

T 10 130

T. Prov. 24/22

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 13/11/01
ENTRADA NUM. 4319

EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO

GONADAL DE

TALPA OCCIDENTALIS

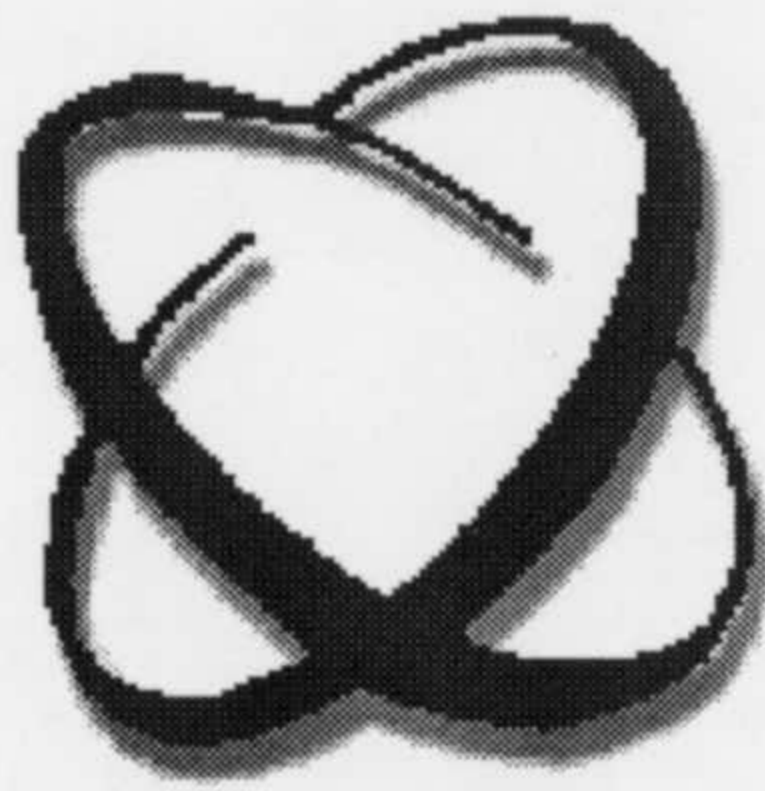


FRANCISCO JAVIER BARRIONUEVO JIMÉNEZ

DICIEMBRE 2001



Universidad
de Granada

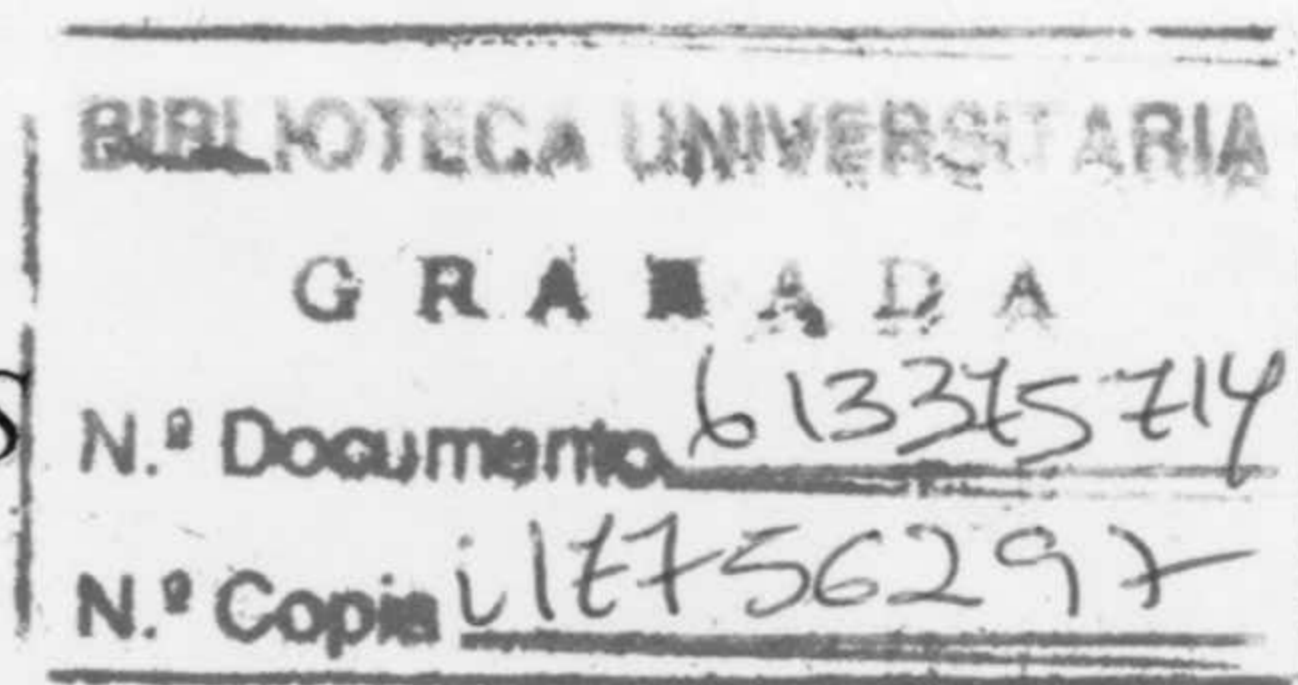


Facultad
de Ciencias



Departamento
de Genética

EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO GONADAL DE *TALPA OCCIDENTALIS*



Dirigida por los Dres:

Rafael Jiménez Medina

Miguel Burgos Poyatos

Memoria presentada por el licenciado
Francisco Javier Barrionuevo
Jiménez para optar al grado de
Doctor en Ciencias.

Diciembre 2001

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética, de la Facultad de ciencias de la Universidad de Granada, durante los años 1987-2001. La investigación realizada ha sido financiada por la DGES a través del proyecto PB96-1420.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en el II Congreso de la Sociedad Española de Genética, celebrado en La Coruña (1999) y en el III Congreso de la Sociedad Española de Genética, celebrado en Sevilla (2001). Otros han sido publicados en la revista electrónica "Technical Tips on line" de "Trends in Genetics" (Trends in Genetics on line. Technical Tips on line: <http://research.bmn.com/tto>. T02062)

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento:

A los Doctores Rafael Jiménez Medina y Miguel Burgos Poyatos sobre todo por su amistad y haberme permitido pasar esta 4 años junto a ellos. Además por su constante apoyo y por el alto valor científico de sus enseñanzas.

A mis padres por todo.

Ai resto de mi familia.

A los Doctores Rafael Diaz de la Guardia y Federico Zurita.

A Belén, Juande, David y Miguel.

A los miembros del Departamento de Genética.

A todos los amigos que te vas encontrando a lo largo de la vida, y a todos aquellos que a pesar del tiempo permanecen a tu lado, especialmente a Juan, Lucas, Aurelio M., Fran, Antonio, Jose, Jorge, Gorka, Carmen, Aurelio G., Ricardo, Santi, Carlitos, Mayte (s.m.v.), Luisa, Ais... y todos aquellos que aunque no estén nombrados si están en mis recuerdos.

A aquellos amigos que hacen que considere a Granada como mi segundo hogar, y veces hasta el primero: Antonia E, Esther, Duilio, Raúl, Visiedo, Julio, Pilar, Cristina, Marina, Visiedo, Rosa, Amanda, Antonia Ch, Luis, Mariguilla ...
A aquellos que sólo están en mis recuerdos.

A todos ellos, Gracias.

A mi madre.

Índice de contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
MECANISMOS DE DETERMINISMO DEL SEXO.....	1
Primeras teorías.....	1
Teorías actuales.....	2
DETERMINISMO DEL SEXO EN MAMÍFEROS.....	4
Asociación entre el cromosoma Y y fenotipo masculino.....	4
Bases celulares del desarrollo gonadal.....	5
Establecimiento de la gónada indiferenciada.....	5
Diferenciación testicular.....	6
Diferenciación ovárica.....	7
CONTROL GENÉTICO DE LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL SEXO.....	8
El factor determinante de testículo.....	8
DAX1.....	11
SOX9.....	15
SF1.....	17
WT1.....	20
WNT4.....	21
FGF9.....	22
AMH.....	24
DMRT1.....	25
Otros Genes.....	26
INTERACCIÓN ENTRE GENES IMPLICADOS EN LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL SEXO.....	28
EXPRESIÓN GÉNICA Y DIFERENCIACIÓN.....	33
REVERSIÓN SEXUAL EN MAMÍFEROS.....	37
Hembras XY.....	37
Machos XX.....	39
Hermafroditas verdaderos.....	40
El caso de Ellobius.....	40
Hermafroditismo verdadero en <i>Talpa occidentalis</i>	41
OBJETIVOS.....	44
MATERIAL Y METODOS.....	46
MATERIAL ANALIZADO.....	46
MÉTODOS.....	48
Obtención del material.....	48
Métodos de captura.....	48
Obtención de embriones y fetos de topo.....	49
Obtención de crías de topo.....	51
Métodos histológicos.....	53
Inclusión en parafina.....	53
Fijación.....	53
Deshidratación e inclusión.....	54
Corte de los bloques y montaje de los cortes.....	54
Tinción con Hematoxilina y Eosina.....	54
Inclusión en Resina.....	55
Determinación del sexo de los embriones.....	56
Métodos de análisis genético molecular.....	57

Clonación de fragmentos génicos.....	57
Extracción de ADN.....	57
Diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR.....	58
SRY.....	59
DAX1.....	59
SOX9.....	60
β -Actina.....	61
Amplificación por PCR.....	62
Purificación de productos de PCR.....	63
Clonación de productos de PCR.....	63
Preparación del vector.....	63
Ligado del ADN con el vector.....	64
Preparación de bacterias competentes.....	64
Transformación de bacterias competentes.....	65
Análisis de los transformantes positivos.....	65
Secuenciación del ADN.....	66
Estudios de expresión.....	66
Extracción de ARNm.....	66
RT-PCR.....	68
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS.....	69
(1) Paraformaldehído al 4%.....	69
(2) PBS.....	69
(3) Portas con TESPA (3-aminopropiltriétoxi-xilano).....	70
(4) Hemalumbre de Harris.....	70
(5) Colorante de Eosina.....	70
(6) Karnowsky.....	71
(7) Tampon de extracción.....	71
(8) Solución de proteinasa K.....	71
(9) Tampón de lisis.....	71
(10) Solución de ARNasa libre de ADNasa:	72
(11) Placas con medio mínimo M9.	72
(12) Medio LB (Medio Luria-Bertani).	73
(13) Medio LB sólido.....	73
RESULTADOS.....	75
DESARROLLO CORPORAL DE <i>T. occidentalis</i> . DEFINICIÓN DE ESTADIOS Y ESTABLECIMIENTO DE LOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN.....	75
FORMACIÓN DE LA CRESTA GENITAL Y DIFERENCIACIÓN GONADAL EN <i>T. occidentalis</i>	78
DESARROLLO TESTICULAR EN INDIVIDUOS XY DE <i>T. occidentalis</i>	79
DESARROLLO PRENATAL DE LOS OVOTESTES EN INDIVIDUOS XX DE <i>T. occidentalis</i>	82
DESARROLLO POSTNATAL DE LOS OVOTESTES EN INDIVIDUOS XX DE <i>T. occidentalis</i>	87
ULTRAESTRUCTURA DE LOS TIPOS CELULARES SERTOLI Y LEYDIG EN INDIVIDUOS XX y XY DE <i>T. occidentalis</i>	95
DESARROLLO DE LOS CONDUCTOS DE Wolff Y DE MÜLLER EN AMBOS SEXOS.....	96
CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN DAX1 DE <i>T. occidentalis</i>	97
CLONACIÓN DE DOS FRAGMENTOS DEL GEN SOX9 DE <i>T. occidentalis</i>	98
PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS TESTÍCULOS EN MACHOS DE <i>T. occidentalis</i>	99

SRY.....	100
DAX1.....	100
SOX9.....	100
PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS OVOTESTES EN HEMBRAS DE <i>T. occidentalis</i>	101
DAX1.....	101
SOX9.....	101
DISCUSIÓN.....	103
LAS GÓNADAS DE LAS HEMBRAS DE TOPO SON VERDADEROS OVOTESTES	103
PECULIARIDADES DEL DESARROLLO GONADAL EN TOPOS.....	109
Desarrollo de la porción ovárica del ovoteste.....	111
Desarrollo del tejido testicular del ovoteste.....	113
IMPLICACIONES GENÉTICAS Y MORFOGENÉTICAS EN RELACIÓN CON EL DESARROLLO GONADAL EN MAMÍFEROS.....	116
Establecimiento de dos regiones en la gónada XX de topo.....	117
Migración mesenquimática y desarrollo testicular.....	117
El papel de las células germinales.....	121
Diferenciación de las células de Sertoli y otras células testiculares.....	123
UNA HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DE LA REVERSIÓN SEXUAL EN <i>Talpa</i>	126
EVOLUCIÓN MOLECULAR DE SOX9 y DAX1 EN MAMÍFEROS.....	129
¿EXISTE UN PATRÓN GENERAL DE DESARROLLO GONADAL EN MAMÍFEROS? UNA PERSPECTIVA EVOLUTIVA.....	130
CONCLUSIONES.....	136
BIBLIOGRAFIA.....	139



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

MECANISMOS DE DETERMINISMO DEL SEXO

Primeras teorías

El origen y naturaleza de la diferencia entre sexos ha sido un tema que ha interesado a la especie humana desde la prehistoria. La mayoría de los órganos que componen un individuo tienen una única ruta de diferenciación, sin embargo, en el determinismo del sexo existen dos posibilidades de desarrollo: macho o hembra. Cada una de estas alternativas conducirá a la formación de individuos totalmente diferentes. Así, la elección de una u otra vía de desarrollo condicionará tanto la morfología como la función, e incluso el comportamiento del futuro individuo.

Una de las primeras teorías surgidas para explicar el hecho de que un individuo concreto decidiese su desarrollo hacia un sexo u otro fue elaborada por Aritóteles (335 a.c.), quien propuso que el sexo estaba determinado por el "calor" de la mujer durante las relaciones sexuales. Cuanto más acalorada fuese la pasión mayor sería la probabilidad de tener descendencia masculina. Incluso recomendaba concebir en verano si lo que se deseaba era un varón. Dentro de esta teoría se consideraba que la hembra era un individuo que había detenido su desarrollo antes de tiempo, lo que sucedería cuando el frío del seno materno contrarrestara el calor del semen paterno. Las mujeres eran consideradas más frías y pasivas que los hombres, y los órganos sexuales femeninos no habrían madurado lo suficiente como para producir semillas activas. Esta teoría permaneció vigente durante mucho tiempo. Incluso en el siglo XIX se consideraba a la mujer como mera productora de huevos que permitían la transmisión los caracteres paternos. Durante el desarrollo el ambiente tendría un papel relevante en la determinación del sexo, sobre todo el calor y la nutrición. Los factores que favoreciesen el almacenamiento de energía y nutrientes

INTRODUCCIÓN

predispondrían a tener descendencia femenina, mientras que aquellos que favoreciesen la utilización de esa energía y nutrientes predispondrían a tener descendencia masculina.

El redescubrimiento de los trabajos de Mendel y de los cromosomas sexuales, hicieron que se comenzaran a plantear teorías cromosómicas de determinismo del sexo. Así, en 1905, se estableció que, en insectos, los individuos XX tenían fenotipo femenino, mientras que los XY o XO serían machos (Stevens, 1905). Esto supuso que, por primera vez, se propusiera que algún factor nuclear era el responsable directo del determinismo del sexo, independientemente de las condiciones ambientales. Se creía que, también en mamíferos, el determinismo del sexo estaba controlado por factores genéticos. Inicialmente se pensaba que el sexo estaría determinado por la dosis de cromosomas X, de forma que dos cromosomas X implicarían un desarrollo femenino, mientras que uno sólo conduciría a un desarrollo masculino.

Aunque, en general, estas teorías estaban equivocadas, muchas de sus ideas han demostrado ser correctas. Como veremos más adelante, el calor, o más bien la temperatura, es el agente determinante del sexo en algunos reptiles. Asimismo, la teoría actual del determinismo del sexo en mamíferos supone un conflicto entre diferentes factores genéticos, que vienen determinados en el momento de la concepción. Si estos factores no están correctamente regulados, puede producirse una reversión del sexo que cabría esperar en función de la dotación genética del individuo.

Teorías actuales

A pesar de que el proceso de determinismo y diferenciación del sexo en el reino animal está muy extendido, éste no es un proceso muy conservado que, además, ha evolucionado muy rápidamente. De hecho, existen una gran variedad de mecanismos de determinismo del sexo entre los que se pueden hacer dos grandes grupos: los ambientales y los genéticos.

En los mecanismos ambientales de determinismo del sexo, una señal externa, posterior al momento de la fecundación, es la que condiciona el desarrollo del individuo

INTRODUCCIÓN

hacia uno u otro sexo. Estas señales pueden ser de muy diversos tipos, tales como la localización de los huevos (Leutert, 1974), la presencia o ausencia de ciertas bacterias (Rousset, 1992), la densidad de población, el pH (Shapiro, 1990), o la temperatura (Korpelainen, 1990; Crews 1996).

En los mecanismos genéticos de determinismo del sexo, éste viene determinado por la dotación cromosómica del individuo en el momento de la fecundación. Sin embargo, aunque este mecanismo está muy extendido, la forma exacta en que la dotación cromosómica determina el sexo del individuo solo está conservada en grupos taxonómicos relativamente cercanos. Así, la relación entre el número de cromosomas X y de complementos autosómicos es el mecanismo de determinación primaria del sexo en *Drosophila melanogaster*, y en *Caenorhabditis elegans* (ver revisión por Cline y Meyer, 1996). En la primera, si esta relación en el desarrollo temprano es igual a 1 se activa la transcripción del gen *Sxl* (de "Sex lethal gene") que actúa como gen maestro regulador que activa una cascada génica que regula la diferenciación de las células somáticas y los mecanismos de compensación de dosis de los cromosomas X, lo que da lugar al desarrollo del individuo como hembra. Si la relación entre los cromosomas X y los autosomas es 0.5 no se activa el gen *Sxl* y se produce el desarrollo masculino. En *C. elegans* no se conoce la naturaleza molecular de la señal procedente de la relación cromosomas X:autosomas. En otros casos, el sexo está determinado por la presencia o ausencia de un determinado cromosoma sexual. Así, en algunos reptiles y en las aves la presencia del cromosoma W determina el sexo femenino (ZW), mientras que su ausencia (ZZ) determina el masculino. En mamíferos el sexo homogamético XX da lugar a hembra, mientras que la presencia del cromosoma Y conduce al desarrollo masculino. Pero las diferencias en el determinismo del sexo no radican únicamente en la señal que dispara el proceso, sino también en la forma en que ésta señal se propaga. Así en *D. melanogaster* y en *C. elegans* se produce simultáneamente en todas las células (Hodking, 1992), mientras que en mamíferos se produce únicamente en las células somáticas de la gónada que, una vez elegida una ruta de diferenciación, producirá hormonas que unificarán el desarrollo del resto de las células del organismo.

INTRODUCCIÓN

Las diferencias en los mecanismos de determinación y diferenciación pueden incluso presentar grandes variaciones entre grupos taxonómicos emparentados. Un claro ejemplo es lo que ocurre en reptiles. Los cocodrilos y algunas especies de tortugas y lagartos, poseen un mecanismo de determinismo del sexo de tipo ambiental dependiente de la temperatura, aunque los rangos de temperatura que determinan un sexo en una especie, pueden determinar otro en otra especie. Sin embargo las serpientes tienen un mecanismo de determinación del sexo de tipo genético (ver revisión de Crews, 1996), e incluso se han encontrado especies como la tortuga *Emys Orbicularis* que básicamente tienen un control dependiente de señales externas, aunque también pueden tener cierto control genético (Girondont *y col.*, 1994).

DETERMINISMO DEL SEXO EN MAMÍFEROS

Asociación entre el cromosoma Y y fenotipo masculino

Hasta 1959 se creía que el determinismo del sexo en mamíferos estaba controlado por la dosis de cromosomas X. Pero ese año se publicaron dos trabajos en contra de esta teoría. La descripción de una mujer 45,XO (síndrome de Turner) (Ford *y col.*, 1959) puso de manifiesto que para el desarrollo femenino no era necesaria la presencia de dos cromosomas X. Por otro lado el descubrimiento de un macho 47,XXY (síndrome de Klinefelter) (Jacobs y Strong, 1959) demostró que incluso con la dosis doble de cromosomas X se podía producir el desarrollo masculino. Esto también fue un argumento a favor de que, en humanos, se producía un desarrollo masculino en presencia del cromosoma Y, mientras que en su ausencia se producía un desarrollo femenino. La prueba definitiva de esta suposición vino con el descubrimiento de hombres 48,XXXY y 49,XXXXY (Barr *y col.*, 1959; Fraccaro y Lindsten, 1960; y Fraccaro *y col.*, 1960) y de ratones hembra 45,XO y macho 47,XXY (Russell *y col.*, 1959; Welshons y Russell, 1959; Cattanach, 1961; Russell y Chu, 1961).

Bases celulares del desarrollo gonadal

Como mencionamos al principio de esta introducción, las gónadas son los únicos órganos de los mamíferos que pueden seguir dos vías de desarrollo alternativas. La gónada permanece en un estadio indiferenciado, conocido como "primordio gonadal", hasta que, en un momento concreto del desarrollo embionario, se toma la decisión de seguir una u otra vía. La forma en que se toma esta decisión ha inspirado siempre sumo interés científico.

La secuencia de acontecimientos que conducen este desarrollo es similar en todos los mamíferos, aunque cada especie pueda presentar sus propias peculiaridades. En lo que sigue, tomaremos al ratón como especie modelo, por ser una de las más estudiadas.

Establecimiento de la gónada indiferenciada

El primordio gonadal aparece como un engrosamiento en la superficie ventral del mesonefros, un órgano voluminoso que ocupa gran parte del volumen abdominal y que realiza funciones renales en el embrión. Dicho engrosamiento recibe el nombre de "cresta genital" (ver Larios y Taketo, 1991) y está formado por diferentes tipos de células somáticas: mesoteliales (epitelio celómico), mesenquimáticas (laxamente distribuidas) y endoteliales (vasos sanguíneos), todas ellas procedentes del mesonefros. Este tejido es invadido por células germinales primordiales, procedentes del mesodermo extraembrionario que, a través del alantoides, migran al saco vitelino adyacente, desde donde se dirigirán a las crestas genitales a través del recién formado primordio intestinal y el mesenterio dorsal. Así, todos estos tipos celulares forman un conjunto de células fuertemente empaquetadas y unidas a la superficie del epitelio mesonéfrico. Con la llegada de las células germinales primordiales se produce una gran proliferación de todas las células somáticas, en especial de las mesoteliales y mesenquimáticas, de manera que forman un agregado compacto conocido como "blastema gonadal". A partir de este agrupamiento celular se originarán dos tejidos gonadales diferenciados: los *cordones sexuales* y el *estroma*. Los cordones sexuales se forman mediante la agrupación de células

INTRODUCCIÓN

epiteliales que se rodean de una lamina basal, y en cuyo interior se encuentran las células germinales. En el estroma se encuentran células de tipo mesenquimático, así como vasos sanguíneos que irrigan la gónada indiferenciada. También se pueden observar algunos túbulos procedentes del mesonefros vecino que penetran en este primordio gonadal.

Hasta este punto, el desarrollo gonadal ocurre de la misma forma tanto en machos como hembras, y es a partir de este momento cuando se produce la diferenciación del sexo gonadal, lo que ocurre a los 11.5 días *post-coitum* (dpc) en ratón y a los 41 días post-ovulación (dpo) en humanos.

Diferenciación testicular

El primer evento de la diferenciación testicular en el ratón consiste en una invasión gradual del primordio gonadal por células mesenquimáticas y endoteliales procedentes del mesonefros (Buehr *y col.*, 1993, Merchant-Larios *y col.*, 1993). Esto hace que los cordones sexuales se separen del epitelio celómico y se hagan más patentes, al principio en la región medular, y más tarde en la cortical (Merchant-Larios, 1991). Poco después, las células gonadales de tipo epitelial comienzan la diferenciación hacia células de Sertoli (Merchant-Larios, 1976).

El siguiente evento, que comienza a los 14 dpc, consiste en la diferenciación de las células del estroma, dando como resultado varios tipos celulares: (1) células mioides, que rodean a los cordones sexuales, ahora denominados "cordones testiculares", (2) células endoteliales, (3) fibroblastos (tejido conectivo) y (4) células de Leydig, que tienen función endocrina y son responsables de la producción de hormonas esteroideas masculinas (testosterona y dihidrotestosterona).

Las células de Sertoli producen hormona antimulleriana (AMH) que inhibe la formación de los conductos de Müller, precursores de los órganos sexuales femeninos tales como los oviductos, el útero y la vagina superior (Tran y Josso, 1982). Por su parte, la testosterona secretada por las células de Leydig induce la masculinización de los conductos

INTRODUCCIÓN

de Wolff, de los que se derivan los epidídimos, las vesículas seminales y los conductos deferentes.

Diferenciación ovárica

Los cambios que dan lugar a la diferenciación de ovarios a partir del primordio gonadal indiferenciado de los embriones hembra, se inician más tarde, en el desarrollo, que los propios de la diferenciación testicular en embriones macho. Así, hasta los 14 dpc de desarrollo en el embrión de ratón hembra, no se aprecian cambios morfológicos en el primordio gonadal, excepto el ligero crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y germinales (Merchant-Larios, 1975). El primer evento de la diferenciación ovárica es el inicio de la meiosis por parte de las células germinales, que tiene lugar a los 14 dpc. Entre los 15 y los 18 dpc comienza la foliculogénesis, proceso que se divide en tres etapas (Merchant y Chimal, 1989): (1) Los oocitos están agrupados, haciendo contacto entre sí, dentro de los cordones sexuales, (2) las células epiteliales separan paulatinamente a los oocitos, dentro de los cordones, y (3) los oocitos rodeados de células epiteliales son separados unos de otros por células del estroma. En cada folículo, las células de tipo epitelial se diferenciarán en las células de la granulosa, que permanecen en íntimo contacto con el oocito, y las del estroma dan lugar a las células de las tecas, que lo separan del intersticio ovárico. En el ratón, el proceso termina varios días después del nacimiento.

Al no haber células de Sertoli, en el embrión femenino no se produce AMH, lo que permite el desarrollo de los conductos de Müller, que darán lugar a los oviductos, el útero y la vagina superior. Del mismo modo, al no haber células de Leydig, no se produce testosterona, por lo que se evita el desarrollo de los conductos de Wolff y la consiguiente masculinización del embrión.

CONTROL GENÉTICO DE LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL SEXO

El factor determinante de testículo

Una vez demostrado que la presencia del cromosoma Y estaba asociada al desarrollo del fenotipo masculino, y que el primer evento en dicho desarrollo era la diferenciación del primordio gonadal indiferenciado en testículo, se procedió a buscar, dentro del cromosoma Y, la región donde residía la actividad que desencadenaba el desarrollo testicular. A esa región, como si se tratase de un único gen, se la denominó TDF (Testis Determining Factor) en humanos y Tdy (testis determining Y gene) en ratón. Así se comenzó a buscar genes candidatos cuya expresión coincidiese con el momento de la diferenciación testicular de la gónada y cuya alteración diese lugar a reversión sexual. Uno de los primeros candidatos fue el antígeno H-Y (Histocompatibility-Y antigen) (Wachtel y col., 1975; Ohno, 1977). Se descubrió al investigar las causas del rechazo de trasplantes de piel de macho a hembras en cepas consanguíneas de ratón (Eichwald y Silmsler, 1955). Se investigó la presencia de este antígeno en otras especies mediante la utilización de técnicas de citotoxicidad mediada por anticuerpos obtenidos a partir de hembras isogénicas inmunizadas con células de machos de la misma cepa consanguínea (Goldberg y col., 1971) o mediada por células T citotóxicas (Goldberg y col., 1973). Los resultados demostraron la presencia de este antígeno específico del sexo masculino de forma generalizada en mamíferos. Teniendo en cuenta que la única diferencia genética entre sexos en mamíferos isogénicos es la presencia del cromosoma Y, se pensó que el gen responsable de la expresión de dicho antígeno se encontraba en este cromosoma. Este hecho, junto con su elevada conservación evolutiva lo hicieron un buen candidato a TDF. Sin embargo, esta suposición quedó descartada cuando se demostró que se encontraba fuera de la porción del cromosoma Y donde debía estar localizado TDF (Page y col., 1987a). Otros candidatos a TDF sustituyeron al antígeno H-Y, entre los que cabe destacar a las secuencias *Bkm* (Banded Krait minor satellite DNA) (Chandra, 1984, 1985), pero

INTRODUCCIÓN

ninguno de ellos cumplía con todos los requisitos necesarios para que se les pudiese considerar como TDF.

La elaboración de mapas de delección, con los que se pretendía localizar el fragmento más pequeño del cromosoma Y, que al encontrarse en individuos XX o al faltar en individuos XY, producía reversión sexual indicaron que TDF debía encontrarse en una zona próxima al límite con la región pseudoautosómica (Guellaen *y col.*, 1984; Majumdar *y col.*, 1996; Palmer *y col.*, 1989). Esta zona quedó acotada a una región de unas 140 Kb, que se encontraba a una distancia de 140 Kb del límite con la región pseudoautosómica, al descubrirse un macho XX que tenía un fragmento de unos 280 Kb de la región específica del Y y de una hembra XY con una delección en el cromosoma Y, que se solapaba unas 140 Kb con el fragmento del macho XX (Page *y col.*, 1987a). El primer gen que se descubrió tras delimitar esa región fue *ZFY* (de "Zinc Finger Y gene") (Page *y col.*, 1987b). Posee un dominio de unión al ADN con 13 dedos de Zinc y otro dominio que puede actuar como activador transcripcional. En el cromosoma X, se descubrió otro gen cuya secuencia presentaba una alta homología con *ZFY*, y se denominó *ZFX*. (Schneider-Gädicke *y col.*, 1989). La similitud de las secuencias de ambos genes fomentó la idea de que podrían tener una misma diana en el ADN y presentar actuaciones antagónicas en el determinismo del sexo. No obstante, aparecieron un gran número de pacientes XX con fenotipo masculino que carecían de la región donde se encontraba *ZFY*. Entre un total de 14 de estos pacientes, 4 de ellos tenían un fragmento de menos de 60 Kb de una región específica del cromosoma Y adyacente a la región pseudoautosómica, fragmento en el que no se encontraba el gen *ZFY* (Palmer *y col.*, 1989). Por lo tanto, *ZFY* no era TDF. Esta nueva ubicación, sin embargo, no se correspondía con la que se había deducido anteriormente de los mapas de delección. La causa de esta discrepancia radicaba en que una hembra XY, con una translocación Y:22, utilizada en la construcción de los mapas de delección, tenía una segunda delección, no detectada en primera instancia, que afectaba precisamente a la zona donde se localizaba el gen (Page *y col.*, 1987a). La búsqueda dentro de este fragmento condujo, en 1990, a la localización del gen *SRY* (Sinclair *y col.*, 1990; Gubbay *y col.*, 1990). Varias pruebas confirmaron a este gen como el tan buscado TDF: (a) el análisis de hembras XY reveló que estos individuos tenían un *SRY* mutado (Berta *y col.*, 1990; Jäger *y col.*, 1990;

INTRODUCCIÓN

Harley *y col.*, 1992; Hawkins *y col.*, 1992); (b) se construyeron ratones transgénicos para un fragmento de 14 Kb que incluía al *Sry*, obteniéndose un ratón XX de fenotipo masculino (Koopman *y col.*, 1991); y (c) estudios de expresión en ratón revelaron que *Sry* de ratón se expresa en la cresta genital justo en el momento de la diferenciación testicular de la especie.

