-Y binding in the gonad:inhibition by a supernatant of the fetal ovary. *Cell* 17:327-329.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Zuckerman, E.E., Hammerling, U., Scheid, M. & Boyse, E.A. (1974) Serological crossreactivity between H-Y (male) antigens of mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1215-1218.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C. & Boyse, E.A. (1975a) Evolutionary conservation of H-Y ("male") antigen. *Nature* 254:270-272.

- Wachtel, S.S., Ohno, S., Koo, G.C. & Boyse, E.A. (1975b) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257:235-236.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Breg, W.R. Elias, S., Boyse, E.A. & Miller, O.J. (1975c) Expression of H-Y antigen in human males with two Y chromosomes. *N. Engl. J. Med.* 293:1070-1072.
- Wachtel, S.S., Ohno, S., Gropp, A., Dev, V.G., Tantravahi, R., Miller, D.A. & Miller, O. (1976a) H-Y antigen and the origin of XY female wood lemming (*Myopus schisticolor*). *Nature* 264:638-639.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Breg, W.R., Thaler, H.T., Dillard, G.M., Rosenthal, I.M., Dosik, H., Gerald, P.S., Saenger, P., New, M., Lieber, E. & Miller, O.J. (1976b) Serologic detection of a Y-linked gene in XX males and XX true hermaphrodites. *N. Engl. J. Med.* 295:750-754.
- Wachtel, S.S., Bresler, P.A. & Koide, S.S. (1980a) Does H-Y antigen induce the heterogametic ovary? *Cells* 20:859-864.
- Wachtel, S.S., Koo, G.C., Chapelle, A. de la., Kallio, H., Heyman, J.M. & Miller, O.J. (1980b) H-Y antigen in 46,XY gonadal dysgenesis. *Hum. Genet.* 54:25-30.
- Wachtel, S.S., Hall, J.L., Müller, U. & Chaganti, R.S.K. (1980c) Serum-borne H-Y antigen in the fetal bovine freemartin. *Cell* 21:917-926.

- Wachtel, G.M., Wachtel, S.S., Nakamura, D., Moreira-Filho, C.A., Brunner, M. & Koo, G.C. (1984) H-Y antibodies recognize the H-Y transplantation antigen. *Transplantation* 37:8-13.
- Waibel, F., Scherer, G., Fraccaro, M., Hustinx, T.W.J., Weissenbach, J., Wieland, J., Mayerová, A, Back, E. & Wolf, U. (1987) Absence of Y specific DNA sequences in human 46,XX true hermaphrodites and in 45,X mixed gonadal dysgenesis. *Hum. Genet.* 76:106-111.
- Weissman, I.L., Jerabek, L. & Greenspan, S. (1984) Tolerance and the H-Y antigen: requirement for male T cells, but not B cells, to induce tolerance in neonatal female mice. *Transplantation* 37:3-6.
- Weniger J. (1961) Féminisation, en culture in vitro, du testicule d'embryon de poulet par le testicule embryonnaire de souris. *C.R. Acad. Sc.* 253:2410-2411.
- Wiberg, U.H. (1985) H-Y transplantation antigen in human XO females. *Hum. Genet.* 69:15-18.
- Wiberg, U.H. (1987) Facts and considerations about sex-specific antigens. *Hum. Genet.* 76:207-219.
- Wiberg, U.H. & Fredga, K. (1985) The H-Y transplantation antigen is present in XO and X'X female wood lemmings (*Myopus schisticolor*). *Immunogenetics* 22:495-501.
- Wiberg, U.H. & Günther, E. (1985) Female wood lemmings with the mutant X'-chromosome carry the H-Y transplantation antigen. *Immunogenetics* 21:91-96.

- Wiberg, U.H. & Mayerová, A. (1985) Serologically H-Y antigen-negative X0 mice. *J. Immunogenet* 12:55-63.
- Wiberg, U.H. & Lattermann, U. (1987) Singeneic male graft rejection by B6 female mice primed with spleen and testes of Sxr and Sxr' mice. *Exp Clin Immunogenet.* 12:47-49.
- Wiberg, U.H., Mayerová, A., Müller, U., Fredga, K. & Wolf, U. (1982) X-linked genes of the H-Y antigen system in the wood lemming (*Myopus schisticolor*). *Hum. Genet.* 60:163-166.
- Wilson, J.D., Griffin, J.E., Leshin, M. & George, F.W. (1981) Role of gonadal hormones in development of the sexual phenotypes. *Hum. Genet.* 58:78-84.
- Winters, S.J., Wachtel, S.S., & White, B.J. (1979) H-Y antigen mosaicism in the gonad of a XX true hermaphrodite. *N. Engl. J. Med.* 300:745-749.
- Wolf, U. (1978) Zum mechanismus der gonadondifferierung. *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 34:357-368.
- Wolf, U. (1979) XY gonadal dysgenesis and the H-Y antigen. Report on 12 cases. *Hum. Genet.* 47:269-277.
- Wolf, U. (1980) Studies on H-Y antigen in disorders os sexual development. En: *Actualités Gynécologiques, Serie 11.* p.95. Masson. Paris.
- Wolf, U. (1981) Genetic Aspects of H-Y Antigen. *Hum. Genet.* 058:25-28.

- Wolf, U., Fraccaro, M., Mayerová, A., Hecht, T., Maraschio, P. & Hameister, H. (1980a) A gene controlling H-Y antigen on the X chromosome. Tentative assignment by deletion mapping to X_p 223. *Hum. Genet.* 54:149-154.
- Wolf, U., Fraccaro, M., Mayerová, A., Hecht, T., Zuffardi, O. & Hameister, H. (1980b) Turner syndrome patients are H-Y positive. *Hum. Genet.* 54:315-318.
- Worst, P.K.M. & Fusening, N.E. (1973) Histocompatibility antigens on the surface of cultivated epidermal cells from mouse embryo skin. *Transplantation* 15(4):375-383.
- Zaborski, P., Dorizzi, M. & Pieau, C. (1979) Sur l'utilisation de serum anti-H-Y de souris pour la détermination du sexe génétique chez *Emys orbiculatus* L (Testudines, Emydidae). *C.R. Acad. Sci. Paris, Series D288*:351-354.
- Zenzen, M.T., Müller, U., Aschmoneit, I. & Wolf, U. (1978a) Studies on H-Y antigen in different cell fractions of the testis during pubescence. *Hum. Genet.* 45:297-303.
- Zenzen, M.T., Wolf, U. & Engel, W. (1978b) Organization in vitro of ovarian cells into testicular structures. *Hum. Genet.* 44:333-338.
- Zenzen, M.T., Wolf, U., Günther, E. & Engel, W. (1978c) Studies on the function of H-Y antigen: dissociation and reorganization experiments on rat gonadal tissue. *Cytogenet. Cell. Genet.* 20:365-372.

- Zenzes, M.T., Urban, E. & Wolf, U. (1980) Mammalian cross-reactive H-Y antigen induces sex reversal in vitro in the avian testis. *Differentiation* 17:121-126.
- Zier, K.S., Elkins, W.L. & Pierson, G.R. (1982) Cytotoxic T lymphocyte lines (CTL) against a human minor alloantigen. *Immunogenetics* 15:501-508.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.D. (1974) Immunological surveillance against altered self components by sensitized T-lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251:547-549.