Los genes *SRY* tienen una región muy conservada que codifica un dominio de 79 aminoácidos, denominado "caja HMG" (Sinclair *y col.*, 1990), que tiene una gran homología con el de proteínas no histónicas, del grupo de alta movilidad, asociadas al ADN (Jantzen *y col.*, 1990). El resto del gen no guarda ninguna homología entre las diferentes especies, incluso aunque estas estén muy relacionadas (Tucker y Lundrigan, 1993; Whitfielg *y col.*, 1993).

El hecho de tener un dominio de unión al ADN apoya que *SRY* sea un factor de transcripción. El dominio HMG de las proteínas *SRY* se une a la siguiente secuencia consenso (A/T)AACAA(T/A) (Pollock y Treisman, 1990; Harley *y col.*, 1994). Se ha comprobado que ésta unión induce una curvatura de 60-80° en el ADN (Ferrari *y col.*, 1992; Giese *y col.*, 1994). Estas propiedades varían entre especies. Así, la proteína de ratón es más específica en su unión al ADN que la de humano; la de ratón interacciona principalmente con el surco mayor mientras que la de humano lo hace con el menor; y el grado de curvatura inducida por la unión de la proteína *SRY* es diferente, siendo de 85° en ratón y 60° en humano.

La expresión de *Sry* en ratón se produce en células somáticas (pre-Sertoli) de la cresta genital, a los 10.5 días *post coito* (dpc) alcanza un pico de expresión alrededor de los 11.5 dpc. y se mantiene hasta que aparecen los primeros signos morfológicos de diferenciación testicular, sobre los 12.5 dpc (koopman *y col.*, 1990). Este patrón de expresión es coherente con el de un gen regulador maestro que activa una cascada de genes implicados en la diferenciación testicular.

Además de esta estrecha ventana de expresión, también se ha encontrado un nivel bajo de expresión en embriones en estadio de preimplantación (Zwingman *y col.*, 1993) y

INTRODUCCIÓN

transcritos circulares, que no son traducidos, en células germinales de testículo adulto (Zwingman *y col.*, 1995).

Inicialmente se pensó que en el resto de los mamíferos se repetiría este patrón, pero la expresión espacio-temporal de *SRY* en otras especies se desvía bastante de la de ratón.

En humanos, marsupiales y ovejas, este patrón no es tan severo. El primordio gonadal de humanos es visible por primera vez a los 33 días después de la ovulación (dpo). A los 41 dpo comienza la expresión de *SRY*, alcanzando un pico a los 44 dpo, cuando se observa por primera vez la formación de cordones testiculares. Después de esto, en lugar de silenciarse, como en ratón, la expresión continúa en niveles más bajos a lo largo de todo el periodo fetal y en el neonato (Hanley *y col.*, 2000).

Los transcritos de *SRY* no sólo se han encontrado en la gónada, sino también en una gran variedad de tejidos fetales y de adulto, aunque no existen pruebas de que este gen esté implicado en ninguna función de estos órganos, ya que individuos XY con mutaciones en el dominio de unión al ADN poseen un fenotipo femenino normal, lo que sugiere que la acción de este gen se limita a la diferenciación testicular (Clépet *y col.*, 1993).

En oveja y en el Gran canguro australiano la expresión en la gónada se produce en una amplia ventana que comienza varios días antes y termina varios días después de que se produzca la diferenciación testicular (Harry *y col.*, 1995., Payen *y col.*, 1996) y se han encontrado transcritos de *SRY* en todos los tejidos fetales y de jóvenes que permanecen en la bolsa marsupial, a excepción del hígado. En machos adultos de esta especie se encontró expresión en testículos, epidídimos y cerebro, y en menor nivel en riñón y corazón (Harry *y col.*, 1995).

DAX1

Tras el descubrimiento de *SRY* comenzaron a buscarse genes que pudieran estar implicados en control de la diferenciación sexual. Mutaciones en algunos de estos genes

INTRODUCCIÓN

pueden dar lugar a una reversión sexual, y no ocasionar letalidad como en el caso de genes implicados en otros procesos, lo que facilita su estudio. Así, la investigación de casos de reversión sexual dio pronto lugar al descubrimiento de varios genes que intervienen en la cascada de diferenciación sexual.

En 1978, German *y col.*, identificaron pacientes XY con disgenesia gonadal asociada a una herencia ligada al sexo. Desde entonces se han descrito numerosos casos con la misma patología (ver revisión por Fechner *y col.*, 1993). Se descubrió que estos individuos tenían duplicada una región del brazo corto del cromosoma X y un gen *SRY* intacto (Stern *y col.*, 1990). Entre estos pacientes había algunos con genitalia externa femenina o ambigua, mientras que en otros casos se encontraron testículos disgenésicos. Los individuos 47, XXY, que solo tienen un cromosoma X activo presentan sexo masculino, mientras que algunos de estos pacientes con un solo cromosoma X con el fragmento duplicado, tenían fenotipo femenino. Por lo tanto esta reversión del sexo era debida a una doble dosis de algunos genes que se encontraban en la región duplicada de ese único cromosoma X. Otra hipótesis para explicar esta reversión podía basarse en que todas estas duplicaciones tuviesen un punto de rotura común en el cromosoma X y produjeran la inactivación de algún gen implicado en la determinación del sexo. Para distinguir entre ambas hipótesis se analizaron 31 pacientes con reversión sexual XY (Bardoni *y col.*, 1994). Se comprobó que los puntos de rotura, tanto distales como proximales divergían bastante entre individuos, por lo que se descartó la hipótesis de que el punto de rotura produjese la inactivación de algún gen implicado en la determinación del sexo, cobrando pues fuerza la hipótesis de la existencia de algún gen que produjese la reversión sexual en doble dosis. A este locus se le denominó DSS (Dosage Sensitive Sex reversal), y se acotó en un fragmento de 160 Kb localizado en Xp21. Individuos XY que tenían este locus delecionado tenían un fenotipo masculino, pero presentaban hipoplasia adrenal congénita (ACH), una patología asociada a un desarrollo anormal de la glándula adrenal, e hipogonadismo hipogonadotrópico (Zanaria *y col.*, 1994). Por lo tanto, en el locus DSS puede haber varios genes que no son necesarios para el desarrollo testicular, pero que cuando al menos uno de ellos está presente en doble dosis produce reversión sexual.

INTRODUCCIÓN

Al analizar la región de 160 Kb responsable de DSS se encontraron varios genes. Esta región contiene los genes MAGEb/DAM, que están asociados con la familia de genes MAGE que codifican antígenos de función desconocida relacionados con tumores (Muscatelli *y col.*, 1995). También se encontró otro gen que en pacientes con ACH estaba bien deletado o bien mutado, al que se le denominó *DAX1* (DSS-ACH critical region on the X chromosome, gene 1) (Zanaria *y col.*, 1994).

Basándose en todos estos descubrimientos, Jimenez *y col.*, (1996a) propusieron una hipótesis según la cual *DAX1* actuaría como un represor testicular y tendría un papel antagonista de *SRY*. Según esta hipótesis, la función de una sola copia de *DAX1* sería contrarrestada por la presencia de *SRY*. En hembras, al no haber *SRY*, *DAX1* no tendría impedida su función y reprimiría los genes de la ruta masculina, formándose un ovario. En los individuos XY la función de la única copia de *DAX1* sería contrarrestada por *SRY*, y se produciría un desarrollo testicular. Sin embargo, una sola copia de *SRY* sería incapaz de antagonizar la función de *DAX1* cuando se encuentra en doble dosis, por lo que en los individuos XY con *DAX1* duplicado se reprimirían los genes de la ruta masculina produciéndose un desarrollo ovárico.

Gran parte de estas predicciones se confirmaron experimentalmente mediante la generación de ratones transgénicos para el gen *Dax1* (Swain *y col.*, 1998; Jiménez y Burgos, 1998). Los ratones XY que llevaban copias extra transgénicas de *Dax-1* mostraban un retraso en el desarrollo testicular cuando el gen se expresaba en niveles elevados, pero normalmente no presentaban reversión sexual. Sin embargo, cuando se construían ratones transgénicos para *Dax1* con el cromosoma Y de *Mus musculus poschiavinus*, que tiene un alelo "debil" de *Sry*, se producía reversión sexual completa.

El gen *Dax-1* de ratón está formado por dos exones y un intrón (Zanaria *y col.*, 1994). El exón 1 codifica el dominio N-terminal de la proteína y dos tercios del dominio C-terminal. El exón 2 codifica el resto del dominio C-terminal y la región en 3' que no se traduce. El gen *DAX1* codifica un miembro poco común de la superfamilia de receptores hormonales. En las diferentes especies de mamíferos estudiadas, la proteína tiene entre 470 y 474 aminoácidos. En esta proteína se distinguen dos regiones claramente diferenciadas tanto estructural como funcionalmente. La mitad de la proteína, correspondiente al extremo

INTRODUCCIÓN

carboxi-terminal, es similar al dominio de unión al ligando (LBD, de "Ligand Binding Domain") de la superfamilia de los receptores hormonales. En la mitad amino-terminal de la proteína existe una región de unión al ADN (DBD, de "DNA Binding Domain"). Esta región está formada por repeticiones incompletas de un motivo de unión a ADN, de tamaño variable entre especies (McElreavey y Fellous, 1999). Estas repeticiones tienen un tamaño comprendido entre 65-67 aminoácidos, y son ricas en alanina y glicina. No sólo el tamaño de las repeticiones presenta variaciones interespecíficas, sino también el número de repeticiones. Así, mientras que en humano y ratón la región DBD de *DAX1* presenta cuatro repeticiones, la del gen correspondiente de pollo sólo presenta una (Smith y col., 2000). Esta región no tiene similitud con ninguna secuencia proteica previamente caracterizada, y puede definir un nuevo dominio de unión a ADN con especificidad por estructuras en horquilla (Zazopoulos y col., 1997).

En ratón, *Dax1* se expresa en los todos los estadios del desarrollo adrenal, desde los más tempranos hasta el órgano adulto. Esta expresión siempre se limita al córtex adrenal. También hay niveles bajos de expresión en el hipotálamo, cerebro en desarrollo y en la pituitaria (Ikeda y col., 1996). El comienzo de la expresión de *Dax1* en gónadas de ratón se produce a los 10.5 dpc en células de tipo somático tanto en machos como en hembras. Después de los 12.5 dpc, la expresión disminuye drásticamente en el testículo, mientras que en ovario continúa. En el ratón adulto, *Dax1* se expresa en tejidos esteroideogénicos entre los que se incluye cortex adrenal, células de Leydig y células de la teca y de la granulosa.

En humanos el patrón de expresión es muy diferente. Desde el inicio de la formación del primordio gonadal, a los 33 dpo, se observa expresión, aunque los niveles son mucho más bajos que los que hay en la corteza adrenal en el mismo momento del desarrollo. En el macho estos niveles bajos de expresión continúan a lo largo de todo el período de gónada indiferenciada (33-44 dpo) y durante el periodo de diferenciación testicular, donde los transcritos se detectan principalmente en los cordones testiculares en desarrollo. Esto es coherente con la expresión en las células de Sertoli. En la gónada en desarrollo femenina existen los mismos bajos niveles de expresión, y continúan a lo largo de todo el período previo y posterior a la diferenciación ovárica. Estos niveles se mantienen

INTRODUCCIÓN

tanto el testículo como el ovario en desarrollo a lo largo de los *estadios* fetales (Hanley y *col.*, 2000).

En cerdo la cresta genital aparece por primera vez a los 21 dpc. En el macho a los 24 dpc aparecen los primeros signos de diferenciación testicular, y a los 28 dpc ya se han formado las células de Leydig. La gónada femenina permanece indiferenciada hasta los 28 dpc, momento en el que se inician la formación de cordones. La meiosis comienza a los 44 dpc, y el ovario está prácticamente diferenciado a los 46 dpc. La expresión de *DAX1* comienza en la cresta genital de ambos sexos a los 21 dpc. Esta expresión se mantiene alta hasta los 32 dpc. A partir de entonces los niveles en testículo disminuyen, mientras que los niveles en ovario son aproximadamente 3 veces más altos. Estos niveles se mantienen hasta después del nacimiento (Parma y *col.*, 1997).

SOX9

La displasia campomélica (CD) es una patología relacionada con una malformación del esqueleto, aunque también se encontró reversión sexual en un alto porcentaje de pacientes XY con esta enfermedad (ver revisión por Houston y *col.*, 1983). El análisis de 5 hembras XY con displasia campomélica, no emparentadas entre sí, reveló que no tenían ninguna alteración en *SRY* ni tampoco en otros genes conocidos que pudieran estar implicados en el desarrollo masculino (Ebensperger y *col.*, 1991). El locus de la displasia campomélica (CMPD1) así como el de la reversión sexual antes descrita (Autosomal Sex Reversal Locus SRA1) fueron localizados en la misma región cromosómica en humanos: 17q24.3-q25.1 (Tommerup y *col.*, 1993). Al cartografiar esta región se encontró un gen con un dominio que tenía más de un 60% de homología con la caja HMG de *SRY*: *SOX9* (de "*SRY*-related HMG-box 9") (Foster y *col.*, 1994; Wagner y *col.*, 1994). Se encontraron mutaciones de este gen en pacientes que presentaban tanto displasia campomélica como reversión sexual (Wagner y *col.*, 1994). Estudios de Pacientes con mutaciones en *SOX9*, que revelaban una amplia variedad de fenotipos revelaron que la inactivación de uno sólo de los dos alelos activos de *SOX9* es suficiente para producir

INTRODUCCIÓN

CMPD1/SRA1, por lo que podemos pensar que se trata de un caso de insuficiencia haploide más que de dominancia autosómica.

El gen humano de *SOX9* posee dos intrones. La proteína SOX9 tiene un tamaño de 509 aminoácidos. Su estructura es la típica de un factor de transcripción con un dominio de unión al ADN, la caja HMG, que ocupa los aminoácidos comprendidos entre las posiciones 104-182 y tiene una homología del 71% con la caja HMG de SRY. En el tercio carboxi-terminal de la proteína existe una región rica en prolina y glutamina, similar a los dominios de trans-activación de los factores de transcripción (Foster *y col.*, 1994). La caja HMG se une a las secuencias consenso AACAAAT y AACAAAG (Bell *y col.*, 1997), típica de SRY y otras proteínas SOX. Pero además se ha encontrado que se une a las secuencias ATGAAT y CACAAT que están en el intensificador específico de condrocito en el primer intrón del gen *COL2A1* de colágeno de tipo II humano (Bell *y col.*, 1997). Los genes *SOX9* de ratón y pollo tienen características generales similares a las descritas para humano.

SOX9 es un factor de transcripción del que hasta el momento se sabe implicado en la condrogénesis y en la determinación sexual. Estudios de expresión durante el desarrollo de los huesos han revelado que este gen se expresa en diferentes estadios de la maduración del condrocito (Wagner *y col.*, 1994).

En ratón, la expresión de *Sox9* comienza a los 10.5 dpc, en el primordio gonadal indiferenciado. Aunque muchas otras partes del embrión expresan también este gen (especialmente cartílago en desarrollo y tubo neural), en ese estadio no se ha observado expresión en el mesonefros. A los 11.5 dpc, la expresión es muy abundante en los primordios gonadales de los embriones XY, pero está ausente en la de los embriones XX. En este estadio los transcritos se localizan en el interior de las células somáticas distribuidas en la parte central del primordio gonadal, mientras que las células del epitelio celómico son negativas. Durante el desarrollo del testículo se mantiene un nivel alto de expresión de *Sox9*, localizándose los transcritos en los cordones testiculares. A los 13.5 dpc la expresión se localiza en el interior de las células de Sertoli, estando ausente en cualquier otro tipo celular. En el desarrollo ovárico no se observa expresión, excepto en un pequeño grupo de células localizadas en la parte anterior, el interior del mesonefros, donde también se expresa en machos (Morais da Silva *y col.*, 1996; Kent *y col.*, 1996). En ningún otro

INTRODUCCIÓN

estadio posterior del ovario, adulto o en desarrollo, se han encontrado transcritos de *Sox9*. En el macho adulto se han detectado altos niveles de expresión en la periferia de los túbulos seminíferos, en el interior de las células de Sertoli.

En humanos la expresión comienza en machos sobre los 41 dpo, coincidente con los primeros signos de diferenciación testicular, y tiene un pico a los 44 dpo. Esta expresión se mantiene hasta las 18 semanas de gestación, y se localiza en el interior de las células de Sertoli. En la gónada femenina no se ha observado expresión antes de los 48 dpo. Después se observan bajos niveles de expresión en la región de la rete-ovarii embrionaria, manteniéndose incluso hasta las 14 semanas de gestación (Hanley y col., 2000).

En el pollo, el primordio gonadal comienza a verse a los 4 días de incubación, pero no existe ningún signo de diferenciación hasta los 5.5 días de incubación, cuando se observa expresión de *SOX9* en el tejido ubicado entre los mesonefros aunque no en la gónada. A los 6.5 y los 7.5 días de incubación se observa expresión en primordio gonadal masculino, pero no en el ovario en desarrollo. En este estadio la expresión entre los mesonefros ha desaparecido. Además de en la gónada, también se observa expresión en el desarrollo del esqueleto, con un patrón muy parecido al observado en ratón. (Morais da Silva y col., 1996; Kent y col., 1996).

SF1

El factor esteroideogénico 1 (*SF1*, de "Steroidogenic factor 1"), también conocido como proteína 4 de unión adrenal (*Ad4BP*, de "adrenal 4-binding protein") se identificó por primera vez como un importante regulador de la expresión de las P450 citocromo hidroxilasas esteroideas, en las líneas celulares adrenocorticales y gonadales. (Rice y col., 1991; Lala y col., 1992). Inicialmente, de acuerdo con su papel en la regulación de hidroxilasas esteroideas, La expresión de *SF1* se localizó en los principales tejidos esteroideos del ratón adulto (Ikeda y col., 1993): en la corteza adrenal, en testículo, en células de Leydig, en ovario, en las células de la teca y de la granulosa, y en el cuerpo

INTRODUCCIÓN

lúteo, aunque más tarde se descubrió que también se expresaba en las gónadas en desarrollo (Luo *y col.*, 1994). Al analizar embriones de ratón se encontró expresión en la cresta urogenital a los 9 dpc (Ikeda *y col.*, 1994) lo que hizo suponer que tendría un papel en el desarrollo gonadal, más allá de la regulación de las hidroxilasas esteroideas.

Al analizar la estructura del ADN complementario (ADNc) de *SF1* se encontró que tenía una gran homología con el ADNc del gen de la proteína embrionaria de unión a repeticiones terminales largas (ELP, de "embryonal long terminal repeat-binding protein") aislado de una genoteca de ADNc procedente de células tumorales de ratón embrionario. El aislamiento y caracterización de los clones genómicos reveló que SF1 y ELP proceden del mismo gen estructural mediante el uso de promotores alternativos y posterior maduración alternativa (Ikeda *y col.*, 1993). El análisis estructural también reveló que el dominio en dedos de Zinc de unión al ADN que poseen estas proteínas es muy parecido al de un receptor nuclear poco común aislado de *Drosophila*, conocido como "Fushi-Tarazu factor 1" (FTZ-F1) (Lavorgna *y col.*, 1991). Debido a esto se denominó *Ftz-F1* al gen de ratón. Aunque, como hemos visto, el gen *Ftz-F1* codifica dos proteínas: ELP y SF1, no se han encontrado altos niveles de transcritos ELP durante los estadios clave del desarrollo adrenal y gonadal, mientras que sí aparecen transcritos SF1, lo que indica que sólo este último factor es el necesario para el desarrollo adrenal y gonadal.

Para estudiar el efecto que las mutaciones del gen *Ftz-F1* producen en el desarrollo, se construyeron ratones transgénicos para un alelo nulo de dicho gen (Luo *y col.*, 1994). Cuando se cruzaron dos heterocigotos +/-, se comprobó que la descendencia tenía una proporción mendeliana 1-/- :2+/-: 1+/, lo que indicaba que los dobles mutantes sobrevivían hasta el momento del nacimiento. Las crías -/- parecían moverse y mamar normalmente, y carecían de anomalías externas patentes. Sin embargo, comenzaron a morir a partir de las 12 horas después del parto (dpp), no sobreviviendo en ningún caso a los 8 dpp. El análisis histológico reveló que los animales deficientes del gen *Ftz-F1* carecían de glándulas adrenales y de gónadas. El desarrollo gonadal en los animales nulos para *Ftz-F1* se inicia normalmente, formándose un engrosamiento en el mesénquima del mesodermo intermedio. Pero a los 12.5 dpc, justo en el momento de la diferenciación gonadal, comienza a sufrir una profunda degeneración que desemboca en su total desaparición.

INTRODUCCIÓN

Esta expresión comienza en los dos sexos a los 9.5 dpc, coincidiendo con el comienzo de la formación de la cresta genital. En el macho, a los 10.5 dpc, se produce un pico en los niveles de expresión, coincidiendo con los primeros signos de determinación testicular. Este pico se mantiene hasta 14 dpc. Después los niveles bajan, aunque continúa la expresión. Esta expresión se localiza las células de Leydig y en las de Sertoli. En la hembra también se produce un aumento en los niveles de expresión a los 10.5 dpc, pero decaen rápidamente. A partir de los 13.5 hay un nivel basal de expresión menor que el de machos en esos mismos estadios.

El gen *SF1* humano tiene un tamaño aproximado de 28 Kb, y consta de 6 intrones y 7 exones. La secuencia codificante está muy conservada, teniendo una alta homología con la de ratón, rata, y bóvidos. La proteína tiene 461 aminoácidos, uno menos que la de ratón, y posee un dominio de unión al ADN compuesto por dos dedos de zinc, muy conservados en mamíferos. También está muy conservado el dominio carboxi-terminal de la región donde se localizan los dedos de zinc, que es muy similar a la encontrada en varios receptores nucleares que interaccionan con la secuencia consenso AGGTCA del ADN (ver revisión por Parker, 1998).

En humanos, las crestas genitales se observan por primera vez a los 32 dpo, y en ellas ya se observa expresión de *SF1*. A los 41 dpo el nivel de expresión de *SF1* es el mismo para los dos sexos, y no se han localizado transcritos en el interior de las células germinales. En el macho la expresión continúa igual en el momento de la diferenciación testicular (44 dpo). A los 52 dpo la expresión se localiza principalmente en los cordones testiculares en desarrollo, aunque también hay alguna expresión en la región intersticial donde residen las células de Leydig. A las 18 semanas de gestación se ha invertido este patrón de expresión, y la señal es mucho más intensa en el tejido intersticial que en el interior de los cordones. En la hembra a los 52 dpo se observa una expresión difusa por toda la gónada, y en los estadios tardíos del desarrollo se aprecia una señal fuerte en el epitelio celómico (Hanley y col., 1999).

WT1

El tumor de Wilm (WT, de "Wilm's tumour") o nefroblastoma es un tipo de cáncer pediátrico de las células madre del riñón en desarrollo que afecta a 1 de cada 10000 niños (Matsunga, 1981). Algunos pacientes con WT (1-2%) también tienen aniridia, anomalías genitourinarias y retraso mental (WAGR, de "WT-Aniridia-Genitourinaria anomalies-Retardation"). Otros (aprox. 2%) padecen el síndrome de Denysh-Drash (DDS), (de "Denysh-Drash syndrome") caracterizado por nefropatías y malformación en el sistema reproductivo. El análisis citogenético demostró que en un alto porcentaje de casos WT estaba asociado a una delección en el cromosoma 11, en el locus 11p13 (Riccardi *y col.*, 1978), y en el interior de esa región se encontró un gen al que se denominó *WT1* (de "Wilm's tumour 1") (Gessler *y col.*, 1990). Para comprobar el efecto de este gen en el desarrollo se construyeron ratones transgénicos para un alelo nulo (Kreidberg *y col.*, 1993). Ratones homocigotos para este alelo murieron a mitad de gestación, probablemente debido a anomalías en el corazón, que presentaba malformación de la capa mesotelial y el pericardio. Además carecían de riñón metanéfrico, testículos y ovario. Estudios posteriores demostraron que se produce una formación inicial del mesénquima metanéfrico, aunque rápidamente degenera.

El gen *WT1* de humanos tiene 10 exones y un tamaño de 50 Kb. Los cuatro últimos exones codifican 4 dominios de dedos de Zn de la variedad Cys₂-His₂. En el extremo 5' hay una región que codifica un dominio típico de factores de transcripción, rico en prolina y glutamina. Gracias a esta estructura, el gen *WT1* codifica más de 32 isoformas diferentes mediante el uso de promotores alternativos, maduración alternativa y corrección del ARNm (ver revisión por Reddy y Licht, 1996).

Tanto en humanos como en ratón, el gen *WT1* se expresa durante todo el desarrollo embrionario del riñón y también se ha encontrado expresión en el primordio gonadal de ambos sexos, expresión que se mantiene durante todo el desarrollo gonadal. En adultos se ha encontrado expresión en las células de Sertoli, en las células de la granulosa y de la teca.

WNT4

WNT4 es un gen que codifica una señal celular de actuación local perteneciente a la familia *WNT* (Cardigan y col., 1997). Estudios de expresión revelaron que este gen es necesario para la nefrogenesis del riñón metanéfrico. También se observó expresión en el mesonefros, en la gónada y en el conducto de Müller (Stark y col., 1994).

Ratones homocigotos para un alelo nulo del *Wnt4* mueren de insuficiencia renal poco después de nacer. Los testículos de estos ratones en el momento de nacer son redondeados, con cordones sexuales prominentes formados por células de Sertoli que envuelven a las germinales. El conducto de Wolff tiene una apariencia normal. El desarrollo de la gónada y los conductos sexuales en ratones machos homocigotos para un alelo nulo del gen *Wnt4* son morfológicamente indistinguibles de los de genotipo salvaje. Además, la expresión de marcadores celulares específicos de las células de Sertoli, (Hormona Anti Mülleriana y Desert-Hedgehog), de las células de Leydig (3- β -hidroxiesteroide dehidrogenasa), y de los conductos de Wolff (Sonic hedgehog) muestran el mismo patrón de expresión que en machos salvajes.

Sin embargo, el desarrollo de la gónada de los ratones hembra si que se vé afectado en individuos homocigóticos para un alelo nulo de *Wnt4*. En el momento del nacimiento tienen un ovario redondeado sin ninguna cubierta, mientras que el ovario de individuos salvajes es alargado y cubierto por una capa exterior de epitelio celómico. Tanto la gónada como los conductos sexuales muestran un fenotipo masculinizado. El conducto de Müller ha degenerado completamente, mientras que el de Wolff continúa con su desarrollo. Muchas veces la gónada tiene una posición normal, pero otras aparece asociada con un cuerpo graso que es típico de macho. En el momento del nacimiento, el ovario contiene muy pocos oocitos, ya que están sufriendo un proceso de degeneración. En las zonas donde hay ausencia total de oocitos comienzan a formarse estructuras parecidas a cordones, y se ha encontrado expresión de hormona Anti Mülleriana y de Desert

INTRODUCCIÓN

Hedgehog, dos marcadores celulares específico de las células de Sertoli (Vainio *y col.*, 1999).

En humanos, *WNT4* se ha localizado en el cromosoma 1, en el locus 1p31-p35. Pacientes XY con este locus duplicado muestran diferentes anomalías en el desarrollo sexual, desde criptorquidia a reversión sexual completa. En los individuos con *WNT4* duplicado se ha encontrado sobreexpresión de *DAX1*, por lo que el *WNT4* podría ser un activador de *DAX1*. Como ya hemos descrito anteriormente, individuos XY con *DAX1* duplicado pueden tener fenotipo femenino. La reversión sexual XY en individuos con el gen *WNT4* duplicado puede deberse a una sobreexpresión de este gen, lo que aumentaría el nivel de expresión de *DAX1*. Estos altos niveles de transcritos *DAX1* no podrían ser inhibidos por el nivel normal de *SRY*, produciéndose reversión sexual (Jordan *y col.*, 2001).

En ratón, se encuentra expresión del *Wnt4* en el mesénquima del mesonefros antes de la formación de la cresta genital. En estos estadios no se ha encontrado expresión en los túbulos mesonéfricos, aunque sí en la región del epitelio celómico por donde se va a diferenciar la cresta genital. A los 10.5 dpc, se encuentra expresión de *Wnt4* en el mesénquima de los primordios gonadales indiferenciados de ambos sexos y en el mesénquima del mesonefros, aunque no hay expresión en los túbulos mesonéfricos ni en el conducto de Wolff. A los 11.5 dpc en el comienzo de la diferenciación testicular no hay expresión de *Wnt4* en el macho, mientras que en la hembra se mantiene. Este dimorfismo en la expresión continúa durante todo el desarrollo gonadal. Durante el desarrollo del conducto de Wolff no se ha encontrado expresión de *Wnt-4*, mientras que sí se observa expresión en el conducto de Müller desde el inicio de su formación, donde se mantiene a lo largo de todo el desarrollo fetal (Vainio *y col.*, 1999)

FGF9

El factor de crecimiento de fibroblatos 9 (*FGF9*, de "fibroblast growth factor 9") es una señal molecular perteneciente a la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (ver revision por Ornitz e Itoh., 2001). Durante el desarrollo embrionario de ratón se ha

INTRODUCCIÓN

encontrado expresión del gen *Fgf9* en una amplia variedad de tejidos, entre los que se incluyen el mesodermo intermedio, el miocardio ventricular, la pleura pulmonar, mioblastos, neuronas motoras de la espina dorsal, y el bulbo olfativo. En la gónada XY se ha encontrado expresión a los 11.5, 12.5 dpc y a los 18.5 dpc pero en esos mismos *estadios* no se ha encontrado expresión en la gónada XX, ni tampoco en el mesonefros en ambos sexos.

Para estudiar los efectos de *Fgf9* en el desarrollo gonadal de ratón se construyeron ratones transgénicos para un alelo nulo de este gen (Colvin *y col.*, 2001). Los homocigotos para este alelo murieron en el nacimiento. El número de hembras de estas camadas era muy superior al de machos, lo que suponía un indicio de reversión sexual. Efectivamente, el análisis de las gónadas XY reveló que la mayoría tenían fenotipo femenino. A partir de los 12.5 dpc, la cantidad de mesénquima en el interior de estas gónadas homocigóticas para la mutación era menor de la que normalmente hay en testículo del mismo estadio, lo que hizo sospechar que FGF9 podría actuar como una señal celular que induce la migración de células procedentes del mesonefros al interior de la gónada. Para comprobar esta hipótesis se realizaron varias pruebas con embriones de ratones de 11.5 dpc. En cultivos recombinantes de órganos, donde se ponían mesonefros procedentes de una cepa de ratones transgénicos que expresaban la β -galactosidasa junto con gónadas salvajes XX y XY, se comprobó que las células del mesonefros migraban al interior de la gónada XY, mientras que no se observaba esta invasión celular en la gónada XX (Martineau, 1997). En cambio, cuando se repetía este experimento con la gónada XX en presencia de FGF9, se producía una invasión celular procedente del mesonefros, en la mayoría de estas gónadas (Colvin *y col.*, 2001). Entre los 13.5 y los 14.5 dpc, las gónadas XY tienen el mismo tamaño que los ovarios de la misma edad, más pequeños que los testículos del mismo estadio. En su interior no se aprecia la formación de cordones testiculares, o bien están muy desorganizados. Se observaron zonas donde había formación rudimentaria de algunas estructuras parecidas a cordones, con supuestas células de Sertoli en su interior, que presentaban características de inmaduras (menor cantidad de retículo endoplásmico rugoso, e interdigitaciones celulares indefinidas). Alrededor de los cordones más desarrollados incluso había células mioides, lo que sugiere que son las células de Sertoli las que inducen

INTRODUCCIÓN

su diferenciación. Sin embargo, se estudió la expresión de genes marcadores de las células de Leydig: (el gen de rotura de la cadena lateral de colesterol: *SCC*, de "Cholesterol side chain cleavage"), y de las células de Sertoli (el gen de la *AMH*), no encontrándose expresión de ninguno de estos genes en la mayoría de las gónadas estudiadas, o bien niveles de expresión por debajo de los correspondientes a testículos en ese mismo estadio. Por otra parte, el proceso de migración y colonización de las células germinales en este tipo de gónadas se desarrolla normalmente.

AMH

La regresión del conducto de Müller en los fetos masculinos hizo postular la existencia de una segunda hormona fetal testicular diferente de la testosterona, la hormona Anti-Mülleriana (*AMH*) (Jost, 1953). El estudio del Freemartinismo hizo sospechar que esta hormona también tiene un papel en la diferenciación sexual. Los freemartin son individuos XX, gemelos de fetos XY de ganado vacuno, que presentan un fenotipo masculinizado. Se sugirió que este fenotipo podría deberse al paso de *AMH* de un macho a una hembra gemela a través de una anastomosis en la placenta. Estos individuos carecían de conducto de Müller y presentaban una masculinización del ovario. Este contenía estructuras parecidas a cordones testiculares con células morfológicamente iguales a las de Sertoli y una disminución en el número de oocitos (Jost y col., 1975). El mismo efecto se observó al cultivar ovarios fetales de rata expuestos a tejido testicular o a *AMH* bovina fetal (Vigier y col., 1987), y en ratones transgénicos con sobreexpresión de *AMH* (Behringer y col., 1990).

La proteína *AMH* es un miembro de la familia del factor- β de crecimiento transformante, e induce la regresión del conducto de Müller, que en la hembra es el precursor de los oviductos, útero y vagina superior. En ratón, no se ha encontrado expresión de *AMH* en el primordio gonadal indiferenciado. En el macho, la expresión comienza a los 12.5 dpc, en las células pre-Sertoli, cuando ya ha comenzado la diferenciación testicular. Esta expresión continúa durante todo el desarrollo testicular, hasta

INTRODUCCIÓN

la pubertad, momento en que la transcripción disminuye hasta niveles basales. Este momento coincide con la primera ronda de espermatidas que entran en meiosis. En la hembra no se ha encontrado expresión durante todo el desarrollo ovárico prenatal, pero a partir de 6 dpp se encuentran bajos niveles de transcritos en las células de la granulosa, que se mantienen durante toda la época fértil (Münsterberg y Lovell-Badge., 1991).

El hecho de que los niveles altos de AMH, durante el desarrollo gonadal femenino, coincidan con la disminución en el número de oocitos, y de que justo cuando se produce la entrada en meiosis de las espermatidas disminuyen también los niveles de transcritos en el testículo, ha llevado a postular que los niveles altos de AMH pueden resultar tóxicos para las células germinales que entran en meiosis.

DMRT1

En humanos se han descrito casos de reversión sexual XY en pacientes que tenían una deleción en el locus 9p24 del cromosoma 1. Se denominó TD9 a la mínima región capaz de provocar esta reversión (Hoo *y col.*, 1993). Al analizar esta zona se localizaron dos genes próximos a la región TD9, los *DMRT1* y *DMRT2* (de "double-sex mRNA related Transcript gene 1 y 2) (Raymond *y col.*, 1998). Aunque *DMRT1* estaba fuera de la región TD9, se encontraba a menos de 30 Kb de este locus, por lo que aún podía ser considerado como candidato de la reversión sexual.

En humanos, se ha encontrado expresión de *DMRT1* en la gónada masculina a las 6 semanas de gestación, cuando se forma el primordio gonadal indiferenciado. A las 7 semanas, cuando ha comenzado la diferenciación testicular, esta expresión aún continúa, y se localiza en los cordones testiculares, probablemente en la células pre-Sertoli. En cambio, no se ha encontrado expresión en ningún momento del desarrollo embrionario de la gónada femenina (Moniot *y col.*, 2000). En ratón, se ha encontrado expresión de este gen en el primordio gonadal indiferenciado de ambos sexos, a partir de los 10.5 dpc, manteniéndose a los 12.5 dpc, cuando aparecen los primeros signos de diferenciación testicular, y hasta los 13.5 dpc. En el testículo esta expresión se localiza en la periferia de los cordones

INTRODUCCIÓN

testiculares, mientras que en la hembra se pueden ver señales puntuales a lo largo de toda la gónada. A los 14.5 dpc, la expresión en la hembra es ya apenas detectable, mientras que en el macho hay una fuerte señal en los cordones, continuando a los 16 dpc, e incluso en el testículo adulto, mientras que en la hembra ya no se vuelve a detectar expresión (De Grandi *y col.*, 2000).

Otros Genes

Además de estos genes, existen otros a los que se les conoce algún papel en la diferenciación sexual, y también están apareciendo nuevos genes que, bien por su patrón de expresión, o bien por el fenotipo de individuos mutantes, se sospecha que tienen un papel en la determinación y diferenciación del sexo.

Entre estos genes se encuentra *LIM1*, que posee una caja HMG (homeobox) y está implicado en la regulación de una molécula organizadora. Ratones homocigóticos para un alelo nulo de *Lim1* mueren en estadios muy precoces, pero aquellos que sobreviven carecen de riñón y gónadas. Se piensa que *LIM1* está implicado en la maduración del primordio gonadal, pero aún no se ha podido analizar con detalle cual puede ser su papel concreto, en parte debido a la temprana mortandad de los mutantes (Shawlot *y col.*, 1995).

El gen del antígeno relacionado con Fos (*FRA-1*, de "Fos related antigen") ha sido identificado como un una diana de SRY, ya que experimentos *in vitro* revelaron que en presencia de la proteína SRY se intensificaba la transcripción de *Fra1* (Cohen *y col.*, 1994). Sin embargo no se ha encontrado expresión de *Fra1* en ninguno de los estadios claves del desarrollo gonadal, por lo que parece que no está implicado en la determinación o diferenciación sexual (Jeske *y col.*, 1996).

La aromatasa es un miembro de de la familia de los citocromos P450, y es responsable de la transformación de testosterona en estradiol. Es necesario que el gen de la aromatasa esté totalmente reprimido durante el desarrollo testicular. Experimentos *in vitro* han revelado que la proteína SRY se une al promotor del gen de la aromatasa, por lo que se pensó que esta unión podría producir la represión de la expresión de aromatasa. *In vivo*, es

INTRODUCCIÓN

poco probable que sea este el caso, ya que *SRY* se expresa en las células de Sertoli, mientras que la aromatasa es un producto de la línea esteroidogénica (Haqq *y col.*, 1993).

Desert Hedgehog (*DHH*) codifica una señal celular de actuación local. En ratón su expresión comienza en los precursores de las células de Sertoli poco después de la activación de *Sry*, y continúa hasta testículo adulto. En el desarrollo ovárico no se ha encontrado expresión de *Dhh*. Ratones hembra homocigóticas para un alelo nulo *Dhh* muestran un fenotipo normal, mientras que los machos son viables pero infértiles, debido a una completa ausencia de esperma maduro, por lo que se cree que este gen pudiese estar implicado en la espermatogénesis (Bitgood *y col.*, 1996).

El gen *OCT4* codifica un factor de transcripción perteneciente a la familia POU (de "Pit, Oct, Unc"), cuyos componentes están implicados en la regulación del desarrollo. Se expresa en las células totipotentes, durante los primeros estadios embrionarios, aunque su expresión se deprime en el momento en que éstas comienzan una ruta de diferenciación (ver revisión por Pesce *y col.*, 1998). También se expresa en la línea germinal hasta el comienzo de la meiosis, tanto en machos como en hembras, aunque en estas últimas la expresión se reactiva tras el nacimiento. Este patrón de expresión demuestra la implicación de este gen en la regulación de la función de las células germinales de mamíferos.

El promotor de la *AMH* contiene una secuencia consenso de unión de la familia de los factores de transcripción GATA. Aunque se han encontrado tres miembros de esta familia en el testículo y ovario, GATA1, GATA4 y GATA6, solo GATA4 está presente en la gónada en desarrollo. Estudios de expresión *in vitro* han demostrado que GATA4 se une a su secuencia consenso en el promotor de *AMH* y activa su expresión. Se ha encontrado expresión de *GATA4* a los 11.5 dpc en el primordio gonadal de ambos sexos. Más tarde también se ha encontrado expresión en las células de Sertoli y en las intersticiales. En el ovario en desarrollo también se han encontrado altos niveles de expresión hasta los 16 dpc. Además de en el promotor de *AMH*, también se ha encontrado secuencias *GATA* consenso, cadena arriba, alrededor de los genes *WT1* y *SF1* (Viger *y col.*, 1998). Ratones deficientes para *GATA4* mueren en el útero entre los 8.5 y 10.5 dpc, por lo que el papel de este gen en la determinación y diferenciación del sexo no ha podido ser estudiado con detalle (Molketin *y col.*, 1998).

INTERACCIÓN ENTRE GENES IMPLICADOS EN LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DEL SEXO

Conociendo los cambios morfológicos que se producen en el desarrollo gonadal, se intenta averiguar actualmente la identidad e interacción de los genes responsables de la formación de una u otra gónada.

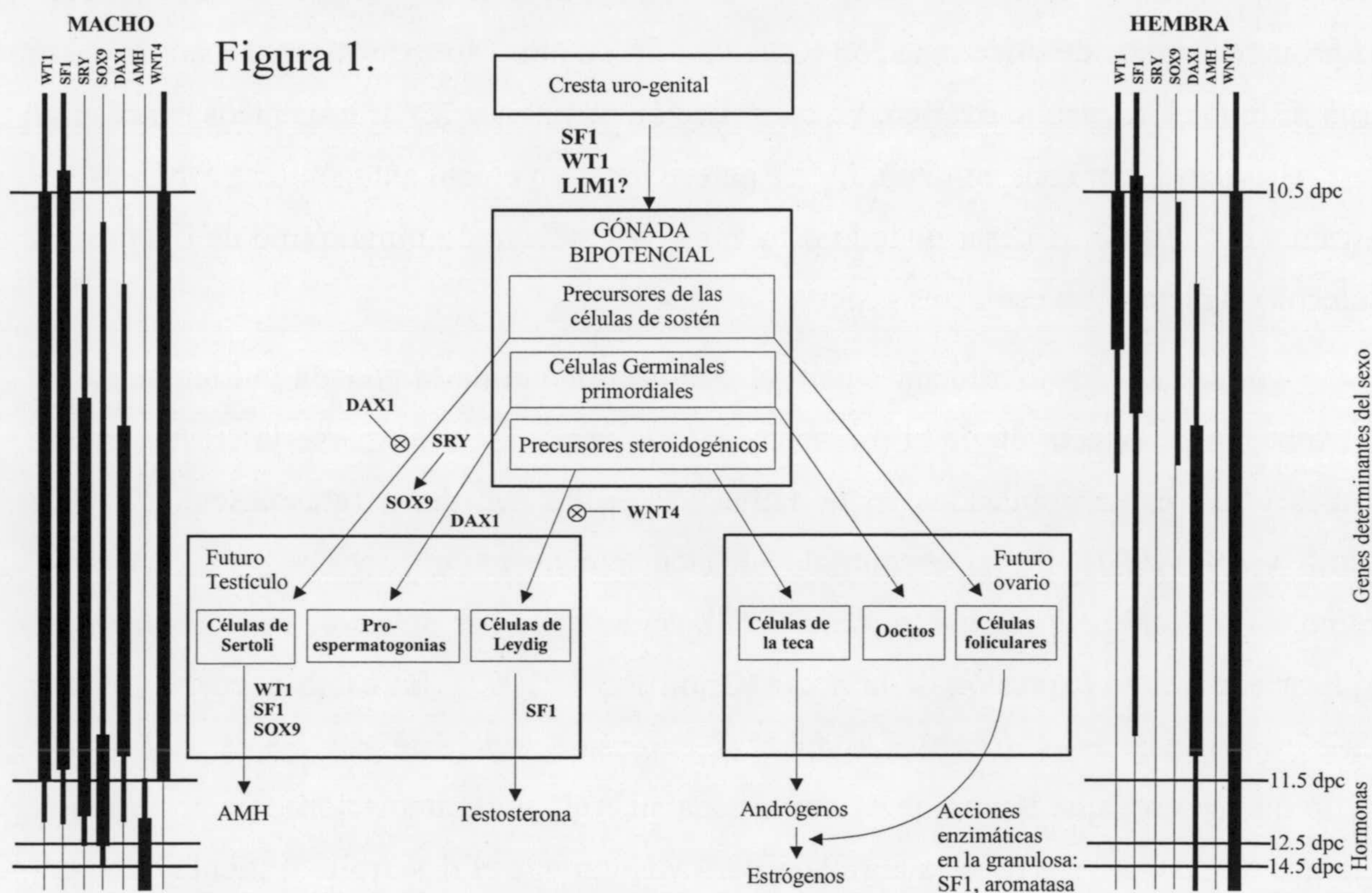
En el primordio gonadal indiferenciado de ratón de ambos sexos se ha encontrado expresión de varios genes que intervienen en el determinismo y diferenciación sexual: *WT1*, *SF1* y *LIM1*.

A continuación se expresan genes que muestran un patrón de expresión diferente dependiente del sexo. Aquellos que se expresen más tiempo, o cuyo nivel de expresión sea más alto en un determinado sexo son los que están implicados en la diferenciación de dicho sexo. En el momento de la determinación sexual de la gónada masculina, a los 10.5 dpc, se ha encontrado expresión de *SRY*, *DAX1*, *SOX9*, *WNT4*, y posiblemente también de *FGF9*. La expresión de *SRY* en ratón comienza a los 10.5 dpc, en el primordio gonadal indiferenciado masculino, alcanza un pico a los 11.5 dpc, y desaparece a los 12.5 dpc. Simultáneamente a la expresión de *SRY* se producen cambios en la expresión de los otros tres genes mencionados. Algunos de ellos aumentan el nivel de expresión. *WT1* y *SF1* tienen un patrón de expresión muy parecido entre sí, a los 10.5 dpc aumentan sus niveles, que se mantienen altos hasta los 14 dpc, momento en el que vuelven a los valores iniciales. *SOX9* inicia su expresión a los 10.5 dpc, alcanza un pico a 12.5 dpc, volviendo posteriormente a un nivel basal. En el testículo, también se ha encontrado expresión del *FGF9* a los 11.5 dpc, 12.5 dpc y 18 dpc, por que su expresión será continua dentro de este período.

En el ovario embrionario también se ha encontrado expresión de *WT1*, *SF1*, *SOX9*, y *WNT4* a los 10.5 dpc así como *DAX1*. Sobre 10.5 dpc, se produce un aumento en la expresión de *SF1* y *WT1*, como ocurría en testículo, pero estos niveles caen aquí rápidamente, y a los 11.5 dpc han caído a un nivel basal similar al que hay en testículo a los 14 dpc. *SOX9* tiene una señal muy débil a los 10.5 dpc, y desaparece a los 11.5 dpc. *WNT4* y *DAX1* comparten un mismo patrón de expresión. La primera señal se encuentra a los 10.5

INTRODUCCIÓN

dpc, y se mantiene durante todo el desarrollo gonadal (ver revisión por Swain y Lovell-Badge., 1999). En la siguiente figura (Fig. 1) puede apreciarse la relación existente entre las ventanas de expresión de diferentes genes implicados en la determinación y diferenciación sexual, junto con los eventos más importantes que ocurren durante el desarrollo de las gónadas.



SRY es el gen regulador maestro que dirige la gónada indiferenciada hacia testículo. El gen *SRY* dirige la diferenciación de las células Sertoli, y éstas a su vez conducen la diferenciación de los demás tipos celulares testiculares. Por lo tanto *SRY* activa, directamente o no, a otros genes implicados en la diferenciación y mantenimiento de la identidad de las células de Sertoli. *SOX9* se expresa en la misma línea celular y en el mismo momento que *SRY*. Además su expresión se mantiene en machos, mientras que se suprime en hembras, por lo que es un buen candidato a ser directamente regulado por *SRY*. De hecho tanto en el promotor de *SOX9* de humano como de ratón se ha encontrado una diana potencial de *SRY*. No obstante, esta diana se encuentra fuera de un fragmento de 113pb que

INTRODUCCIÓN

confiere especificidad sexual en la expresión, según se ha deducido de estudios de transcripción *in vitro*. Sin embargo, hasta el momento, no existen pruebas de un control directo de la expresión de *SOX9* por parte de *SRY* (ver revisión por Koopman, 1999).

Al igual que *SOX9*, *DAX1* se expresa en el testículo embrionario de ratón, en el mismo tipo celular y al mismo tiempo que *SRY*, pero deja de expresarse cuando aparecen los primeros signos de diferenciación testicular. En cambio, su expresión se mantiene a lo largo de todo el desarrollo ovárico. La construcción de ratones XY transgénicos para *DAX1* ha revelado que, al menos en ratón, *DAX1* parece tener un efecto antagónico a *SRY* y *SOX9* (Swain y col., 1998). A pesar de todo esto, no se ha encontrado ningún tipo de interacción molecular directa entre estos tres genes.

SF1 y *WT1* son esenciales para el establecimiento de la gónada indiferenciada, y su expresión se detecta desde el momento en que comienza a formarse la cresta genital. Ambos genes están implicados en la activación de un gen de la ruta masculina: *AMH* (Giuli y col., 1997). Se ha encontrado un elemento de unión al ADN para SF1 en el promotor de *AMH*. Sin embargo, tanto WT1 como SF1, por sí solos, son incapaces de explicar el nivel de expresión de la *AMH* (Giuli y col., 1997). En cambio, cuando ambos genes están presentes, *AMH* posee un nivel de expresión suficiente para ejercer su función, por lo que se cree que tiene que existir alguna sinergia en la actuación de ambos genes, para que se alcancen los niveles normales de AMH durante el desarrollo testicular. Los co-activadores y los co-represores son cofactores que modulan receptores nucleares activados por ligando y otros factores de transcripción. Los cofactores suelen estar ampliamente distribuidos por diferentes tipos celulares. No obstante, WT1 puede ser un ejemplo de cofactor de un receptor nuclear específico de tejido. La colocación de SF1 y WT1 sólo se produce en las células de Sertoli y en las de la granulosa, lo que es coherente con su papel en la regulación de la expresión de la *AMH*. Por otro lado, *DAX1* se expresa en el mismo tipo celular que *SF1* y *WT1*, en un momento en que ambos genes están activos, y este comienzo de la expresión de *DAX1* coincide con una disminución de los niveles de expresión de *SF1* y *WT1*. Posteriormente no se produce la activación de *AMH*. Estudios *in vitro*, demostraron que DAX1 antagoniza el efecto activador de SF1, ya sea mediante una inhibición directa de la transactivación uniéndose directamente al ADN, o bien mediante

INTRODUCCIÓN

una heterodimerización con SF1 que impidiese su interacción con WT1 (Nachtigal y col., 1998). Aunque estudios *in vitro*, han revelado que ambos fenómenos pueden ocurrir, parece ser que la interacción entre las proteínas DAX1-SF1 impide el efecto sinérgico de SF1-WT1, y es responsable en mayor medida de la inhibición de la expresión de *AMH*. Esto supondría que SF1 es un receptor hormonal localizado en la células de Sertoli, que interviene en el desarrollo gonadal, y que tiene un coactivador, WT1 y un co-represor, DAX1, y que ejerce su función dependiendo de los niveles de estos cofactores.

SOX9 también se expresa durante el desarrollo gonadal en el mismo tipo celular y en el mismo estadio que *SF1*. En el promotor de *AMH* se ha encontrado una secuencia consenso para la unión de los genes *SOX*, y es muy probable que *SOX9* se una a él para activar la expresión de *AMH*. Estudios de expresión *in vitro* han demostrado que *SOX9* puede cooperar con SF1 en este proceso de activación. Estudios de interacción proteica *in vivo* e *in vitro* indican que *SOX9* y SF1 interaccionan directamente a través del dominio de unión al ADN de *SOX9* y de la región carboxi-terminal de SF1. Por lo tanto, ambos factores de transcripción parecen estar implicados en la activación de la *AMH*, por un lado mediante sus respectivos dominios de unión al ADN que se unen a su promotor, y por otro, por la interacción entre ambas proteínas.

WNT4 es un gen que parece estar implicado en el desarrollo ovárico. Cuando su expresión aumenta por encima de su nivel normal en individuos XY, se produce reversión sexual (Jordan y col., 2001). En estos individuos también se observa un aumento de la expresión de *DAX1*, por lo que el fenotipo masculino puede deberse a la acción ejercida por el aumento de dosis de este último gen (Swain y col., 1998). Esto sugiere que *WNT4* regula la expresión de *DAX1*, y que la acción concertada de ambos previene el desarrollo testicular. Se ha postulado que *WNT4* puede ser la conexión entre *DAX1* y *SRY*. Así, *SRY* puede antagonizar a *WNT4* bien regulando directamente su expresión, o bien interfiriendo en la cascada de señales celulares WN.

Recientemente se ha descubierto la implicación de *FGF9* en el desarrollo testicular (Colvin y col., 2001). Parece tener un papel importante en la migración de células procedentes del mesonefros al interior de la gónada indiferenciada. Aunque son necesarios

INTRODUCCIÓN

estudios futuros para conocer su papel, debe de estar regulado por genes que inician la cascada génica de determinismo del sexo (*SRY?*, *SOX9?*).

En la figura 2, mostrada a continuación, puede verse un esquema que representa las interacciones génicas que se han descrito en este apartado.

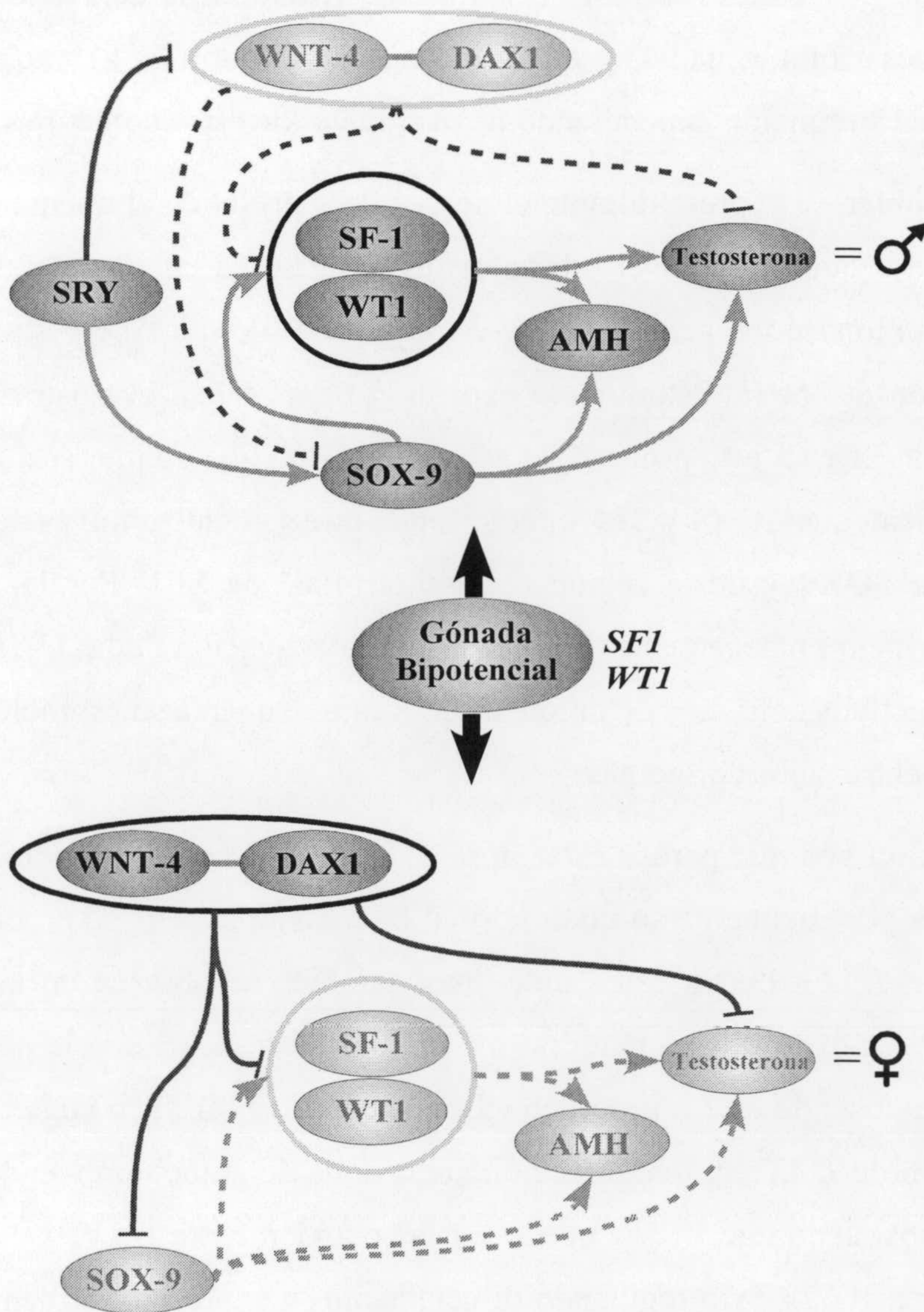


Figura 2. Esquema de las interacciones entre varios genes implicados en la determinación y diferenciación sexual. En colores vivos se indican los genes activos en cada caso, las líneas rojas indican inhibición y las verdes activación. Las líneas discontinuas indican las acciones que no se ejercen, y las líneas continuas las que sí.

EXPRESIÓN GÉNICA Y DIFERENCIACIÓN

El primer evento en la diferenciación sexual es el comienzo del desarrollo testicular, que se inicia con la invasión del primordio gonadal indiferenciado por células mesénquimáticas procedentes del mesonefros. En cultivos en los que las gónadas estaban aisladas, o eran separadas del mesonefros mediante una membrana, no se producía la formación de cordones, lo que demostró que era necesario un contacto directo entre ambos para que se produjese el desarrollo testicular (Buehr *y col.*, 1993). Otros experimentos en los que se cultivaron gónadas XX y gónadas XY junto con mesonefros demostraron que la migración celular sólo se produce cuando la gónada es XY (Martineau *y col.*, 1997). Experimentos en los que se han cultivado gónadas XX transgénicas para una copia activa de *SRY* y gónadas XXY con un alelo nulo de *SRY* han revelado que en el primer caso se produce migración, mientras que en el segundo no (Capel *y col.*, 1999). Esto indica que parece ser necesaria la presencia de *SRY* para que se produzca la migración celular por parte del mesonefros. No obstante la proteína *SRY* no sería la única responsable de esta migración, ya que todo indica que actúa como un factor de transcripción, y este papel lo debería ejercer una señal celular de actuación local. Por otro lado la migración celular continúa varios días después de que finalice la transcripción de *SRY*. Recientemente se ha encontrado una señal celular de actuación local que se expresa en el testículo embrionario, *FGF9*, que podría estar implicado en esta función. En cultivos de gónadas XX junto a mesonefros en los que se añadía este factor se ha comprobado que se produce la migración celular, e incluso la formación de cordones (Colvin *y col.*, 2001).

El siguiente evento en el desarrollo testicular es la formación de cordones testiculares y la diferenciación de células de Sertoli en su interior. Para que ocurra este proceso es necesario que tenga lugar la invasión de células mesenquimáticas procedente del mesonefros (Tilman y Capel, 1999). En ratón, es necesario que esta migración celular se

INTRODUCCIÓN

inicie antes de los 11.5 dpc para que se produzca la diferenciación testicular. En cultivos donde se retira el mesonefros después de los 11.5 dpc la diferenciación testicular continúa, por lo que posteriormente a este estadio no es necesaria su presencia para el mantenimiento de los cordones.

Con objeto de investigar la ventana de competencia en la que se pueden formar cordones se realizaron experimentos en los que se cultivaban, a modo de "Sandwich" un mesonefros, una gónada XX, y una XY. En esta situación, con órganos de 11.5 dpc, se inducía la formación de cordones en la gónada XX, situada en medio. Sin embargo, cuando alguna de las dos gónadas, o las dos, eran de 12,5 dpc, no se inducía esta formación de cordones. Por lo tanto, sólo a los 11.5 dpc puede la gónada XY producir los factores necesarios, y también sólo a los 11.5 dpc, la gónada XX es susceptible de desarrollar los cordones, siendo estos requerimientos independientes de la edad del mesonefros, aunque no de su dotación cromosómica, ya que la formación de cordones en la gónada XX se vé favorecida si el mesonefros es también XX.

En condiciones normales la presencia de SRY de las células de sostén induce la diferenciación de las células de Sertoli. No obstante se han encontrado casos de células de Sertoli XX. Así, en ratones quimera XX-XY, un 10% de las células de Sertoli eran XX (Palmer y Burgoyne, 1991a). Esto indica que en presencia de SRY se favorece la diferenciación de las células de Sertoli, pero que también se puede producir el ambiente necesario para que se produzca dicha diferenciación en su ausencia. Este argumento también es válido para la diferenciación de otros tipos celulares gonadales. Hay varios ejemplos de esto: en ovario, cuando desaparecen los oocitos se produce una transdiferenciación y comienzan a formarse cordones, en ratones hermafroditas quimera XO/XY y XO/XY/XYY se produce un reclutamiento de células XX entre las células de Sertoli y de células XY entre las foliculares (Palmer y Burgoyne, 1991b).

El hecho de que la formación de cordones pueda ser inducida, en la gónada XX, por la migración de células del mesonefros, sugiere que la inducción de la diferenciación de células de Sertoli depende sólo de dicha migración. Sin embargo, hay probablemente implicados otros factores. Se espera que en gónadas mosaico XX/XY la señal para la migración celular proceda de las células XY, distribuidas al azar por toda la gónada. Las

INTRODUCCIÓN

células que responden a esta señal penetran en la gónada, y se encuentran también al azar con células precursoras de sostén, ya sean XX o XY, induciendo en ellas la diferenciación de células de Sertoli. Sin embargo, hay un fuerte sesgo a favor de las células XY (>90%) lo que podría explicarse si (a) las células XY presentan una predisposición a diferenciarse como células de Sertoli, probablemente por la expresión previa de *SRY*, (b) si hay una proliferación más rápida de las células XY, o (c) Puesto que las precursoras de las células de Sertoli XY producen la señal para la migración celular, tienen un efecto quimiotáctico sobre las células que migran (Tilman y Capel, 1999).

Las células germinales, que previamente han invadido el primordio gonadal indiferenciado, pueden comportarse, a partir de este momento, de dos formas diferentes, dependiendo del sexo. Así, en el desarrollo testicular, entran en estado de arresto mitótico, mientras que en el ovárico lo hacen en arresto meiótico. Es de destacar que cuando algunas células germinales entran por error en otros tejidos, como los adrenes, se paran en arresto meiótico (Mc Laren, 1995), lo que hace pensar que estas células están programadas para detenerse en meiosis, y que durante el desarrollo testicular se produce algún factor que las induce a entrar en arresto mitótico, y por lo tanto, a seguir un desarrollo masculino. Este supuesto factor es aún desconocido, pero es probable que sea producido por las células de Sertoli. Un candidato a ser este factor es "Desert Hedgehog" (DHH) ya que es una señal celular de actuación local, que se expresa en las células de Sertoli desde 11.5 dpc hasta el adulto, mientras que en la gónada femenina no se ha encontrado expresión. Este patrón de expresión sugiere que puede estar regulado directamente por *SOX9* o por *SRY*, aunque en la actualidad aún no se ha encontrado ninguna relación de regulación entre estos genes. Es de destacar que ratones macho deficientes para *Dhh* son infértiles debido a la ausencia de esperma (Bitgood y col., 1996). Estas gónadas en estadio embrionario pesan menos que las normales, aunque actualmente no se sabe si esta deficiencia se debe sólo al menor número de células germinales, o de Sertoli, o ambas, o incluso deficiencia de otros tipos celulares. En ovarios, sin embargo, la pérdida de células germinales está relacionada con reversión sexual. En casos de freemartinismo (Jost, 1953), cultivos de ovarios de rata en presencia de AMH bovina fetal, o expuestos a tejido testicular (Vigier y col., 1987) y casos de ratones transgénicos con sobreexpresión de *AMH* (Behringer y col., 1990) se produce una depleción

INTRODUCCIÓN

de las células germinales en el ovario. Este hecho, unido a que en machos se produce una disminución de los niveles de expresión de *AMH* en testículo, justo cuando las espermatidas entran en meiosis, hace suponer que esta hormona tiene un efecto letal para las células germinales que han entrado en meiosis. Acompañando a esta pérdida de células germinales en los ovarios, se producen cordones seminíferos aunque, por supuesto, carentes de células germinales. Las células germinales en meiosis son necesarias para la formación y mantenimiento de los folículos de forma que si los oocitos desaparecen, las células de sostén pueden formar cordones seminíferos (McLaren, 1991). Jiménez *y col.*, (1996a) postularon que las células germinales podrían actuar inhibiendo la formación de tejido testicular. De esta forma, mientras hubiese oocitos no podría formarse tejido testicular, pero una vez que la AMH haya matado a las células germinales, se elimina la inhibición de la formación de tejido testicular, y se forman los cordones seminíferos. Una explicación alternativa podría achacar a la propia AMH la responsabilidad de la presencia de tejido testicular, sin embargo, se han descrito casos donde la ausencia de células germinales en gónadas XX no es debida a la influencia de la AMH, como es el caso de ovarios fetales de rata cultivados durante largos periodos de tiempo, y que también desarrollan estructuras parecidas a cordones (Prépin e Hida, 1989). Tampoco hay influencia de la AMH en los ovarios del gran canguro australiano, donde también se ha encontrado una depleción de las células germinales y la formación de estructuras parecidas a cordones testiculares (Whitworth *y col.*, 1996). Además, se ha demostrado que la pérdida de las células germinales alrededor del comienzo de la foliculogénesis es suficiente para inducir la formación de estructuras parecidas a cordones testiculares en los cultivos de ovarios de rata (Prepin *y col.*, 1989). También, en muchos casos, los ovarios de ratas seniles pierden las células germinales, y se produce una transdiferenciación de los folículos a cordones testiculares (Crummeyrolle-Arias *y col.*, 1976). Aunque se han descrito algunos casos donde la pérdida de células germinales no produce reversión del sexo, como la mutaciones white spotting (*W*) y steel (*Sl*) (ver revisión por Donovan, 1991), prácticamente todos los casos de reversión sexual XX descritos hasta ahora están precedidos por una pérdida de las células germinales. Cuando éstas se pierden, las células de la línea de sostén, tanto si son pre-foliculares, como foliculares pueden diferenciarse en Sertoli y formar

INTRODUCCIÓN

cordones seminíferos. Por lo tanto, todo apunta a que tanto en el ovario en desarrollo, como en el adulto, las células germinales inhiben la diferenciación de las células de Sertoli a partir de las células de la línea de sostén.

REVERSIÓN SEXUAL EN MAMÍFEROS

En todo mamífero podemos distinguir tres tipos de sexo. El *sexo genético* viene determinado por la dotación cromosómica del individuo, de tal manera que si tiene dos cromosomas X será hembra, y si tiene un X y un Y será macho. Los individuos XY desarrollan testículos, mientras que los XX desarrollan ovarios, definiéndose así el *sexo gonadal*. Las gónadas producen hormonas que dirigen el proceso de diferenciación sexual del resto del organismo, dando como resultado el fenotipo sexual masculino o femenino y constituyéndose de este modo el *sexo fenotípico*. De acuerdo con este patrón, se produce una reversión sexual cuando no hay correspondencia entre el sexo genético y el gonadal o el fenotípico.

El estudio de la reversión sexual ha sido posible gracias al estudio de mutaciones en los genes que intervienen en el determinismo y diferenciación del sexo que no resultan letales en los estadios embrionarios. Los pacientes con reversión sexual facilitan la localización e identificación de los genes que intervienen en el proceso de determinación y diferenciación sexual. Como veremos a continuación, la etiología de las reversiones sexuales es muy variada.

Hembras XY

El origen más evidente de estos casos es la delección del gen *SRY*. No obstante, las alteraciones cromosómicas en las cuales se ha perdido la región determinante del sexo no son muy comunes. El mecanismo mas frecuente por el que puede ocurrir este tipo de mutación es un intercambio desigual entre los cromosomas X e Y durante la meiosis

INTRODUCCIÓN

paterna. Otro mecanismo en el que se pierde el gen *SRY* es mediante translocaciones Y-autosomas (Page y col., 1990). Finalmente, diversas mutaciones puntuales que afectan directamente al gen *SRY* pueden representar otro origen para hembras XY. En cualquiera de estos casos, los individuos afectados presentan disgenesia gonadal y suelen ser más altos que la media de las hembras (Hawkins, 1993).

Determinadas mutaciones en el gen *WT1* dan lugar a individuos con nefropatía progresiva, conocida como el síndrome de Denys-Drash, que normalmente aparece durante el primer año de vida, proceso que va acompañado de la aparición del tumor de Wilm. La mayoría de los individuos son XY, y al nacer suelen presentar genitales externos femeninos o ambiguos (Müeller, 1994).

Los pacientes con dotación cromosómica 46XY afectados por una malformación congénita del esqueleto denominada displasia campomélica, presentan simultáneamente un amplio rango de fenotipos sexuales, incluyendo machos normales, hembras con tejido testicular, hembras con disgenesia testicular y hembras normales con ovarios conteniendo ovocitos. Sin embargo, no hay descritos casos de individuos 46 XX con las mismas disfunciones. Este tipo de reversión sexual se debe a mutaciones en el gen *SOX9* (Tommerup y col., 1993).

También se han descrito casos de reversión sexual en individuos XY que tenían duplicado la región del cromosoma X donde se encuentra el locus del gen *DAX1* (Bardoni y col., 1994). Los individuos presentan fenotipo femenino y sus genitales externos suelen ser ambiguos.

Al igual que para *DAX1*, pacientes XY que tienen duplicado un fragmento del cromosoma 1 donde se encuentra el locus del gen *WNT4* poseen un fenotipo femenino (Jordan y col., 2001).

Asimismo se han descrito casos de disgenesia gonadal en individuos XY cuya patogénesis no se conoce, asociados a múltiples anomalías congénitas, como el síndrome genitopalatocardiaco (Simpson, 1976), el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (Bialer y col., 1987), el síndrome de Frasier (Moorthy y col., 1987), el síndrome de costilla corta de tipo

INTRODUCCIÓN

IV Beemer-Langer (Cidecyan *y col* 1993). Otros están asociados al retraso mental ligado al X, como el síndrome ATR-X (Gibbons *y col.*, 1991).

Machos XX

Aunque no se trata de una reversión sexual, el caso más conocido de individuos con dos cromosomas X y sexo masculino es el síndrome de Klinefelter (XXY). Son individuos con fenotipo masculino y *SRY* (de aquí la ausencia de reversión sexual), que después de la pubertad tienen testículos pequeños azoospermicos (esterilidad), ginecomastia (crecimiento de las mamas en el varón) y diferentes grados de deficiencia en los niveles séricos de testosterona.

Normalmente, los machos XX aparecen como consecuencia de la presencia de secuencias del cromosoma Y, incluido el gen *SRY*, en uno de los dos cromosomas X o en algún autosoma, estando la translocación presente en todas las células del individuo (Ferguson-Smith *y col.*, 1990). Son machos con una media de altura similar a la de las hembras, tienen inteligencia normal y no tienen genitales externos ambiguos. Los testículos son similares a los del síndrome de Klinefelter. No obstante, también se han descrito casos de machos XX sin secuencias procedentes del cromosoma Y (Palmer *y col.*, 1989). La mayoría de estos pacientes tienen genitales ambiguos, aunque también puede haber fenotipo masculino completo. No se ha encontrado ninguna evidencia para explicar este tipo de reversión sexual, aunque la heterogeneidad de fenotipos encontrados sugiere que debe de haber más de un tipo de anomalía genética subyacente. Una explicación sencilla podría basarse en que un gen normalmente está inactivo en ausencia de *SRY*, se activa mediante algún tipo de mecanismo, directo o indirecto, iniciando así el desarrollo testicular. este es el caso de *SOX9*, ya que individuos XX con este gen duplicado poseen fenotipo masculino (Koopman, 2001). La pérdida de función de algún gen implicado en la ruta femenina también puede ocasionar este tipo de reversión sexual. Así, ratones

INTRODUCCIÓN

transgénicos homocigotos para un alelo nulo del gen *WNT4* presentan en el momento de nacer una gónada y conductos sexuales masculinizados.

Hermafroditas verdaderos

Se trata de individuos que contienen ambos tipos de tejido gonadal, testicular y ovárico. La gónada que contiene ambos tipos de tejidos se conoce como ovoteste. En la mayoría de los casos, una de las gónadas es un ovoteste, mientras que la otra es un testículo o un ovario. Se dan pocos casos en los que una de las gónadas sea un testículo y la otra un ovario, o en las que ambas sean ovotestes. Los testículos y la parte testicular del ovoteste en los hermafroditas verdaderos son similares a los testículos XX, conteniendo sólo células de Sertoli y sin evidencia de espermatogénesis. Las partes ováricas suelen contener folículos ováricos de aspecto normal, y en algunos casos pueden ser funcionales. Los individuos cuyas dos gónadas son ovotestes suelen tener los conductos de Wölff y de Müller. En los otros dos casos descritos anteriormente, el conducto de Müller desaparece normalmente en el lado del testículo.

En humanos, la mayoría de los individuos afectados de hermafroditismo verdadero presentan un cariotipo 46 XX. El resto se reparte entre individuos 46 XY, quimeras 46XX/46XY y mosaicos para los cromosomas sexuales (Van Niekerk y col., 1981). El mosaicismo se produce normalmente como consecuencia de errores en la disyunción meiótica o la mitótica de los cromosomas sexuales. Las quimeras XX/XY suelen producirse por la doble fertilización de un óvulo y su cuerpo polar, de manera que el individuo resultante estará compuesto por de células de los dos embriones (Gartler y col., 1962).

El caso de Ellobius

INTRODUCCIÓN

El género *Ellobius* comprende varias especies extensamente estudiadas desde el punto de vista citogenético. Una de estas especies, *E. fuscocapillus* presenta la típica constitución de cromosomas sexuales común entre los mamíferos (XX/XY). Sin embargo, entre las otras especies, tanto machos como hembras de *E. lutescens* son $2n=17(X0)$. Esto no sólo plantea problemas de viabilidad de los cigotos $2n=16(00)$, sino que los $2n=18(XX)$ también resultan letales, sin que hasta el momento haya una explicación satisfactoria para esta letalidad. Otras especies del género, *E. tancrei*, *E. talpinus* y *E. alaicus* presentan 2 cromosomas X en ambos sexos, con constituciones cromosómicas que van desde $32(XX)$ hasta $54(XX)$ debido a la ocurrencia de translocaciones robertsonianas. El cariotipo inusual de estas especies ha provocado interés acerca de cómo podría llevarse a cabo en ellas el determinismo del sexo. La presencia del gen *SRY* ha sido excluida mediante estudios moleculares, y se ha asumido que la determinación sexual podría correr a cargo de algún otro gen mutado, de actuación posterior al *SRY*. Del mismo modo, se ha descartado la presencia del gen *ZFY* en *E. lutescens* y *E. tancrei*, aunque la obvia fertilidad de los machos XX y X0 apunta a que el responsable de la determinación del sexo en estas especies debe ser un gen muy próximo al *SRY* en la cascada de regulación iniciada por este gen en otros mamíferos. La resolución de este problema en *Ellobius* podrá por tanto revelar datos clave para la comprensión de la determinación del sexo en mamíferos en general (ver revisión por Vogel y col., 1998).

Hermafroditismo verdadero en Talpa occidentalis.

El topo ibérico, *Talpa occidentalis* (Cabrera, 1914), se distribuye por toda la Península Ibérica, excepto en áreas del Norte y del Noreste, donde habita *T. europea*. Jiménez y col., (1988) describieron un nuevo caso de reversión sexual XX en esta especie. Mientras que los individuos XY son invariablemente machos normales, los XX son hembras funcionales, fenotípicamente intersexos con ovotestes bilaterales.

Los topos se reproducen estacionalmente. En el Sur de la Península Ibérica el período reproductivo se extiende generalmente desde Noviembre hasta Marzo, aunque los

INTRODUCCIÓN

límites del mismo suelen ser variables en distintos años (Jiménez y col., 1990a). Durante el período no reproductivo, los testículos de los machos se reducen en tamaño hasta representar una quinta parte de su peso durante la estación reproductiva y se hacen completamente estériles. Al final del verano se reanuda la meiosis testicular, que alcanza su máxima actividad coincidiendo con el período de ovulación de las hembras. En los ovotestes de las hembras ambos componentes, testicular y ovárico siguen un patrón de variación estacional independiente, existiendo determinadas variables, tales como el volumen ovárico o el peso del útero, que varían estacionalmente, mientras que otras lo hacen en función de la edad del individuo (Jiménez y col., 1996b). Igual que ocurre en *Talpa europaea* (Harrison-Mathews, 1935), en *T. occidentalis* también se produce la apertura del orificio vaginal al inicio de cada estación fértil y su posterior sellado al final del mismo (datos no publicados).

Las peculiares características de estos individuos fueron descritas en detalle por Jiménez y col. (1993). Todos los individuos XX tienen los derivados de los conductos de Müller desarrollados normalmente, mostrando vagina, útero y oviductos. Sin embargo, también presentan derivados de los conductos de Wolff, tales como epidídimos rudimentarios. Estos son variables en tamaño, y aparecen generalmente como un tubo epididimario pequeño, tapizado internamente por células ciliadas y fuertemente asociado a la cubierta gonadal por tejido conectivo, incluyendo tejido adiposo. Están localizados cerca del polo testicular del ovoteste, en las proximidades de la rudimentaria *rete testis* que existe en esta región.

Los ovotestes están compuestos de una pequeña parte de tejido ovárico normal y una porción variable en tamaño de tejido testicular disgenésico. Ambas regiones no están separadas por una barrera continua de tejido conectivo. La cubierta gonadal varía con el tipo de tejido que envuelve. En la parte testicular está presente una túnica albugínea típica. Esta túnica se separa de la gónada sobre la porción ovárica, constituyendo así una bursa ovárica, que está conectada con el infundíbulo y los oviductos. La porción ovárica está directamente cubierta por una monocapa de células prismáticas dando lugar a un epitelio ovárico típico.

INTRODUCCIÓN

El tejido ovárico es normal y proporciona fertilidad a las hembras de topo. Contiene numerosos folículos primarios y secundarios y uno o más folículos de de Graaf. La parte testicular está compuesta de una masa de tejido testicular organizada en lóbulos, separados por travéculas de tejido conectivo y una *rete testis* con un desarrollo variable, localizada normalmente cerca del polo no ovárico, al lado de los epidídimos. La *rete testis* está formada por muchos túbulos de apariencia normal con lúmina visible, cuyo diámetro aumenta al acercarse a la túnica albugínea. Estos túbulos, así como los de los epidídimos suelen estar vacíos, aunque ocasionalmente en su interior pueden haber *detritus* celulares, como ocurre en los epidídimos de los machos en la época no fértil.

El tejido testicular contiene un gran número de estructuras parecidas a pequeños cordones testiculares, embebidas en una abundante matriz de tejido intersticial. Las células que hay en los cordones testiculares del ovoteste tienen características de células de Sertoli inmaduras. Estas células definen la superficie exterior de los cordones, que es muy regular y continua entre una célula y la siguiente. Rodeando a estas células hay una lámina basal, que es a su vez circundada por células peritubulares, que emiten largos y delgados procesos citoplasmáticos, quedando el cordón sexual totalmente aislado del tejido intersticial. En el interior de los cordones testiculares no hay células germinales.

El tejido intersticial está compuesto principalmente por células de Leydig que son prácticamente indifereciables de las de los testículos normales. Poseen abundante citoplasma con numerosos orgánulos en su interior. Estas células de Leydig producen altos niveles de testosterona, aunque dicha producción es menor durante la estación reproductiva.

Con objeto de investigar un posible origen de esta reversión sexual basado en el traspaso de secuencias del cromosoma Y paterno hasta el cromosoma X de estos individuos, se estudió en detalle la meiosis de los machos de *T. occidentalis* mediante la observación de preparaciones de complejos sinaptinémicos (Jiménez y col., 1990 b y c). Aunque este estudio permitió demostrar la existencia de apareamiento heterólogo entre regiones de ambos cromosomas sexuales y el autoapareamiento de ambos brazos del cromosoma X, estos estudios no proporcionaron evidencias de la existencia de translocaciones X-Y en esta especie. Estos datos fueron confirmados más tarde mediante

INTRODUCCIÓN

estudios moleculares de "Southern blotting" y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de "Polymerase Chain Reaction"), que demostraron la ausencia del gen determinante testicular *SRY* en el genotipo de las hembras de topo.



OBJETIVOS



OBJETIVOS

Las excepcionales características que nuestro grupo había descrito previamente en las gónadas de las hembras de *Talpa occidentalis*, conferían a esta especie un alto valor intrínseco como objeto de estudio científico. Este valor deriva no solo del interés por conocer qué procesos citológicos, histológicos, endocrinológicos, bioquímicos, fisiológicos y, por supuesto, genéticos y evolutivos, pueden haber conducido a la obtención de un fenotipo sexual tan peculiar, sino también de la posibilidad cierta de que estos datos puedan contribuir a aumentar nuestros conocimientos sobre los procesos de determinación y diferenciación sexual de los mamíferos en general, y de la especie humana en particular. La realización de estos estudios constituye el objetivo general de nuestro grupo de investigación, aunque debido a su magnitud y carácter multidisciplinar se trata de un objetivo a largo plazo que, en muchos casos, deberá ser abordado en colaboración con otros grupos. Desde esta perspectiva, para el presente estudio nos hemos planteado los objetivos que se describen a continuación.

1. Hacer de *Talpa occidentalis* una especie útil para su uso en investigación, convirtiéndola así en un nuevo modelo animal en el campo de la biomedicina. Se trata de un objetivo amplio en el que podemos tener en cuenta, a su vez, dos aspectos importantes.
 - a. Desarrollo de metodologías específicas, no existentes previamente, para su uso con este tipo de material, tales como:
 - Localización y captura de topos en su medio natural.
 - Identificación y captura selectiva de hembras preñadas y lactantes.
 - Acondicionamiento y manejo adecuado de hembras preñadas y lactantes en cautividad.
 - Localización y manejo adecuado de nidos de topo naturales, y acondicionamiento de nidos artificiales.
 - Caracterización precisa del ciclo reproductivo estacional del topo en la localidad de estudio.

OBJETIVOS

- Técnicas de microdissección de embriones fetos y crías de topo para el estudio de su tracto reproductor.
 - Adaptación de las técnicas citológicas e histológicas para su uso con este tipo de material.
 - Adaptación de las técnicas de análisis genético molecular para su aplicación al escaso volumen de material de estudio disponible.
- b. Análisis preciso del proceso de desarrollo pre- y postnatal de los ovotestes de las hembras de *T. occidentalis*, para establecer una base de conocimientos imprescindible para la correcta interpretación de los posteriores análisis de tipo genético molecular, fisiológico, etc...
2. Estudio de los patrones de expresión en el topo de tres genes implicados en el proceso del determinismo genético del sexo en mamíferos. Estos genes son los siguientes:
- a. *SRY*, cuya expresión solo sería estudiada en los machos de *T. occidentalis*, dado su carácter de gen ligado al cromosoma Y.
 - b. *SOX9*, que debido a su carácter de gen marcador de las células de Sertoli, su expresión sería investigada tanto en machos como en hembras.
 - c. *DAX1*, que por su implicación en los primeros pasos del proceso de determinación sexual, también se investigaría en ambos sexos.
3. Por último, los resultados de estos estudios nos permitirían extraer conclusiones acerca del papel de los genes citados durante los procesos de determinación y diferenciación sexual de *Talpa occidentalis* y del resto de los mamíferos. Asimismo, el conocimiento preciso del proceso de desarrollo de los ovotestes de *T. occidentalis* permitiría también extrapolar datos sobre como ocurre dicho proceso en otras especies en las que se dan casos de reversión sexual, ya sea total o parcial, tales como muchas especies de mamíferos domésticos o la propia especie humana.



MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y METODOS

MATERIAL ANALIZADO

El presente estudio se ha basado en el análisis de un total de 139 embriones fetos y crías de la especie de topo *Talpa occidentalis*. Estos animales pertenecían a distintos estadios de desarrollo, de manera que con ellos se cubría todo el proceso de organogénesis gonadal. Fueron clasificados atendiendo a una serie de características morfométricas, tal como se describe en el capítulo de Resultados. La tabla I recoge los datos básicos del material analizado.

Este material fue obtenido en la Vega de Granada, cerca de la localidad de Santa Fe, durante un total de 7 años consecutivos (1995-2001). Los embriones y fetos fueron obtenidos mediante la captura de hembras preñadas. Una vez capturadas, se determinó el *estatus* reproductivo de cada hembra mediante un reconocimiento *in situ* de sus características morfológicas. En dicho reconocimiento se determinaron y anotaron una serie de variables, tales como la existencia o no de un orificio vaginal abierto, el grado de inflamación y cantidad de mucosidad de la vulva, el tamaño y estado de los pezones de las mamas, la posible producción de leche y la presencia o no de embriones en el útero. Esto último se realizó mediante palpación directa del abdomen de las hembras, lo que permitía además determinar con bastante precisión en cada caso el estadio de gestación y, eventualmente, la fecha probable del parto. Para obtener las crías se procedió a la localización del nido cuando el examen de sus características morfológicas sugería que dicha hembra estaba preñada y próxima al parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla I. Material analizado, clasificado en función del estadio de desarrollo y del tratamiento seguido.

Estadio de gestación	Edad	Nº de camadas	Nº de individuos analizados		Nº de gónadas analizadas					
					Inclusión ^a en parafina		Inclusión ^b en resina		Extracción ^b de RNAm	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
E4	14-16 dpc	3	6	6	10	10	1	1	1	1
E5a	17 dpc	3	6	4	4	4	4	2	4	2
E5b	18 dpc	3	4	5	4	4	2	3	2	3
E5c	19 dpc	2	5	3	6	2	2	2	2	2
E6	19-21 dpc	4	6	8	8	6	2	5	2	5
E7	21-23 dpc	4	6	8	6	8	3	4	3	4
E8	24-28 dpc	3	4	4	4	4	2	2	2	2
E9 ^c	0-1 dpp	3	3	9	2	6	2	6	2	6
E10	5 dpp	5	6	8	4	6	4	5	4	5
E11	10 dpp	3	5	5	0	0	5	5	5	5
E12	15 dpp	2	2	4	0	0	2	4	2	4
E13	20 dpp	2	2	4	0	0	2	4	2	4
E14	25 dpp	3	4	6	0	0	4	6	4	6
E15a	30 dpp	4	1	2	0	0	1	2	1	2
E15b	30-90 dpp	3	1	2	0	0	1	2	1	2
Totales		47	61	78	48	50	37	53	37	53

dpc: Dias post coito.

dpp: Dias post parto

^a Individuos incluidos *in toto*, por lo que se analizaron las dos gónadas de cada uno de ellos.

^b Individuos disecados, de los que una gónada se incluyó en resina y la otra se uso para extraer RNAm. Por esa razón coinciden los números en los dos pares de columnas.

^c Neonatos

MÉTODOS

Obtención del material.

Métodos de captura.

La obtención de los embriones y crías de topo ha sido la tarea más difícil del presente trabajo. En la bibliografía se habían descrito algunos modelos de trampas, en general muy poco eficientes y cuyo uso implicaba la muerte del topo (ver Gorman y Stone, 1990). En nuestro grupo de investigación inicialmente se capturaban los topos a mano, cuando el animal estaba reconstruyendo un tramo de galería que con anterioridad le había sido destruida. Este método, aunque efectivo, requiere una gran cantidad de horas de dedicación, por lo que desarrollamos nuevos modelos de trampa que nos permiten capturar un mayor número de animales vivos en menor tiempo de trabajo de campo. En general, estas trampas consisten en un tubo de PVC sanitario de aproximadamente 20 cm de longitud y 5 cm de diámetro (\varnothing similar al de una galería de topo), a los que se les acoplan dos puertas en los extremos. Las puertas están unidas mediante un sistema mecánico de muelles y palancas a un resorte que sobresale en el interior del tubo. Al atravesar la trampa, el topo desplaza el resorte de su posición haciendo que las puertas se cierren y quede atrapado sin sufrir daño alguno. Dentro de estas trampas el topo puede permanecer con vida un tiempo limitado, que es menor en invierno (2-3 h) debido al frío. Por ello, se le acopla además un nido mediante una unión en T y una puerta de un solo sentido. Este nido está constituido por una capa exterior de un material impermeable (lámina de plástico) y una cubierta interior absorbente (lona). El nido se rellena además con hierba seca, que sirve de abrigo para el animal. Dentro del nido los topos pueden permanecer con vida durante mucho más tiempo, por lo que las trampas pueden ser instaladas por la mañana y revisadas por la tarde.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de embriones y fetos de topo

Para la obtención de embriones y fetos se hicieron capturas intensivas de topos en la Vega de Granada durante la estación reproductiva de estos animales, que dura aproximadamente 6 meses, desde Octubre hasta Marzo (Jiménez *y col.*, 1990a; Sánchez *y col.*, 1996). Inicialmente se capturaron topos al azar, colocando numerosas trampas y comprobando, mediante palpación abdominal, si las hembras capturadas estaban preñadas o no. No obstante, puesto que este método proporcionaba una baja eficiencia de captura de hembras preñadas que se encontrasen en los estadios de gestación deseados, decidimos cambiar nuestra estrategia de captura aprovechando la territorialidad de estos animales, que se mueven en un radio de unos 10-30 metros alrededor de su nido. Antes del inicio del periodo reproductivo capturamos una serie de hembras que marcamos colocando en la base de su cola anillas de aluminio numeradas y de diferentes colores. En un cuaderno de campo anotábamos el número *y color* de la anilla de cada animal, el estado de su orificio vaginal, la fecha, y la ubicación de su territorio fue además marcada en un mapa a escala 1:5.000. La recaptura periódica de estas hembras nos permitió realizar un seguimiento de sus características anatómicas a lo largo la época reproductiva. En las primeras capturas (Octubre) todas tenían el orificio vaginal cerrado, indicando de que todavía estaban en anestro. En los análisis posteriores, realizados cada 15 días aproximadamente, pudimos comprobar como las hembras entraban en estro, coincidiendo con la apertura de su orificio vaginal y, finalmente, quedaban preñadas.

Este método tenía el inconveniente de que en ocasiones no era posible, o se tardaba mucho tiempo en recapturar alguna hembra, lo cual era más frecuente si la primera captura se realizó lejos de su nido. Por ello comenzamos a utilizar técnicas de radio-rastreo, que permiten la localización rápida y exacta de la posición del nido. Para ello, una vez capturada la hembra, ésta era marcada con un pequeño radio transmisor, que era sujetado a su cola con esparadrapo. Posteriormente, con la ayuda de una antena direccional (tipo Yagi) conectada a un receptor de radio sintonizado con el radiotransmisor, se realizaba un seguimiento de la hembra preñada que, una vez liberada de nuevo en una galería de su territorio, generalmente se dirigía a su nido, permitiéndonos así su localización. No

MATERIAL Y MÉTODOS

obstante, era necesario comprobar que la hembra permanecía inmóvil en esa posición por largos periodos de tiempo antes de poder asegurar que ahí se encontraba efectivamente el nido, tarea esta que no solía durar menos de dos días de seguimiento. Entonces la hembra era recapturada para recuperar el radiotransmisor, que podía así ser utilizado para el seguimiento de otra hembra distinta. Contando con cuatro o cinco radiotransmisores, este método nos permite localizar entre 20 y 30 nidos de hembra en un mes de intenso trabajo de campo. El conocimiento de la posición del nido de cada hembra, garantizaba las repetidas recapturas periódicas de la misma, permitiendo así un seguimiento preciso de su *estatus* reproductivo.

Una vez que las hembras estaban preñadas, pudimos determinar con bastante aproximación el estadio de desarrollo de los embriones o fetos mediante palpación de su abdomen, que permite estimar la longitud del embrión (valor CRL; ver capítulo de resultados) con una precisión de ± 1 mm. Esto nos permitía liberar la hembra preñada si era necesario, para volver a recapturarla unos días después, una vez que los embriones hubiesen alcanzado el estadio de desarrollo de interés en cada caso. Alternativamente, cuando el tiempo de espera estimado era de tan solo uno o dos días la hembra en cuestión no era liberada de nuevo en su territorio sino alojada en uno de los cinco grandes terrarios que construimos a tal efecto.

Estos terrarios, situados en el recinto de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, miden 1.2 m en planta y tienen una profundidad de unos 20 cm de suelo de la Vega de Granada. Fueron construidos en obra con paredes alicatadas de 70 cm de altura, para evitar que el topo pueda escapar trepando, y un fondo de malla metálica galvanizada sobre el que se deposita el suelo, que descansa sobre una base de ladrillo suelto y grava que garantizan un excelente drenaje. Esto es necesario dado que los terrarios están construidos a la intemperie y sometidos, por tanto, a las inclemencias atmosféricas, incluida la lluvia. Además, para evitar que nuestros topos pudiesen ser depredados por animales domésticos tales como gatos o perros, que en ocasiones abundan por los jardines de nuestra facultad, todo el complejo está encerrado en una alambrada de malla metálica.

Aparte del suelo, el principal elemento de cada uno de estos terrarios es un nido artificial construido a partir de una caja de poliestireno expandido (de las comúnmente

MATERIAL Y MÉTODOS

utilizada por el transporte de productos congelados). Estos nidos artificiales fueron dotados de dos salidas al exterior, fabricadas en tubo de PVC de 50 mm de diámetro y una cámara de vídeo sensible a los infrarrojos que lleva acoplados seis leds de infrarrojos. Esta cámara fue colocada en posición cenital en el techo del nido y separada de éste por un vidrio delgado, que evitaba que el topo pudiese deteriorarla. Una vez conectada la cámara a un televisor situado en uno de nuestros laboratorios, este sistema nos permitió observar el comportamiento del animal alojado en el terrario y estimar, entre otras cosas, su estado de salud. Una vez en el terrario, las hembras capturadas fueron alimentadas con carne picada y lombrices de tierra o lombrices de compostaje, que eran depositadas diariamente en alguna de las galerías que la hembra construía en su "nuevo territorio".

Obtención de crías de topo

Las crías de topo no se pueden capturar por los métodos anteriores, ya que permanecen en el nido hasta que son púberes. Hemos utilizado dos métodos distintos para conseguir este material. El primero de ellos consistió en alojar en nuestros terrarios hembras preñadas en avanzado estado de gestación y dejarlas que parieran en el nido artificial. La cámara de vídeo permitió conocer con precisión el momento en que se produjo el parto y, en un caso, pudimos incluso grabarlo en cinta, algo que nunca antes se había logrado con este tipo de animales. Puesto que algunas hembras mostraron tendencia a devorar sus propias crías al cabo de algunos días tras el parto, hemos utilizado este método principalmente para conseguir varias camadas muy jóvenes, en las que la edad de las crías pudo ser conocida con máxima precisión.

El otro método utilizado para obtener crías de topo consistió en la localización en el campo y posterior apertura de nidos naturales de hembras lactantes. Este método tiene, a su vez, dos modalidades. En la primera de ellas, los nidos de hembras preñadas o lactantes fueron localizados mediante radio-rastreo. Las hembras preñadas fueron posteriormente recapturadas a intervalos cortos de tiempo (cada 2-3 días) para comprobar si se había producido o no el parto. Esto nos permitía estimar con cierta precisión el día del parto y, en

MATERIAL Y MÉTODOS

consecuencia, abríamos el nido para retirar las crías el día en que éstas hubiesen alcanzado la edad de nuestro interés. Las hembras lactantes fueron reconocidas mediante examen ocular de los pezones (en estas hembras están considerablemente agrandados) y por la expulsión de leche tras presionar suavemente sus glándulas mamarias. Una vez localizados sus nidos por radio-rastreo, éstos se abrían y se examinaban las crías para estimar su edad en función del tamaño, peso y morfología externa. En la segunda modalidad, los nidos fueron localizados mediante la simple observación del terreno en las alamedas. En determinadas circunstancias, es posible el reconocimiento directo de la presencia de tales nidos. Estos aparecen como un montículo de entre 10 y 30 cm de altura y entre 50 y 70 cm de diámetro, formado por tierra removida. La tierra tendrá el aspecto de estar suelta si el nido es reciente y no ha llovido desde su construcción (Fig. 3A), o fuertemente compactada y más o menos cubierto de vegetación herbácea si tiene más de un año (Fig. 3B). En el centro de ese montículo se encuentra la cámara del nido, esférica y de entre 15 y 30 cm de diámetro (Fig. 3C), de la que suelen partir tres o cuatro galerías principales que confluyen en él de forma radial. Esta cámara está siempre situada por encima del nivel habitual de inundación del terreno y, cuando contiene crías, está completamente recubierto interiormente por varias capas de hojas de álamo secas y trituradas (lo que es muy habitual en las alamedas donde hemos trabajado), o por hierba seca. Estas camas siempre estaban sorprendentemente secas, incluso tras muchos días de lluvia continuada (Fig. 3D). El aislamiento térmico que consiguen estos animales en el interior de sus nidos es tal que las crías permanecen calientes en su interior (calor que se percibe claramente en la mano cuando las crías se extraen del nido), incluso en días en los que las temperaturas en la superficie del terreno caen por debajo de los cero grados centígrados.

Estos nidos que acabamos de describir son los que habitualmente ocupan las hembras preñadas y lactantes. Sin embargo, los machos e individuos jóvenes construyen nidos mucho menos elaborados y de aspecto generalmente provisional. Su tamaño es mucho menor en volumen de tierra removida y el interior está igualmente peor equipado. Los machos hacen su cama generalmente de forma bastante descuidada y casi con cualquier material, incluidas bolsas de plástico y papeles. Esto supuso una ventaja en

Fig. 3. Nidos naturales de *T. occidentalis*.

- A)** Un nido recién construido muestra la tierra suelta y de color oscuro por estar aún húmeda.
- B)** Un nido de más de un año muestra un color similar al del resto del terreno, está fuertemente compactado y suele estar más o menos cubierto de vegetación herbácea.
- C)** El mismo nido mostrado en B ha sido abierto y presenta la cámara interior, situada en el centro del mismo y por encima del nivel habitual de inundación del terreno.
- D)** Un nido recién abierto que muestra las cuatro crías E11 que contenía, recubiertas por múltiples capas de hojas secas, que los mantienen secos y calientes.

Las barras representan 25 cm en A, B y C, y 5 cm en D.



MATERIAL Y MÉTODOS

nuestro trabajo, ya que pudimos reconocer qué nidos eran de hembras adultas y cuales no, sin necesidad de capturar el inquilino de todos los nidos que pudimos encontrar.

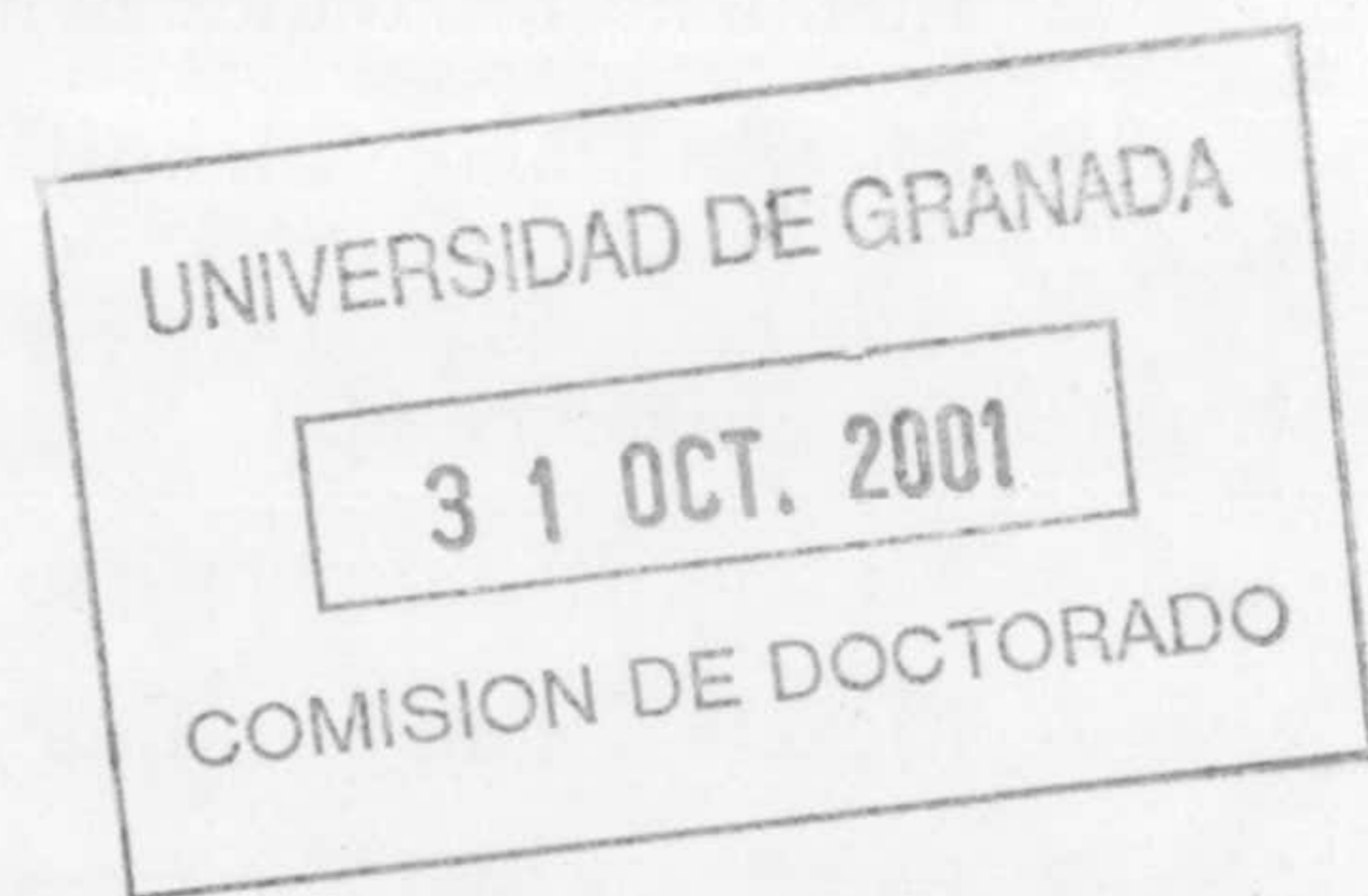
Una vez localizado un nido con crías, éstas fueron bien llevadas rápidamente al laboratorio para su análisis, o bien se volvieron a colocar en el nido, que fue cerrado de nuevo para volver a ser abierto días después. Si se hace adecuadamente, esta operación no tiene por qué perturbar a la madre, que continuará criando a sus hijos normalmente. Tanto es así, que en un caso un nido fue abierto un total de cuatro veces sin que la madre reparara en ello. La primera vez nos permitió estimar la edad de las tres crías que contenía. Las otras tres veces, separadas por intervalos de cuatro días, sirvieron para extraer una cría cada vez y poder así establecer las diferencias que acumularon los hermanos en el transcurso de ese tiempo.

Métodos histológicos

Inclusión en parafina

Una vez sacrificado mediante inhalación de cloroformo, cada animal fue pesado en una balanza y a continuación disecado para verificar su *estatus* reproductivo mediante la observación de las gónadas y demás órganos sexuales. En las hembras preñadas, los embriones o fetos fueron extraídos del útero, medidos y pesados en una balanza de precisión. Algunos de ellos fueron fijados completos y procesados tal como se describe a continuación. En otros casos, los embriones fueron disecados y sus gónadas aisladas, bien para ser procesadas por métodos histológicos y/o citológicos, bien para ser utilizadas en técnicas moleculares de expresión génica.

Fijación



MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez disecados, los embriones o sus gónadas fueron fijados en paraformaldehído al 4%⁽¹⁾, donde permanecen de 18 a 24 horas. Los testículos fueron cortados por la mitad transcurridas dos horas.

Deshidratación e inclusión.

Tras la fijación, se dan dos lavados de media hora en PBS⁽²⁾. Después se continúa con el siguiente protocolo:

1. Deshidratar las piezas en una serie de etanol-agua: 50%, 70%, 80%, 90%, 100%. Se deja 30 minutos en cada uno.
2. Etanol absoluto toda la noche.
3. Mezcla Etanol:Xileno 1:1 durante 1 hora.
4. Xileno 1 hora. En este paso se introducen las muestras en una estufa estabilizada a 60°C.
5. Mezcla Xileno:parafina 1:1 durante 1 hora a 60°C.
6. Mezcla Xileno:parafina 1:2 durante 1 hora a 60°C.
7. Parafina 12-24 horas a 60°C.
8. Parafina nueva durante 4-5 horas a 60°C.
9. Orientar las piezas en la posición deseada y construir los bloques a temperatura ambiente.

Corte de los bloques y montaje de los cortes.

Las piezas incluidas en parafina se cortaron de forma seriada (7-10 μm) en un microtomo rotativo, siguiendo el procedimiento habitual. Los cortes obtenidos fueron extendidos en un baño de agua a 40-45°C y montados en portaobjetos impregnados en TESPA⁽³⁾

MATERIAL Y MÉTODOS

Tinción con Hematoxilina y Eosina

Para realizar esta técnica hemos seguido el siguiente protocolo:

1. Desparafinar los cortes pasando las preparaciones por tres baños de Xileno de 10 minutos cada uno.
2. Rehidratar en baños sucesivos de alcoholes de 100%, 96%, 70% y 50%, durante 10 minutos cada uno.
3. Lavar en agua destilada (10 seg.).
4. Teñir con hemalumbre de Harris⁽⁴⁾ durante 4-6 min.
5. Virar el colorante mediante baño en agua corriente durante 5 min.
6. Lavar con agua destilada.
7. Teñir con eosina⁽⁵⁾ durante unos 3 min.
8. Lavar en agua destilada.
9. Deshidratar en la serie de alcoholes (50%-100%). El tiempo en cada alcohol es el mínimo posible (4-5 segundos) para evitar perder la tinción de eosina.
10. Xileno durante 1 min.
11. Montar las preparaciones en DePeX.

Inclusión en Resina

Se ha seguido el siguiente protocolo:

1. Sumergir las gónadas en fijador de Karnovsky⁽⁶⁾ durante 1 hora.
2. Lavar en PBS tres veces durante 20 minutos cada uno.
3. Fijar en OsO₄ al 1% durante dos horas.
4. Lavar en agua 3 ó 4 veces.
5. Deshidratar en etanol 70%, 15 min.
6. Deshidratar en etanol 90%, 15 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

7. Deshidratar en etanol 100%, 2x15 min.
8. Sumergir en Óxido de propileno 1h.
9. Inclusión en Epon/Araldite : óxido de propileno (1:1) 2-3 h a temperatura ambiente.
10. Poner las muestras en un molde con Epon/Araldite recién mezclado, dejar que se sumerjan y llevar a un horno para la polimerización.
11. Polimerizar a 60°C 24-48h.

Las preparaciones para microscopía electrónica fueron procesadas en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, a partir de estas inclusiones en resina, y fueron observadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10C.

Determinación del sexo de los embriones

El sexo genético de los embriones y fetos analizados fue determinado mediante el análisis de la cromatina sexual de sus células amnióticas. Para ello se realizaron preparaciones de cromatina sexual siguiendo el siguiente método, desarrollado en nuestro laboratorio (Jiménez *y col.*, 2000).

1. En el momento de extraer el embrión del útero, se toma también una pequeña muestra del amnios y se introduce directamente en fijador (metanol-ácido acético, 3:1).
2. Transcurrido un minuto, se pasa el trozo de amnios a un microtubo que contenga una gota de ácido acético al 60%. Este se agita golpeándolo suavemente con los dedos para acelerar el proceso de disgregación del tejido.
3. Al cabo de un minuto y utilizando una micropipeta, se extiende sobre un portaobjetos la suspensión celular resultante, expeliendo y recogiendo la gota de líquido en que está contenida. Esta operación se repite sucesivamente en diferentes regiones del portaobjetos, que estará colocado sobre una placa termostática estabilizada a 60°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. La preparación así realizada se puede teñir inmediatamente con azul de toluidina al 1%, cubierta con un cubreobjetos, y puede ser observada inmediatamente al microscopio.

Las células procedentes de hembras presentarán un cuerpo denso, generalmente adosado a la pared nuclear (cuerpo de Barr), que corresponde a uno de los dos cromosomas X inactivado. Las células de los machos carecerán del cuerpo de Barr (Fig. 4).

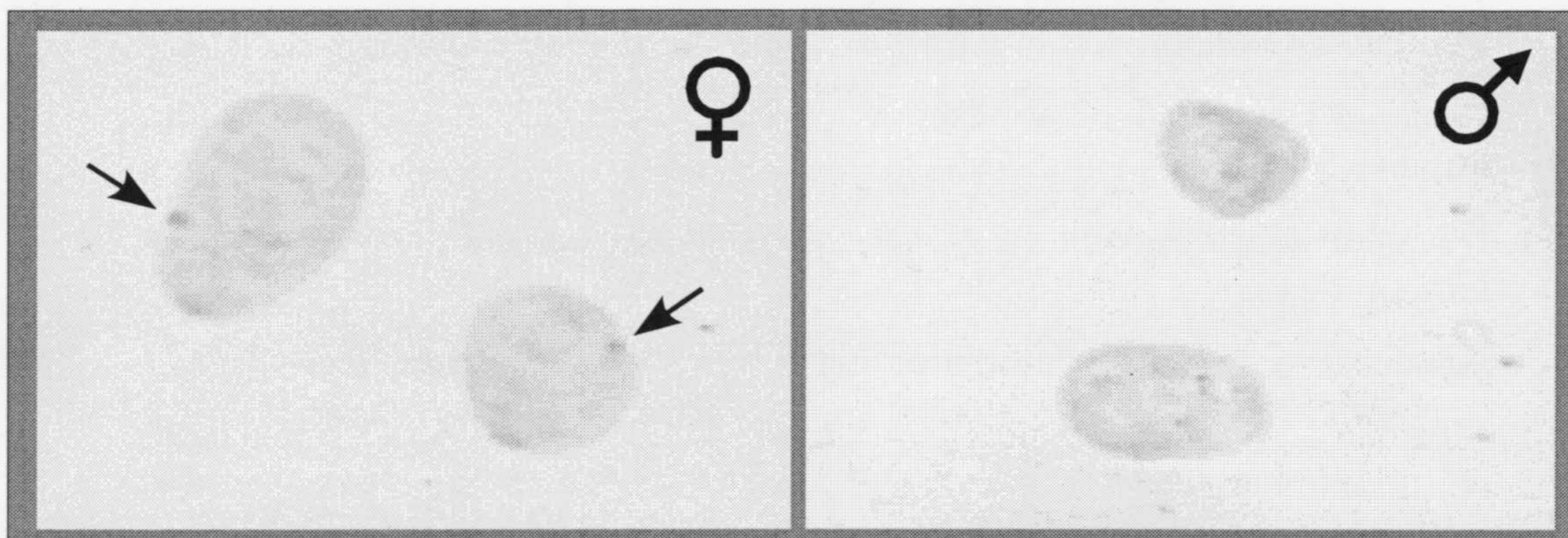


Fig. 4. Células amnióticas de embriones de *T. occidentalis* teñidas con azul de toluidina. Las flechas señalan corpúsculos de Barr en los núcleos de las células de un embrión hembra.

Este método hubo de ser utilizado para determinar el sexo genético de todos los embriones y fetos que, por su corta edad de desarrollo, no podían ser sexados en función de las características morfológicas de sus gónadas. Aunque la diferenciación gonadal de *Talpa occidentalis* ocurre entre los estadios E5a y E5b de su desarrollo (ver el capítulo de Resultados), no es posible diferenciar visualmente y de manera inequívoca las gónadas masculinas de las femeninas en individuos que se encuentren en estadios anteriores a E7.

Métodos de análisis genético molecular

Clonación de fragmentos génicos

Extracción de ADN

MATERIAL Y MÉTODOS

El ADN se extrajo siguiendo el método descrito por Sambrook *y col.*, (1989) con algunas modificaciones. Como material de partida se usaron células en suspensión obtenidas a partir de ganglios linfáticos y bazo de topo. El protocolo es el siguiente:

1. Homogenizar el tejido en PBS, dejando sedimentar los fragmentos más gruesos.
2. Centrifugar el sobrenadante a 1000 r.p.m. durante 10 minutos.
3. Lavar el precipitado 2 veces más en PBS, centrifugando a 1000 r.p.m. durante 10 minutos cada vez.
4. Decantar el sobrenadante, y resuspensión de las células en 4 ml de tampón de extracción⁽⁷⁾.
5. Añadir 50 µl de solución de proteinasa K⁽⁸⁾ y 4ml de tampón de lisis⁽⁹⁾.
6. Mezclar suavemente e incubar durante 5-12 horas a 56°C, mezclando ocasionalmente.
7. Añadir 100 µl de una solución de ARNasa⁽¹⁰⁾ e incubar a 37° durante 3 horas.
8. Tras añadir un volumen igual de fenol, mezclar y centrifugar a 14000 r.p.m. durante 10 minutos. La fase acuosa, que es la superior y es donde se encuentra el ADN, se pasa a un tubo nuevo.
9. Realizar otras dos extracciones, la primera con una mezcla de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (25:24: 1), y la segunda con una mezcla de cloroformo : isoamílico (24:1). En ambas extracciones se añade un volumen igual al de muestra.
10. Transferir el ADN a un tubo en hielo, y añadir 200 µl de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C.
11. Mezclar suavemente e incubar en hielo durante 30 min.
12. Recoger el ADN enrollándolo en una pipeta Pasteur con la punta sellada por calor.
13. Lavar en etanol al 70% a -20°C.
14. Secar y resuspender en H₂O.
15. Las muestras de ADN se almacenan 4°C.

Diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR

MATERIAL Y MÉTODOS

Para hacer estudios de expresión mediante RT-PCR se diseñaron tres parejas de oligonucleótidos correspondientes a cada uno de los genes de nuestro estudio: *SRY*, *DAX-1* y *SOX-9*. Para el diseño y estimación de la temperatura de hibridación de los cebadores se usó el programa informático *Oligo versión 4.1* (Rychlik, 1989; Rychlik y Rhoads, 1989). Los oligonucleótidos para el gen *SRY* de topo se diseñaron a partir de un fragmento de su caja HMG, que había sido clonado previamente en nuestro laboratorio (GeneBank X90843; Sánchez y col., 1996). En cambio, el diseño de los oligonucleótidos para los genes *DAX-1* y *SOX-9* se realizó alineando las secuencias de estos genes en humano, ratón y cerdo, obtenidas en las bases de datos del EMBL. Se eligieron dos oligonucleótidos procurando un alto grado de conservación en los extremos 3'. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

SRY

SRYS1: 5'-TCT CTG TGC GCT GCC TGT AGT C-3'

Los 8 primeros nucleótidos del extremo 5' corresponden a los 8 últimos nucleótidos del oligonucleótido antisentido empleado por Sánchez y col., (1996) para amplificar la caja HMG de *T. occidentalis*, mientras que los 14 nucleótidos del extremo 3' corresponden a las posiciones 145-159 de esta caja HMG (GenBank X90843).

SRYS5: 5'-GGC GCA AGG TGG CTC TAG AGA A-3'

Se corresponde con las posiciones 25-46 de la caja HMG de *T. occidentalis* (GenBank X90843).

El tamaño esperado del fragmento amplificado con estos oligonucleótidos es de 143 pb, y la temperatura de hibridación propuesta es de 55°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

DAX1

DAX1SP2: 5'-TGC CTC GCA GAC CAC CTG TGG A-3'

Corresponde a los nucleótidos 984 a 1005 de la secuencia del gen humano publicada por Zanaria *y col.*, (1994), que incluye los 10 últimos nucleótidos de la cuarta y última repetición del dominio de unión al ADN (DBD), así como los 12 primeros nucleótidos del dominio de unión al ligando (LBD) de este gen.

DAX1SP5: 5'-CGG GCC ACG GCG CTT CTG TAC C-3'

Corresponde a los nucleótidos 805 a 826 de la secuencia del gen humano publicada por Zanaria *y col.*, (1994). El extremo 3' de este oligonucleótido se encuentra a 9 nucleótidos (contados hacia el extremo 5') del extremo 3' de la tercera repetición del DBD.

El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 201 pb. La temperatura de teórica de hibridación de los cebadores es de 55°C. No obstante se probaron un rango de temperaturas desde 55°C hasta 68°C.

SOX9

Se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos diferentes, una de ellas para la amplificación de un fragmento del primer exón, entre los nucleótidos 249 a 535, y otro fragmento del segundo exón, entre los nucleótidos 730 a 751 de la secuencia XM 039095 de Genbank. La primera pareja de oligonucleótidos fué la siguiente:

SOX9S: 5'-TCATGAAGATGACCGACGAGC-3'

MATERIAL Y MÉTODOS

Corresponde a los nucleótidos 249 a 269.

SOX9AS: 5'-CTTGTTCTTGCTGGAGCCGTT-3'

Corresponde a los nucleótidos 515 a 535.

El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 287 pb, y la temperatura de hibridación teórica de los cebadores es de 55°C.

La segunda pareja de oligonucleótidos fue la siguiente:

SOX9SP1: 5'- AGT GCT CGC CGG GGG AGT GCA C -3'

que corresponde a los nucleótidos 730 a 751.

SOX9SP5: 5'-GGA CCA CCC GGA TTA CAA GTA C-3

Corresponde a los nucleótidos 890 a 911.

El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 182 pb, y la temperatura de hibridación teórica de los cebadores es de 55°C.

β-Actina

MATERIAL Y MÉTODOS

Este gen se ha utilizado para controlar el buen estado de las muestras de ARN usadas en los estudios de expresión (ver mas abajo). Los oligonucleótidos empleados para su amplificación fueron los publicados por Kent *y col.* (1996):

ACT1: 5'-TGGATGATGATATTGCTGC-3'

Que corresponde a las posiciones 1544 a 1562 de la secuencia X00182 (GeneBank).

ACT2: 5'-ATCTTCTCCATATCATCCCA-5'

Que corresponde a las posiciones 2097 a 2116 de esa misma secuencia.

El tamaño esperado del fragmento amplificado es de 573 pb si se usa como molde ADN genómico, y de 253 pb si se parte de ARNm, ya que existe entre ambos oligonucleótidos un intrón de 320 pb, desde la posición 1666 hasta la 1985 y la temperatura de hibridación teórica de los cebadores es de 55°C.

Amplificación por PCR

Para llevar a cabo reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se preparó la siguiente mezcla de componentes:

ADN genómico.....0.1 µg
Oligonucleótidos.....0.5 µM de cada uno
DNTPs.....0.2 mM de cada uno
Tampón 10X.....5.0 µl

MATERIAL Y MÉTODOS

Taq Polimerasa.....2.0 Unidades

H₂O.....hasta 50 µl

Para la amplificación se usó ADN de macho de *T. occidetalis*. Mediante el programa *Oligo 4.1* se obtuvo una temperatura de hibridación teórica, aunque la temperatura definitiva fue determinada empíricamente. Los ciclos de temperatura que se usaron fueron los siguientes:

1 ciclo : [94°C, 5 min.]

40 ciclos: [94°C, 30 seg.] [XX°C, 30 seg.] [74°C, 30 seg.]

1 ciclo : [74°C, 7min]

Donde XX°C representa la temperatura óptima para cada pareja de oligonucleótidos, según se ha ido especificando anteriormente.

Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, y extraídos del gel usando el "Agarose Gel DNA Extraction Kit" de Roche, según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de sílice en condiciones de elevada fuerza iónica, tras la solubilización de la agarosa con sales caotrópicas. Posteriormente esta matriz se lava varias veces para finalmente eluir el ADN con H₂O estéril.

Clonación de productos de PCR

Preparación del vector

Para la clonación de productos de PCR se usó el vector *PGEM-T* de Promega ("*PGEM vector T System I*"). Este vector presenta extremos protuberantes en 3' en los que

MATERIAL Y MÉTODOS

hay dT (ó ddT), lo que permite su ligado con los productos de PCR obtenidos con polimerasa *Taq*, que deja extremos protuberantes en 3' en los que suele encontrarse un dA. Además confiere resistencia a la ampicilina y permite seleccionar las bacterias recombinantes en medios con IPTG y X-gal usando una cepa bacteriana hospedadora adecuada. Para esta finalidad se usó la cepa *XL1-Blue MRF'* de *E. coli*.

Ligado del ADN con el vector

El ligado se llevó a cabo poniendo una proporción 2:1 de pÁsmido y producto de PCR purificado (inserto), en presencia de la ligasa del fago *T4* (Roche). Para un volumen final de 10 µl de reacción, la mezcla contenía los siguientes componentes y fue incubada a 22° C durante 6-12 horas:

- 7 µl de solución de inserto a una concentración adecuada
- 1 µl de vector T (concentración dependiente de la relación molar)
- 1 µl de tampón de ligasa 10 X
- 1 µl de ligasa de T4 (1 U/µl)

Preparación de bacterias competentes

La cepa *XL1-Blue MRF'* se preparó según el siguiente protocolo:

1. Sembrar una placa de medio mínimo M9⁽¹¹⁾ con *XL1-Blue MRF'* procedente de un stock de glicerol, incubarla toda la noche, aislar una colonia y sembrar con ella 5 ml de medio LB líquido⁽¹²⁾. Este nuevo cultivo se incubará a 37°C durante toda la noche en un baño con agitación.
2. Inocular 40 ml de medio LB líquido con 0.4 ml del cultivo anterior, e incubar a 37°C en un baño con agitación. La D. 0. a 540 nm se irá midiendo periódicamente hasta que alcance un valor comprendido entre 0.4 y 0.6.
3. Enfriar el cultivo en hielo y centrifugar a 4000 r.p.m. a 4°C, durante 10 min.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. Resuspender el precipitado en 20 ml de una solución estéril y fría de CaCl_2 50 mM.
5. Incubar 30 min. en hielo.
6. Centrifugar como en el paso 3.
7. Resuspender el sobrenadante en 4 ml de la solución CaCl_2 50mM.
8. Incubar en hielo durante varias horas antes de usar las bacterias. Estas bacterias competentes se pueden almacenar en glicerol (solución estéril de glicerol y CaCl_2 (glicerol al 15% (v/v); CaCl_2 50 mM). Una vez suspendidas se alicuotan y se almacenan a -70°C . Hay que tener en cuenta que puede disminuir la eficiencia de transformación de bacterias almacenadas a -70°C .

Transformación de bacterias competentes

Una vez preparadas las bacterias competentes de la cepa *XL1-Blue MRF'*, se procedió de la siguiente forma para su transformación con el producto del ligado:

1. Colocar 200 μl de una suspensión de bacterias competentes en un tubo Eppendorf y añadir 2 μl de la mezcla de ligado.
2. Incubar 30 min. en hielo.
3. Incubar 40 segundos a 42°C y pasar las bacterias rápidamente a hielo, donde permanecerán 3min.
4. Añadir 1 ml de medio LB líquido e incubar 1 hora a 37°C .
5. Sembrar alícuotas de 100 μl de las bacterias transformadas en placas con medio LB sólido⁽¹³⁾ con ampicilina (concentración final: 10 mg/ml), IPTG (isopropil-P-D-tiogalactosido, 0.05 mM) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D- galactopiranosido, 0.004% en dimetilformamida).
6. La presencia de colonias transformadas con plásmidos recombinantes se puede verificar directamente en las placas, ya que tendrán color blanco. Las colonias de color azul se corresponden con bacterias transformadas con plásmidos no recombinantes.

Análisis de los transformantes positivos

MATERIAL Y MÉTODOS

La presencia de inserto en los plásmidos procedentes de clones positivos se verificó mediante digestión con enzimas de restricción con dianas situadas en el "polilinker" o sitio de multiclonación del vector a ambos lados del inserto, y posterior análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

Secuenciación del ADN

Los clones positivos seleccionados para esta finalidad fueron secuenciados en el servicio de secuenciación de ácidos nucleicos de "SistemasGenómicos" (www.sistemasgenomicos.com)

Estudios de expresión

Extracción de ARNm

Los estudios de expresión se realizaron en gónadas de embriones, fetos y crías de topo. Dada la poca disponibilidad de material para realizar este tipo de estudios puesto que las gónadas de embriones, fetos y crías de topos son escasas y muy difíciles y costosas de conseguir, nos vimos obligados a diseñar un protocolo para su manipulación que nos permitiera el máximo aprovechamiento de este material tan valioso. Las gónadas se extrajeron mediante microdissección bajo una lupa binocular cuando se trataba de individuos de escaso tamaño (embriones, fetos y crías pequeñas), o mediante la disección común de las crías de mayor edad. Una vez aisladas, las gónadas fueron maceradas hasta ser reducidas a una fina pasta, con la ayuda de dos pequeños trozos de vidrio (5x15 mm). Estos vidrios fueron obtenidos cortando portaobjetos convencionales, que previamente habían sido sumergidos durante 10 min en H₂O₂ al 3% y secados a la llama tras ser enjuagados en metanol. Este tratamiento elimina la contaminación de ARNasa que eventualmente pudiese tener el vidrio. Ejerciendo presión y deslizando entre sí ambos trozos de vidrio tras haber atrapado entre ellos la gónada a macerar, se podía conseguir una buena homogenización de la misma. Para evitar que se formara una pasta demasiado seca,

MATERIAL Y MÉTODOS

durante el proceso se añadieron 2-4 ml de agua ultrapura estéril. A continuación se procedió a la extracción del ARNm con el "mRNA Capture Kit" de Roche. El primer paso de este método consiste en disolver el homogenado de tejido en tampón de lisis. Para ello y con el fin de desperdiciar la mínima cantidad posible del homogenado, los dos trozos de vidrio sobre los que se encuentra se introducen en un criotubo de 2 ml. El criotubo es agitado vigorosamente en un vortex y centrifugado durante 3 min a 14000 rpm para eliminar la espuma se que habrá formado. A continuación los dos trozos de vidrio son extraídos del tubo con una pinzas rectas flameadas previamente. Estos tubos pueden ser almacenados indefinidamente en N₂ líquido hasta su uso en el protocolo de extracción de ARNm.

Una vez que tuvimos los homogenados de todos los individuos que iban a ser analizados, estos fueron clasificados según el estadio de desarrollo al que pertenecían. Con estos datos construimos dos series de muestras, tanto para machos como para hembras. Cada serie de machos está constituida por un total de 14 criotubos, cada uno de los cuales corresponde a un estadio de desarrollo distinto, desde E4 hasta E15 (ver el capítulo de resultados) y está compuesto por la suma del material de un mínimo de dos individuos (excepto para E4, del que solo dispusimos de dos individuos que fueron usados uno en cada serie). Cada serie de hembras está constituida a su vez por un total de 20 tubos, también correspondientes a distintos estadios de desarrollo, aunque desde E10 hasta E15 existen dos tubos por estadio, uno de los cuales contiene material de la porción ovárica del ovoteste, mientras que el otro contiene material de la porción testicular del mismo. Como en el caso de la serie de machos, aquí también se sumó el material de varios individuos del mismo estadio. Todos los estudios de expresión génica por RT-PCR (ver más abajo) se realizaron por duplicado, utilizando una serie de muestras distinta cada vez.

El protocolo de purificación de ARNm continúa con la adición de una "sonda de captura", que consiste en un oligo(dT)₂₀ unido a biotina, a un volumen de homogenado diluido en tampón de lisis fresco, hasta alcanzar un volumen de 25 ml. Una vez que la cola 3'-Poli(A) del ARNm se une a la sonda de captura, se traslada el homogenado a un tubo de 0,2 ml que tiene las paredes recubiertas de estreptavidina, donde se produce la unión biotina-estreptavidina, quedando, por lo tanto, el ARNm unido a las paredes del tubo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Después, los tubos se lavan tres veces con un tampón de lavado, con lo que, entre otras impurezas, se elimina el ADN genómico.

RT-PCR

Para los estudios de expresión de cada uno de los diferentes genes analizados se realizaron reacciones de transcripción inversa, seguidas de una PCR (RT-PCR). Estas dos reacciones pueden tener lugar sucesivamente en el mismo tubo donde se produjo la extracción del ARNm. Para ello se utiliza una mezcla de enzimas (Titan One Tube RT-PCR System de Roche) que contiene la transcriptasa inversa AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase) y la Taq-polimerasa. Al realizarse las dos reacciones en el mismo tubo y de forma secuencial, el oligonucleótido anti-sentido del gen que queremos estudiar sirve de cebador de la transcripción inversa, además de ser uno de los nucleótidos necesarios para la PCR. Para llevar a cabo cada reacción se preparó la siguiente mezcla, para un volumen final de 25 μ l:

Mezcla nucleótidos (10 mM).....	0.5 μ l
Oligo Sentido (10mM).....	1.0 μ l
Oligo Antisentido (10mM).....	1.0 μ l
Mezcla de enzimas.....	0.5 μ l
5 X buffer.....	5.0 μ l
DTT (100 mM).....	1.25 μ l
H ₂ O.....	15.75 μ l

Cada vez que realizamos una serie de reacciones de RT-PCR para estudiar el perfil de expresión de un gen determinado a lo largo del desarrollo gonadal de *T. occidentalis*, también llevamos a cabo, paralelamente, otra serie de reacciones con las mismas muestras, en las que comprobamos la expresión del gen de la β -actina. Puesto que se trata de un gen "housekeeping", que se expresa en todas las células vivas, esto sirve como control positivo del buen estado de las muestras y permite además estimar los niveles

MATERIAL Y MÉTODOS

de expresión del gen problema, por comparación con la intensidad de los fragmentos amplificados de β -actina. Adicionalmente, cada serie de reacciones de RT-PCR se completó con un control negativo en el que omitía la presencia de muestra de ARNm, y un control positivo en que, como muestra, se ponía ADN genómico en lugar de ARNm.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS

(1) Paraformaldehído al 4%.

Para 1 litro:

1. Poner a calentar unos 600 ml de H₂O destilada en un matraz.
2. Cuando la temperatura oscile entre 55-60°C, añadir 40 g de paraformaldehído y agitar vigorosamente usando un agitador magnético.
3. Añadir 5-6 gotas de NaOH 1N
4. Cuando la disolución este transparente, añadir 100 ml de PBS 10X.
5. Filtrar
6. Ajustar el PH a 7.4
7. Enrasar hasta 1 l con H₂O destilada y autoclavar.

(2) PBS

Para 1 LITRO:

1. Pesar los siguientes componentes:
 - NaCl 8 g.
 - KCl 0.2 g.
 - Na₂HPO₄ 1.44 g.
 - KH₂PO₄ 0.24 g.
2. Disolverlos sucesivamente en 1 l de agua destilada.
3. Ajustar el PH a 7.4 y autoclavar.

Alternativamente, se puede preparar esta solución diluyendo 100 ml de PBS 10× hasta un volumen final de 1 l. El PBS 10× se prepara de igual manera que se ha descrito arriba, pero multiplicando por diez las cantidades de cada una de las sales.

(3) Portas con TESPА (3-aminopropiltriethoxi-xilano)

1. Desengrasar perfectamente los portaobjetos conservándolos en una solución de CIH al 10% y etanol 70%.
2. Llenar con estos portaobjetos varios cestillos de vidrio, enjuagarlos profusamente con agua destilada y dejarlos secar en una estufa a unos 40°C.
3. Sumergir los portaobjetos en una solución de TESPА al 2% en acetona durante 40 segundos.
4. Pasarlos brevemente por dos cubetas con acetona y dejarlos 10 minutos en una tercera con agua destilada.
5. Dejarlos secar a 37°C durante toda la noche y guardarlos en cajas cerradas.

(4) Hemalumbre de Harris.

1. Preparar por separado las siguientes soluciones:
 - 2 g. de hematoxilina en 20 ml. de etanol absoluto.
 - 40 g. de alumbre potásico (sulfato de Al y K) en 400 ml. de H₂O destilada.
2. Mezclar ambas soluciones transcurridas 24 horas, añadiendo 1 g. de HgO.
3. Calentar la solución y dejarla enfriar.
4. Filtrar y conservar en una botella de vidrio ámbar.

(5) Colorante de Eosina.

1. Disolver 4.5 g de Eosina en 450 ml de H₂O.
2. Añadir 4 gotas de ácido acético glacial.
3. Filtrar y conservar en una botella de vidrio ámbar.

(6) Karnowsky

Para 5 ml:

1. 1.25 ml de Paraformaldehído al 4%
2. 1.25 ml de cacodilato sódico 4M pH=7.3-7.4
3. 0.5 ml de glutaraldehído 25%
4. 1 ml de CaCl₂ 0.25%
5. 1 ml H₂O

(7) Tampon de extracción

La solución contiene los siguientes componentes:

1. Tris-HCl 10mM pH=7.5
2. NaCl 10mM
3. EDTA 2mM

(8) Solución de proteinasa K.

Disolver 100 mg de proteinasa K en 10 ml. de H₂O desionizada esteril.

(9) Tampón de lisis.

La solución contiene los siguientes componentes:

1. 10 mM Tris-HCl pH=7.5
2. 10 mM NaCl
3. 2mM EDTA
4. 5% SDS.

(10) Solución de ARNasa libre de ADNasa:

1. Preparar la siguiente solución:
 - 10 mM Tris-HCl pH=7.5
 - 15 mM NaCl.
2. Disolver ARNasa A a una concentración de 10 mg/ml en la solución anterior.
3. Calentar la solución a 100°C durante 15 min. para inactivar las ADNasas.
4. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

(11) Placas con medio mínimo M9.

1. Preparar por separado y esterilizar por autoclavado cada uno de los siguientes componentes para 500 ml de medio:
 - 450 ml de agua desionizada con 7.5 g de bacto-agar.
 - 50 ml de solución salina M9, compuesta por:
 - ◆ 60g de Na_2HPO_4
 - ◆ 30g de KH_2PO_4
 - ◆ 10 g de NH_4Cl
 - ◆ 5g de NaCl
 - ◆ Enrasar a 1 litro con H_2O desionizada.
 - 0.5 ml de solución 1M de MgSO_4 .
 - 0.05 ml de solución 1M de CaCl_2 .
 - 2.5 ml de solución de vitamina B1 (1 mg/ml), esterilizada por filtración
 - 5 ml de solución estéril de glucosa al 20%.
2. Mezclar todos los componentes en condiciones de esterilidad cuando se hayan enfriado a unos 50°C.

(12) Medio LB (Medio Luria-Bertani).

3. Mezclar los siguientes componentes:
 - 10g de bacto-triptona.
 - 5g de extracto de levaduras.
 - 10g de NaCl
 - 950 ml. de H₂O.
4. Ajustar el PH a 7.0 con NaOH 5N y completar el volumen hasta 1l.
5. Autoclavar.

(13) Medio LB sólido

1. 1000 ml LB líquido
2. 15 g agar
3. Autoclavar
4. Enfriar hasta 50°C aproximadamente
5. Añadir antibióticos si es necesario
6. Repartir en placas de petri



RESULTADOS



RESULTADOS

DESARROLLO CORPORAL DE *T. occidentalis*. DEFINICIÓN DE ESTADIOS Y ESTABLECIMIENTO DE LOS CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

Puesto que no existía ningún estudio previo en el que se describiera el desarrollo completo de los topos, una de las primeras tareas que hubimos de realizar en este trabajo fue la definición de un número suficiente de estadios de desarrollo, y el establecimiento de unos criterios claros de clasificación. Esto nos permitiría asignar un estadio concreto a cada individuo a analizar y, en consecuencia, su ubicación correcta dentro de un orden cronológico. En 1977, Sterba perfiló el desarrollo prenatal de tres especies de insectívoros, una de las cuales era *Talpa europaea*. Basándose en una serie de parámetros morfométricos y en el aspecto externo y la morfología de una serie de caracteres macroscópicos, este autor definió un total de 9 estadios prenatales de desarrollo para esta especie. Ya que *Talpa europaea* es morfológicamente muy similar a *T. occidentalis*, hemos adoptados los criterios de clasificación de Sterba como base para establecer los estadios prenatales del desarrollo de esta última especie. Sin embargo, puesto que los topos de *T. europaea* son significativamente más grandes que los de *T. occidentalis*, el nacimiento ocurre en esta especie cuando los fetos se encuentran en el estadio prenatal 9 de *T. europaea*. En consecuencia, nosotros proponemos un total de 8 estadios prenatales en el desarrollo de *T. occidentalis* pero, teniendo en cuenta el objetivo del nuestro trabajo, sólo vamos a considerar aquellos estadios en los cuales el embrión o feto ya posee estructuras gonadales, esto es desde E4 hasta E8 (Tabla II; Fig. 5). Los criterios de clasificación se basan en la medida y observación de una serie de caracteres tales como la longitud CRL ("Crown-Rump Length", o longitud corona-grupa), el peso del embrión, la presencia o ausencia de uñas en las manos o pelo en la piel o el hocico, la orientación del plano de las manos y la forma de la cabeza, entre otros.

RESULTADOS

Hasta la fecha, no se había estudiado el desarrollo postnatal de ninguna especie de topo, por lo que hemos definido nuevos estadios y establecido los correspondientes criterios de clasificación para la especie *T. occidentalis* (Tabla II). Tal como muestra esta tabla, hemos definido un nuevo estadio de desarrollo postnatal por cada cinco días de vida post-parto (dpp), de tal manera que los topos recién nacidos pertenecen al estadio E9 (el último estadio de desarrollo prenatal definido por Sterba), mientras que las crías que ya han terminado su crecimiento y, por tanto, son morfológicamente similares a los topos adultos pertenecerían al estadio E15 (Figs. 6 y 7)

Además, el estadio E5 ha sido subdividido a su vez en otros tres estadios (E5a-E5c) para permitir un análisis cronológico más preciso de este periodo, dado que durante el mismo tienen lugar numerosos e importantes acontecimientos en el desarrollo de las gónadas. Entre estos eventos está, por ejemplo, la diferenciación gonadal y, en consecuencia, el inicio del desarrollo testicular en los machos y del desarrollo de los ovotestes en las hembras. De manera similar, el estadio E15 se ha subdividido en otros dos (E15a y E15b), para diferenciar los juveniles que aún permanecen en el nido y cuya edad oscila alrededor de un mes (E15a), de los juveniles independientes, ya emancipados tras el destete (E15b). La edad de estos últimos puede oscilar entre poco más de un mes para los recién emancipados, y hasta ocho meses para los juveniles prepuberales que nacieron en las primeras camadas del año anterior.

La estimación de la edad que corresponde a cada estadio se ha basado en parte en los datos proporcionados por Sterba para la especie *T. europaea* y, principalmente, en nuestras propias observaciones. Así, la estimación precisa, mediante palpación abdominal de la madre, del tamaño de los embriones y fetos cuya gestación se permitió que llegara a término, nos facilitó los datos necesarios para corroborar o corregir, para *T. occidentalis*, las estimaciones de edad proporcionadas por Sterba para *T. europaea*. Además, el análisis de un buen número de crías de *T. occidentalis* de las que se pudo conocer exacta o muy aproximadamente el día de su nacimiento, nos ha permitido también establecer unos criterios de clasificación bastante precisos para los estadios de desarrollo postnatal.

Estos hechos nos han permitido además estimar la edad de otro buen número de embriones, fetos y crías de los que no conocíamos su edad cuando fueron capturados. Para

Estadio	CRL (mm)	Peso (g)	Edad	Características morfológicas externas.
E4	6-9.5	0.05-0.08	14-16 dpc	Ojo pigmentado. Extremidades anteriores aplanadas.
E5	E5a	9.5-11.5	17 dpc	Palmas de las manos identificables. Los dedos no están marcados. Hocico corto.
	E5b	10.5-12	18 dpc	Inicio de la formación de los dedos. Folículos pilosos de las vibrisas del labio superior presentes.
	E5c	12-15	19 dpc	Pabellones auditivos. Hocico alargado. Dedos de las manos marcados.
E6	15-18.5	0.45-0.6	19-21 dpc	Folículos pilosos presentes por todo el cuerpo. Dedos separados.
E7	18.5-25	0.6-1	21-23 dpc	Párpados fusionados. Reposición de la hernia umbilical.
E8	25-29	1-3	24-27 dpc	Piel aun no arrugada. Columna cervical y dorsal recta.
E9 Neonatos	29-45	3-5	0-3 dpp	Color del cuerpo rojizo. Sin pelo.
E10	45-60	5-15	3-7 dpp	Color más rosado y sin pelo. La piel comienza a arrugarse.. Uñas de las manos prominentes.
E11	60-70	15-20	7-12 dpp	Color rosa intenso. Piel muy arrugada. Pelo en crecimiento por todo el cuerpo. Gran diámetro corporal.
E12	60-75	17-27	12-17 dpp	Pelo corto por todo el cuerpo, muy brillante. Las manos y sus uñas son casi tan grandes como las de un adulto. Menor diámetro corporal que en E11. Color gris-ceniza.
E13	70-85	25-36	17-22 dpp	Pelo muy denso, aún paralelo a la piel. Hocico muy largo (más que en los juveniles).
E14	80-95	28-46	22-27 dpp	Similares al estadio anterior, con pelo perpendicular a la piel y aun en el nido. Alimentación exclusivamente láctea. No salen del nido.
E15	E15a	85-110	27-33 dpp	Aspecto similar al de un adulto. Viven en el nido materno, aunque salen del mismo. Alimentación probablemente mixta. Respuesta no agresiva a la manipulación.
	E15b	85-110	30-240dpp	Aspecto similar al de un adulto. Emancipados tras el destete. Con nido propio. Alimentación exclusivamente insectívora. Respuesta agresiva a la manipulación..

Tabla II. Criterios de clasificación de los diferentes estadios de *T. occidentalis*.
(dpc=días post-coito; dpp=días post-parto).

Fig. 5. Desarrollo prenatal y desarrollo postnatal temprano (E9-E11) de *Talpa occidentalis*.
Los distintos estadios representados se indican en las correspondientes figuras. Las barras representan 5 mm en E5a-E8 y 10 mm en E9-E11.

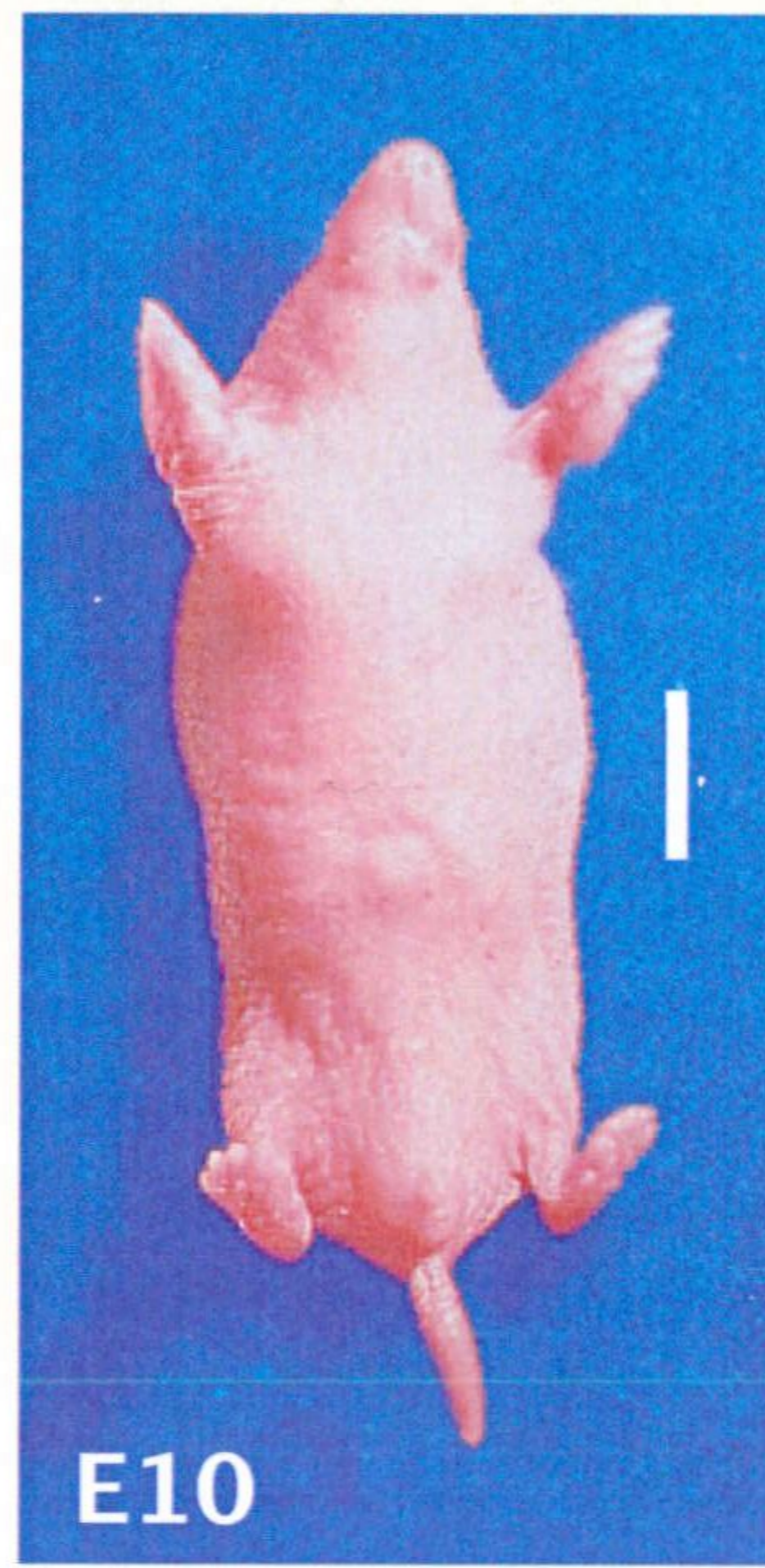
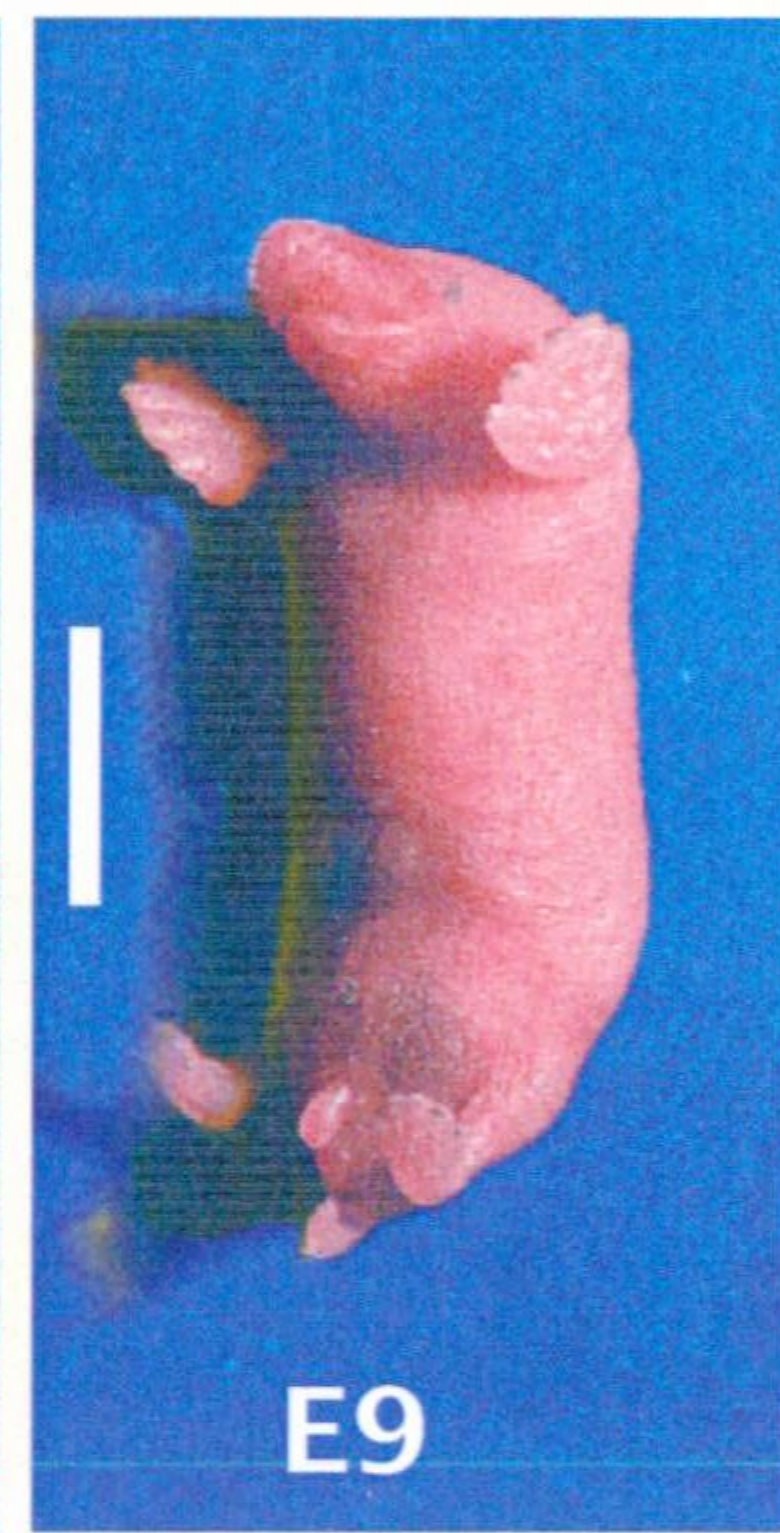


Fig. 6. Desarrollo postnatal desde E12 hasta E14 en *Talpa occidentalis*. Los distintos estadios representados se indican en las correspondientes figuras. La flecha en E14 señala el pliegue de piel que recubre parcialmente la cara dorsal de la base de la cola. Las barras representan 10 mm.

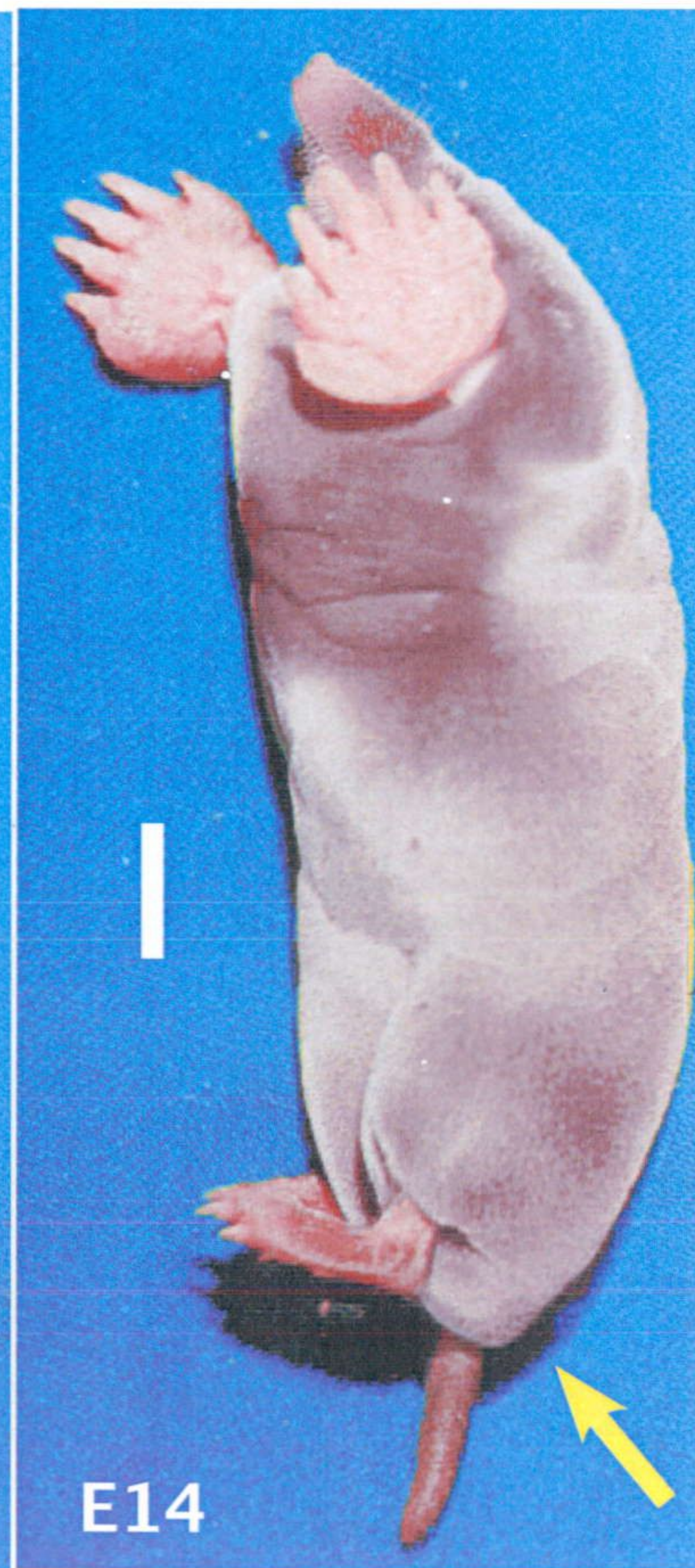
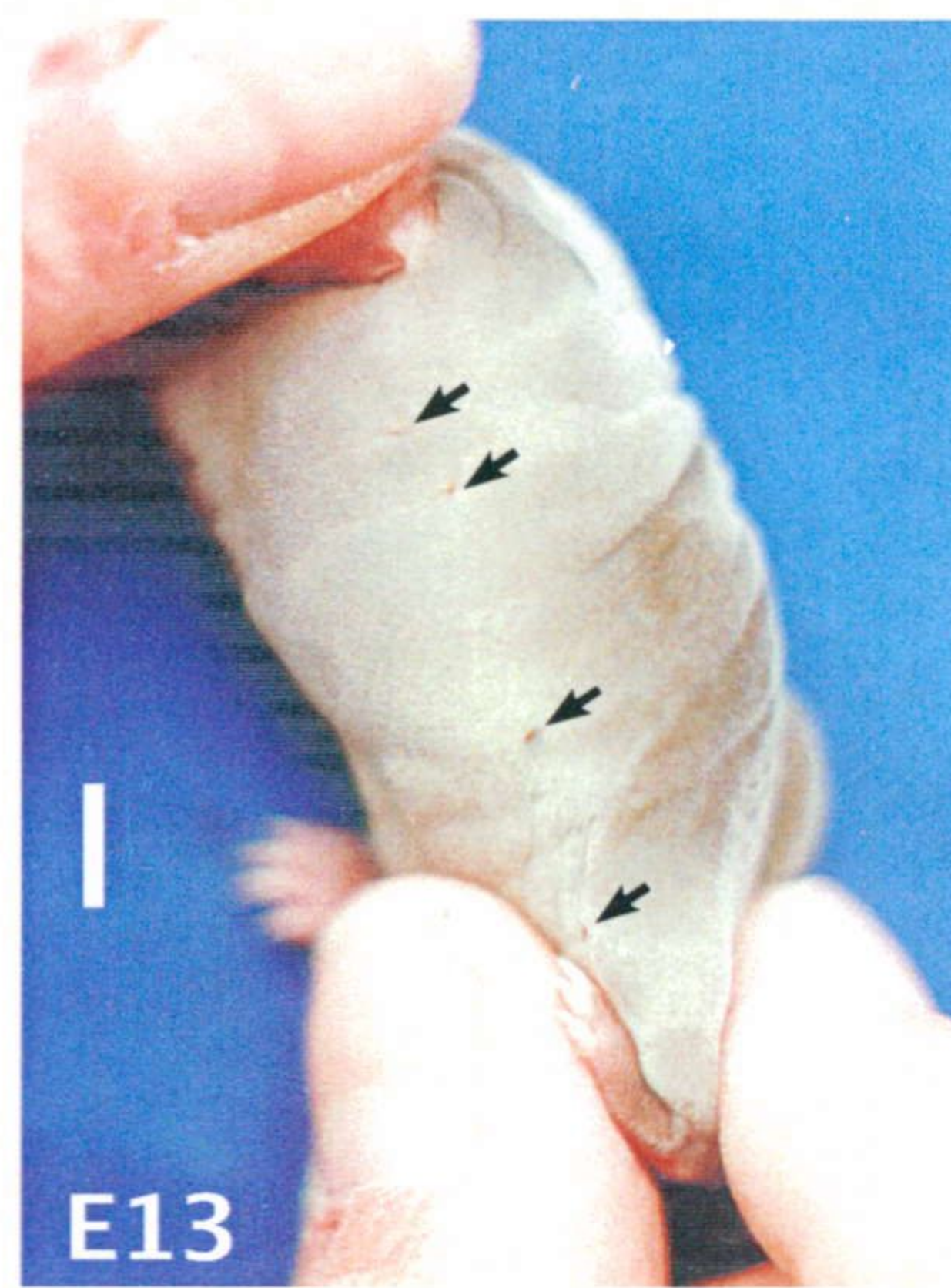
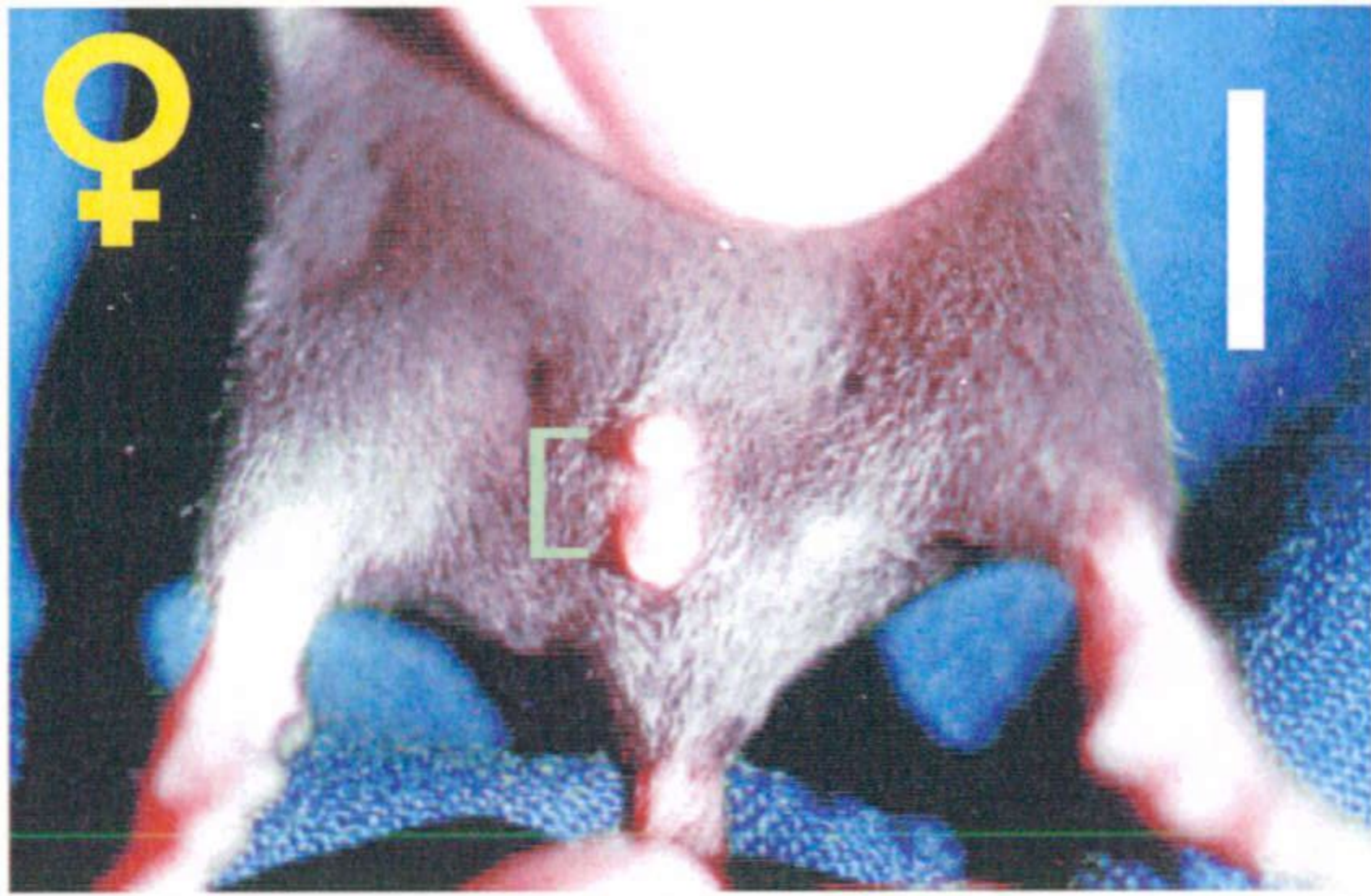


Fig. 7. Desarrollo juvenil (E15b) y aspecto de los genitales en adultos hembra y macho de *Talpa occidentalis*. En E15b la flecha señala la ausencia del pliegue de piel descrito para E14 (Fig. 6). Los corchetes verdes indican la diferencia entre hembras y machos en cuanto a la distancia que separa el ano (abajo) del clítoris o el pene (arriba). Las barras representan 10 mm.



RESULTADOS

ello, además de los datos morfológicos recogidos en la tabla II, resultó especialmente útil el análisis estadístico que hemos realizado con los datos numéricos de peso y longitud CRL, medidos en todos los individuos analizados. Estos resultados se resumen en las curvas de crecimiento que se muestran en la figura 8. La curva de la figura 8A, realizada a partir de nuestros datos prenatales y los proporcionados por Sterba (1977), demuestra que la tasa de crecimiento (incremento de peso) de *T. europaea* es mayor que la de *T. occidentalis*, principalmente al final del periodo de gestación, a pesar de que ésta tiene una duración muy similar en ambas especies [estimada en 29 días para *T. europaea* (Sterba, 1977) y 28 días para *T. occidentalis* (presente estudio)]. Por esta razón, y tal como se indicó anteriormente, las crías de aquella especie nacen en un estadio de desarrollo más avanzado (próximo a E10) que las de ésta (E9). La figura 8B muestra la curva correspondiente al análisis de correlación exponencial existente entre el peso y la longitud CRL de los embriones, fetos y crías de todos los estadios analizados, desde E4 hasta E15, para la especie *T. occidentalis*. El buen ajuste de esta correlación ($R=0,9978$) demuestra que cualquiera de estos dos parámetros, o ambos, pueden ser útiles para extrapolar la edad de individuos concretos desde las correspondientes curvas de crecimiento. Las figuras 8C y 8D muestran los perfiles de crecimiento de *T. occidentalis*, definidos como incremento de CRL (8C) o de peso (8D), con respecto a la edad.

Aunque el proceso de crecimiento de un individuo desde el inicio de su desarrollo hasta el final del mismo (edad adulta), sigue siempre una curva exponencial, la función exponencial es menos acusada en el caso de la curva correspondiente al aumento de CRL que en el de la curva de aumento de peso. Esto es debido a que este último parámetro depende del volumen, que es una longitud elevada al cubo, mientras que el valor CRL es en sí una longitud. Esto, junto con el hecho de que en nuestro estudio no hemos obtenido datos de los primeros estadios de desarrollo embrionario, explican por qué los valores de CRL obtenidos (Fig. 8D) se ajustan mejor a una recta cuando son representados en función de la edad. La parte derecha de una curva exponencial es mucho menos curva que la parte izquierda de la misma y, en consecuencia, su pendiente puede variar muy poco o casi nada si el coeficiente exponencial es muy próximo a la unidad.

RESULTADOS

Las fórmulas de las funciones obtenidas (Figs. 8 C y D) se utilizaron para calcular la edad estimada de individuos concretos. Para ello, se calculó la media aritmética de las edades estimadas a partir de ambos datos numéricos, el peso y la longitud CRL.

FORMACIÓN DE LA CRESTA GENITAL Y DIFERENCIACIÓN GONADAL EN *T. occidentalis*

Este proceso tiene lugar durante el estadio E4. El mesonefros está bien formado, y en su cara ventral se forman las crestas genitales, que en principio parecen simples engrosamientos del epitelio celómico (Fig. 9A). Dicho epitelio celómico está formado por una monocapa de células prismáticas. Estas crestas genitales no presentan estructuras definidas en su interior. Consisten en dos masas de células en proliferación constituidas casi exclusivamente por células somáticas de tipo epitelial. El estroma es prácticamente inexistente, así como las células germinales. Estas están ausentes en la casi totalidad de los cortes, aunque se han observado algunas en cortes aislados, indicando el principio de colonización del primordio gonadal por parte de las células germinales primordiales. Las mitosis son muy abundantes (Fig. 9 B y C).

En el siguiente estadio, E5a, el primordio gonadal está ligeramente más desarrollado que en el estadio anterior, aunque su aspecto a bajo aumento es muy similar. En este estadio se observa la primera diferencia entre la gónada masculina y la femenina. Sólo en la hembra se hace patente por primera vez la existencia de dos regiones gonadales, una medular más profunda y otra cortical, más externa que cubre a la anterior (Fig. 9D). Ambas regiones se hacen patentes por la aparición de una capa de tejido mesenquimático que las separa (Fig. 9E). En los cortes transversales la región cortical aparece con forma de herradura envolviendo a la medular, mientras que en los cortes longitudinales el mesénquima de separación aparece como una estructura recta. Ya han aparecido agregaciones celulares que sugieren estructuras cordonales observables a mayor aumento, aunque estos supuestos cordones no son aún muy patentes en estos primeros estadios del desarrollo gonadal, por estar frecuentemente adosados entre sí. Es posible observar estas estructuras a ambos lados de este septo de tejido mesenquimático. No obstante, la

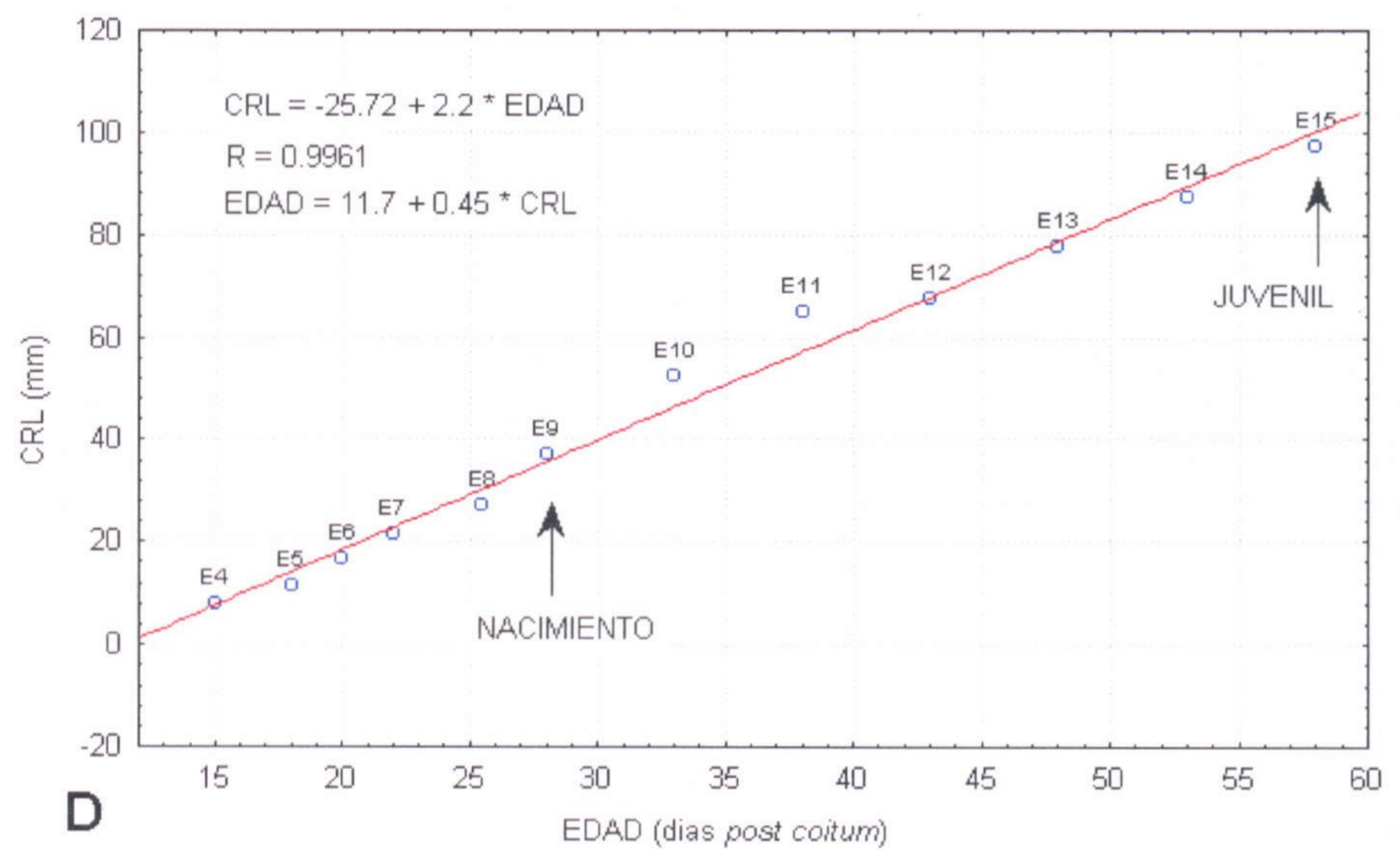
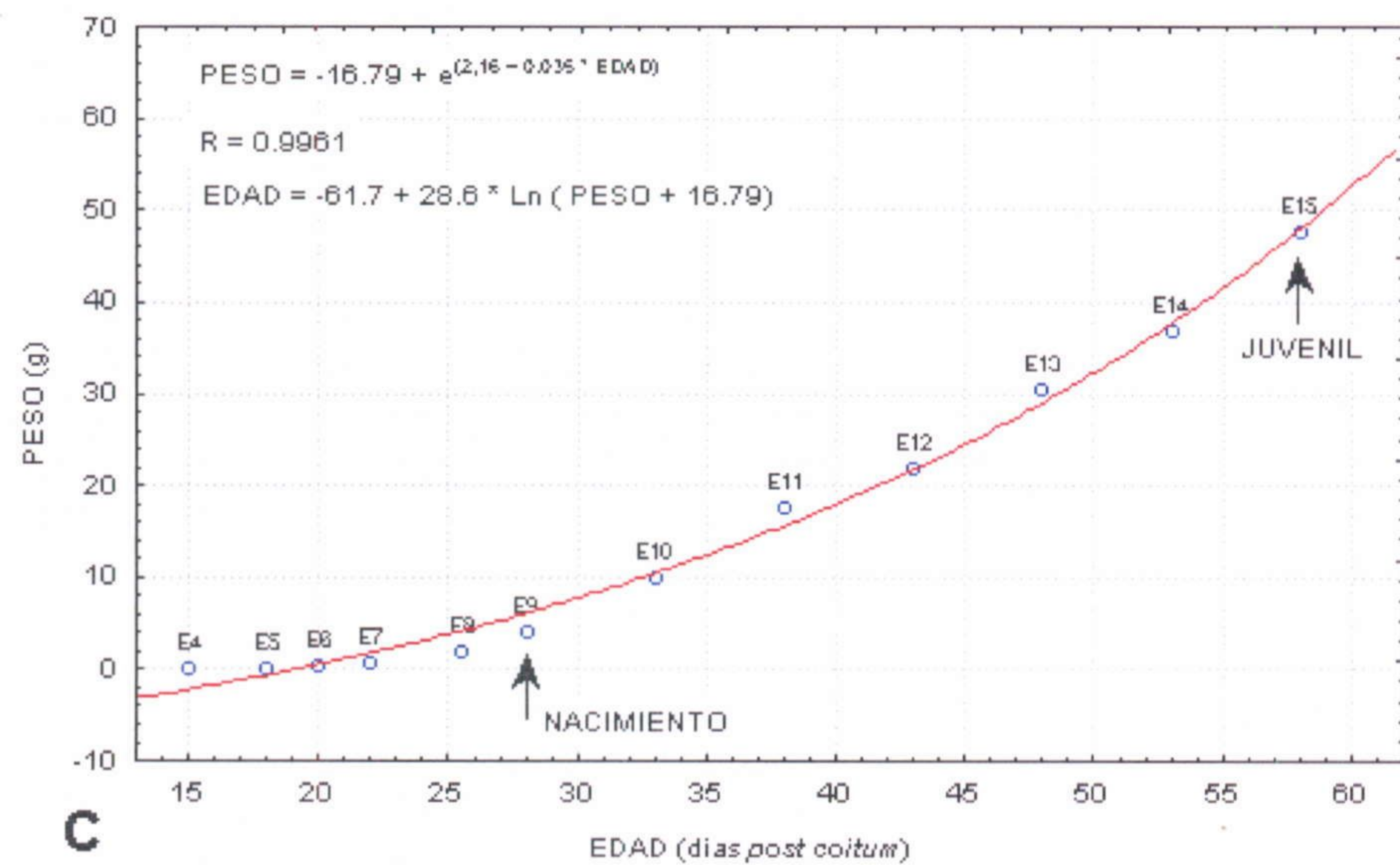
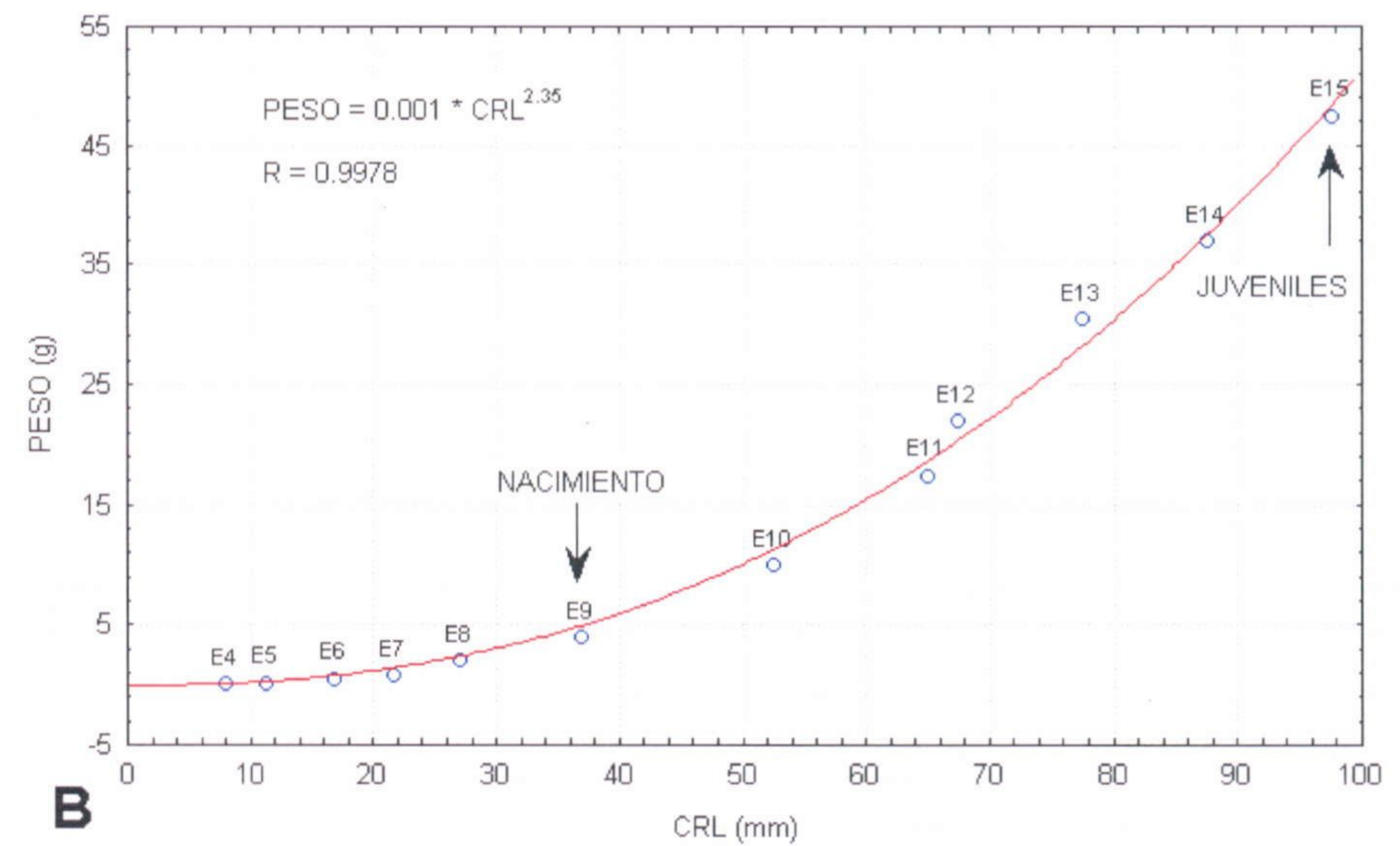
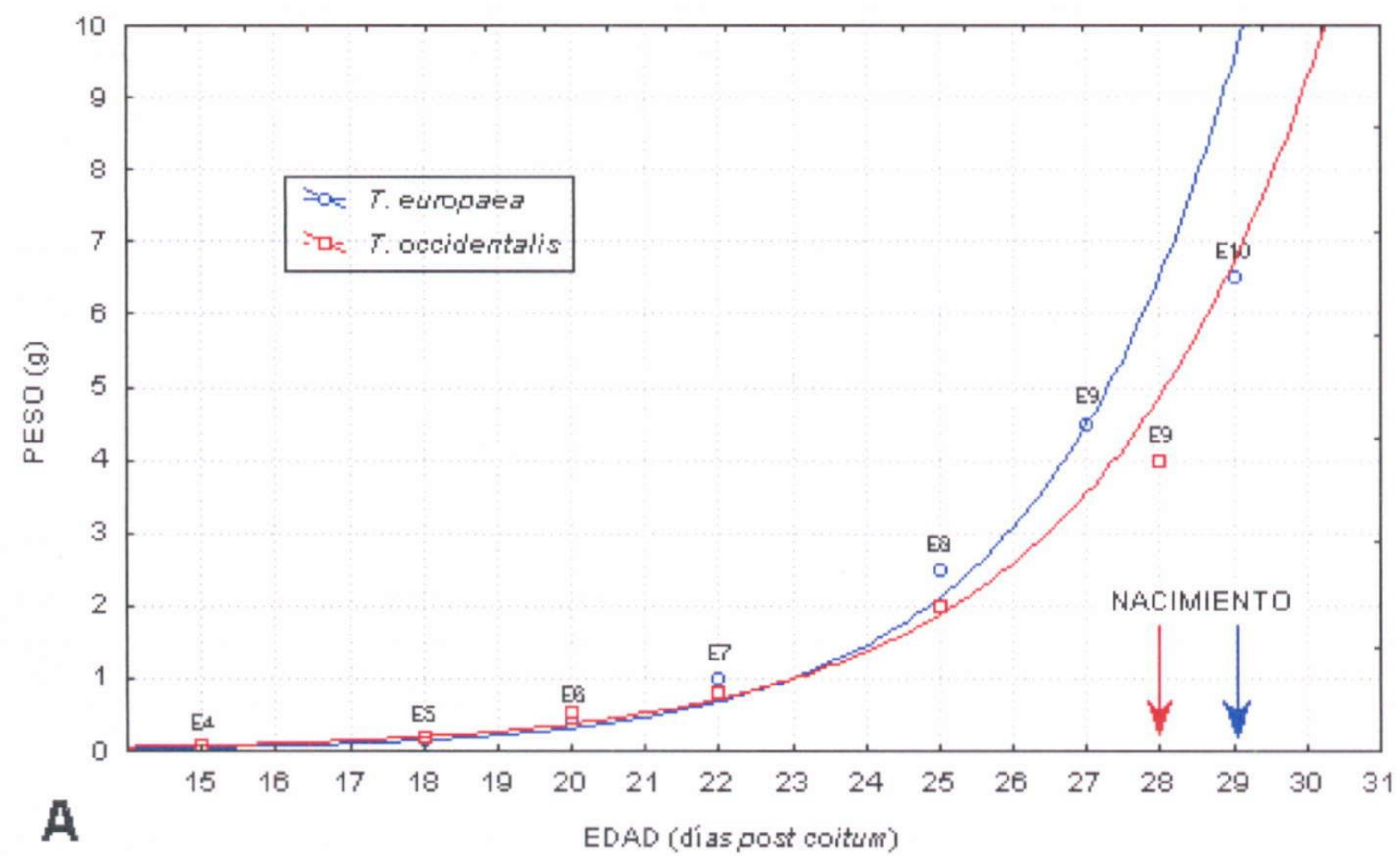
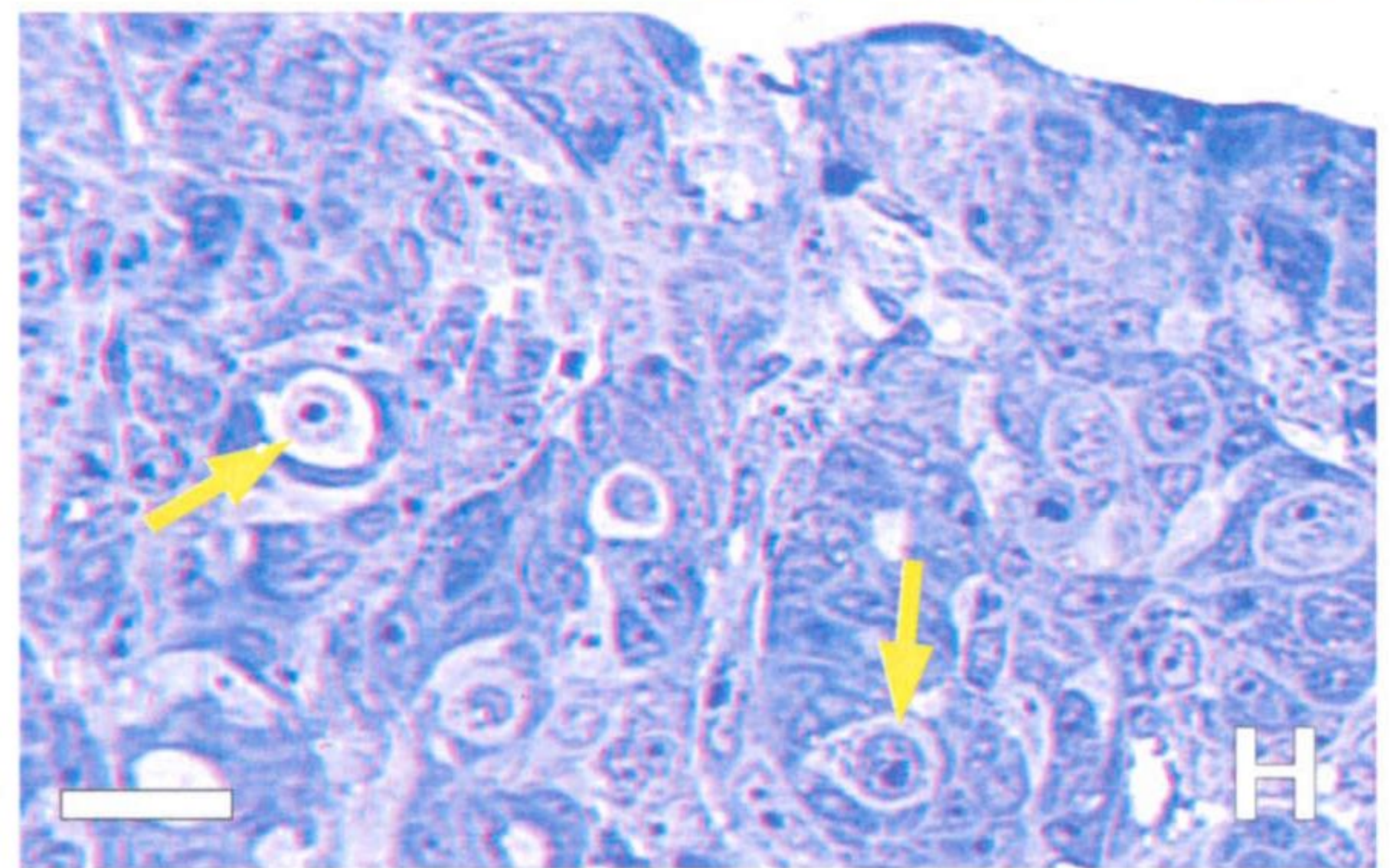
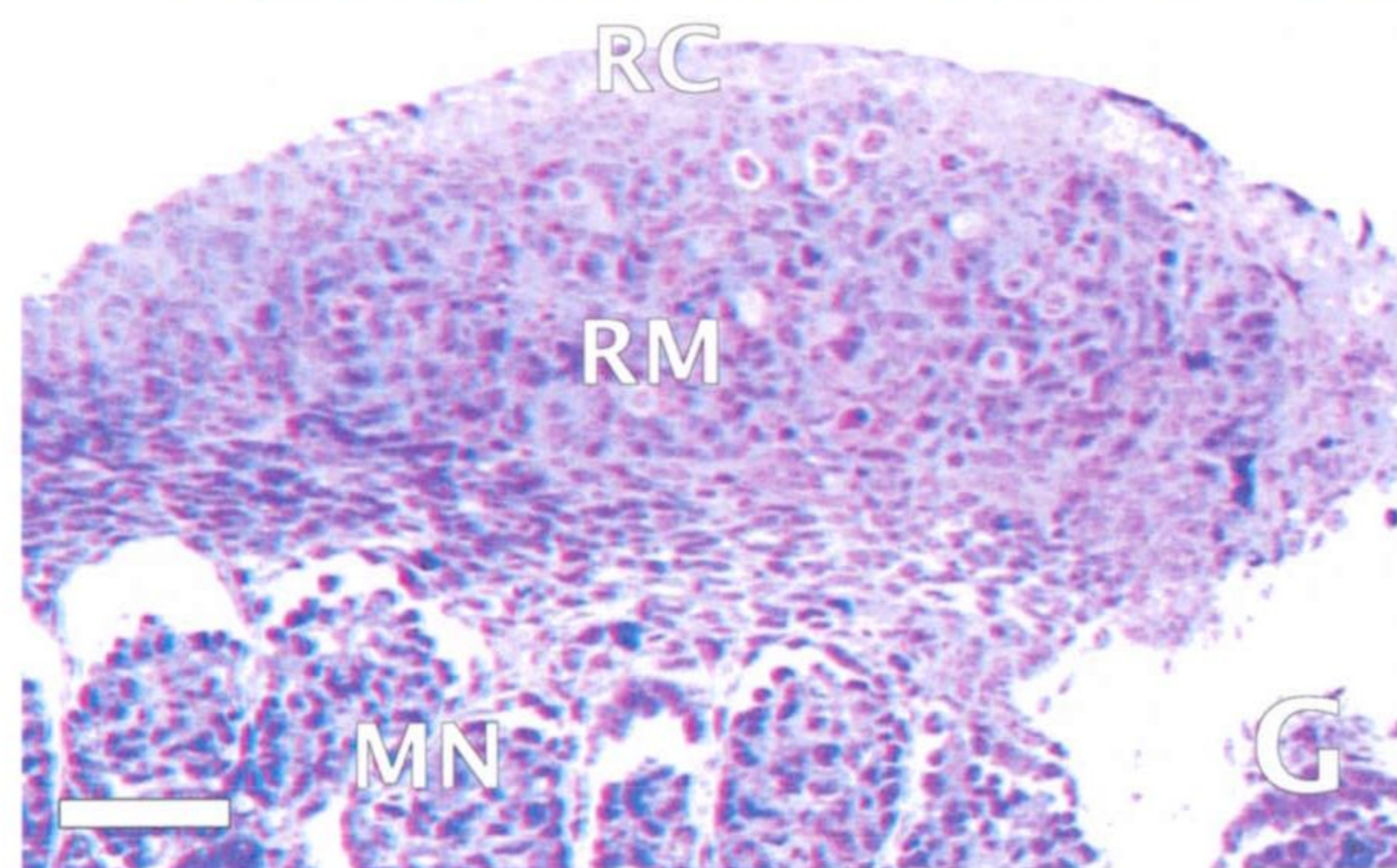
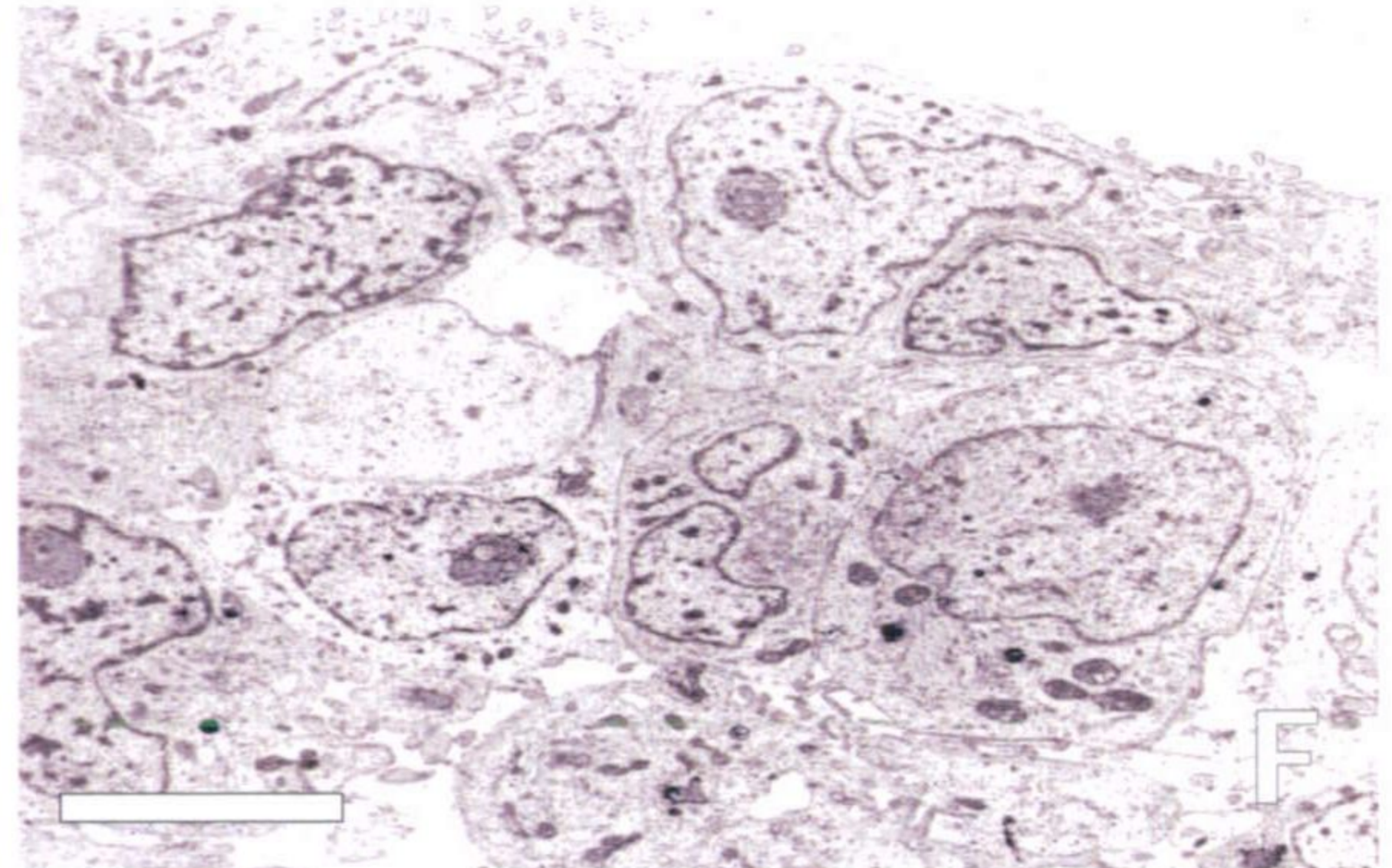
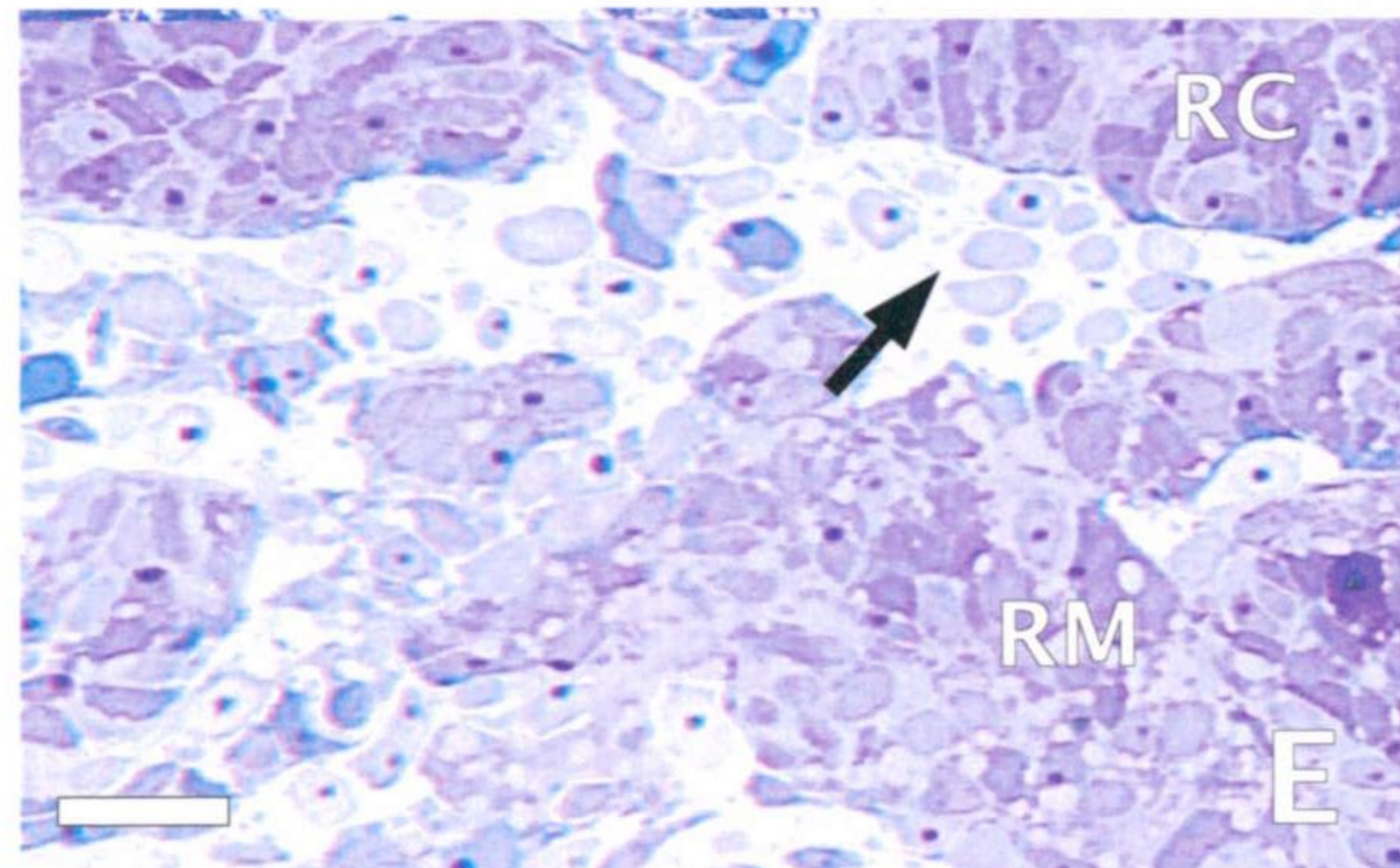
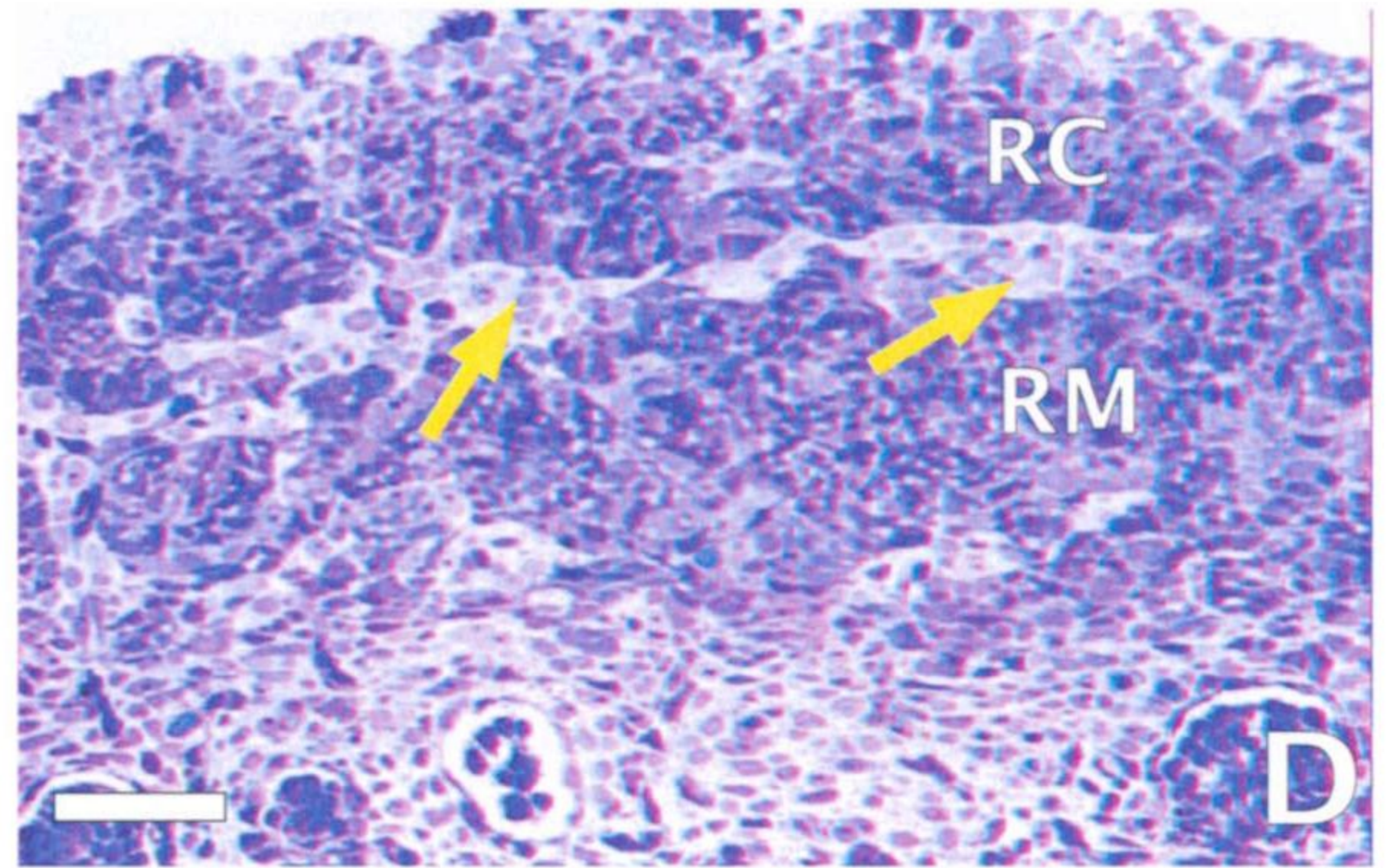
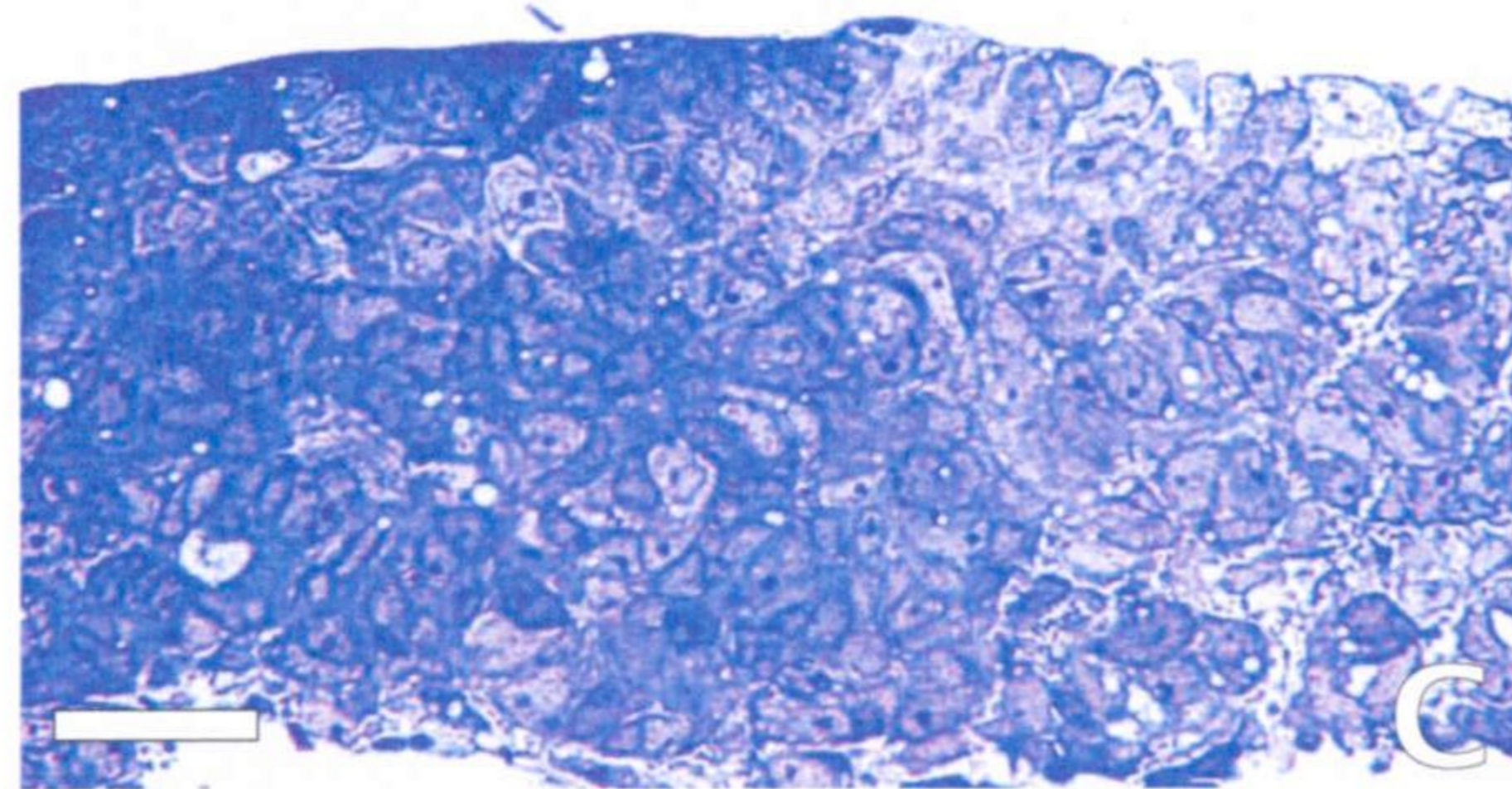
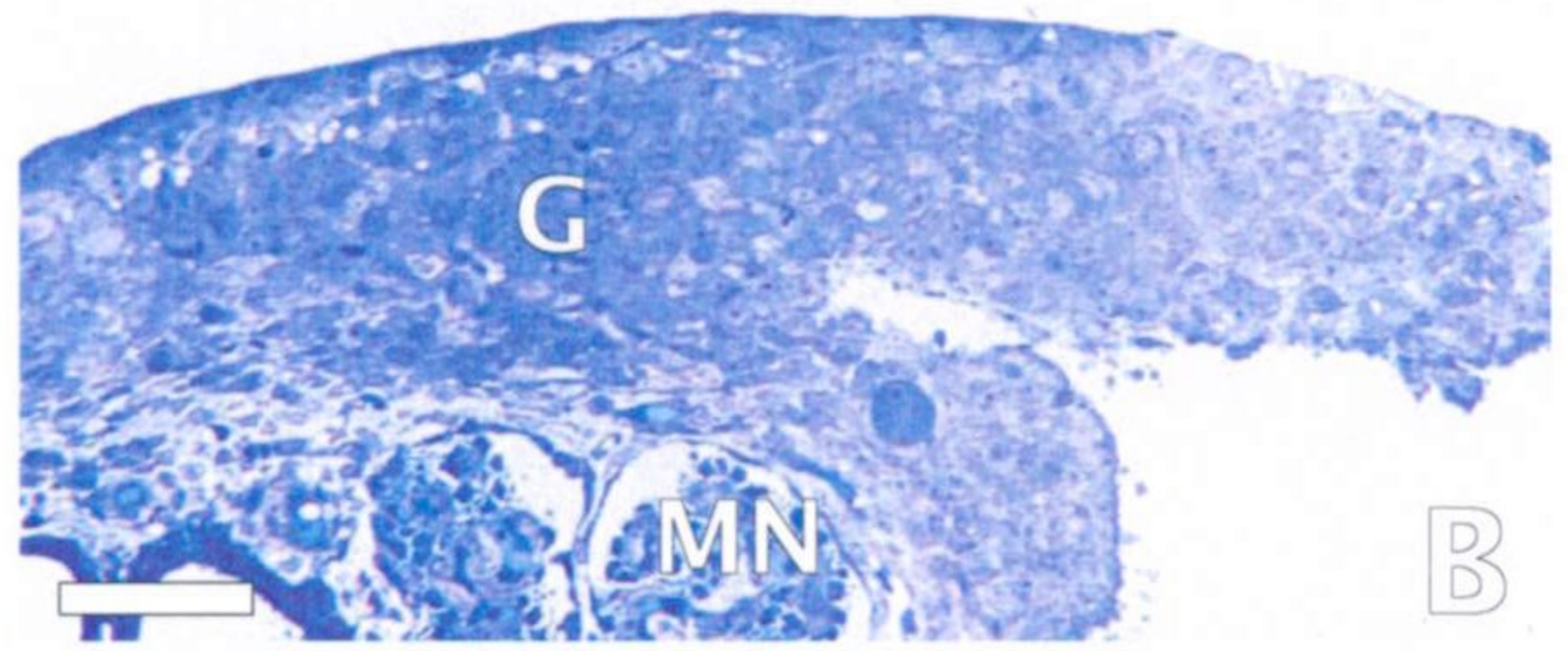
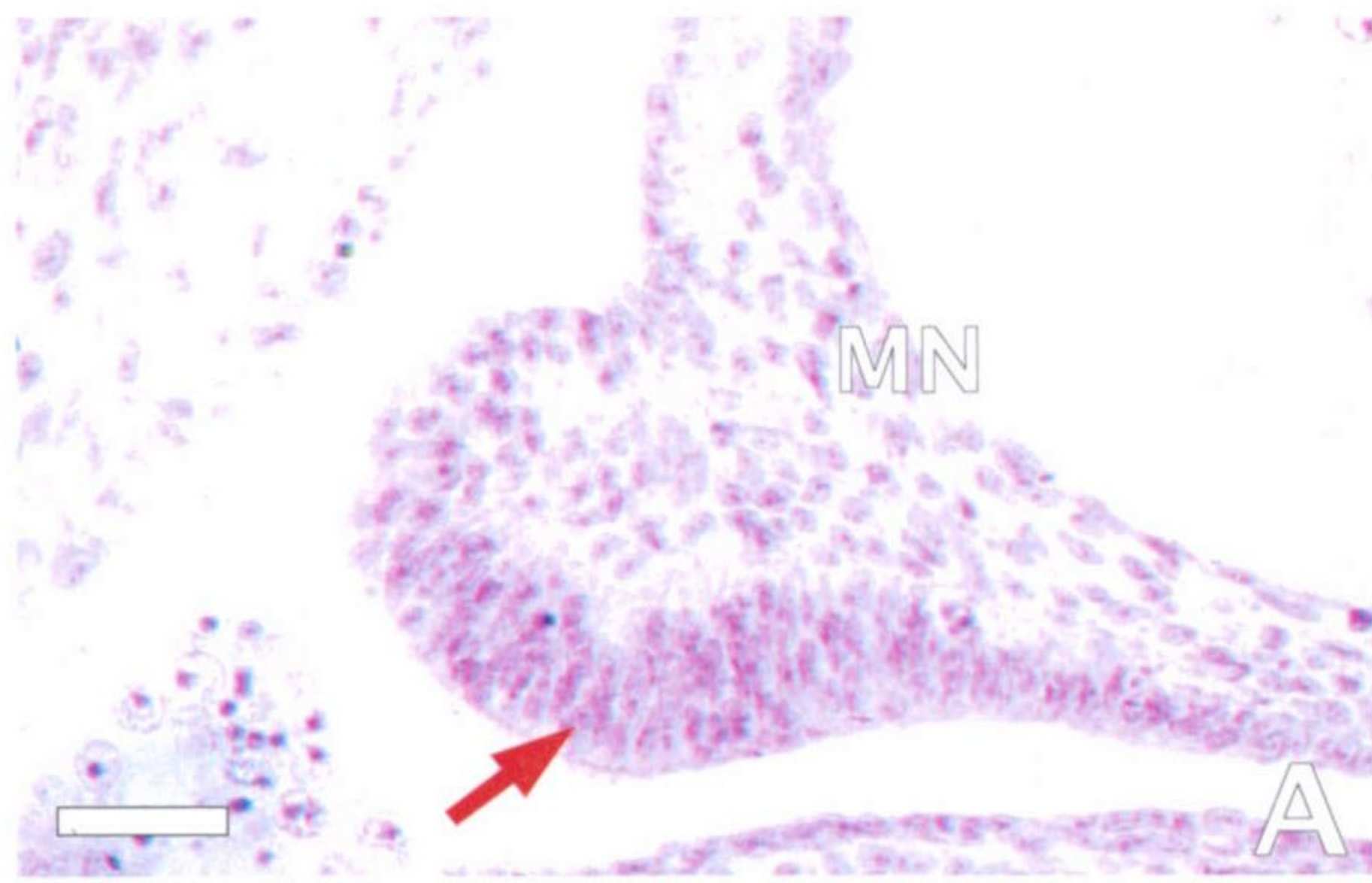


Figura 8. A) comparación de las tasas de crecimiento de *T. europaea* y *T. occidentalis*. B-D) Análisis de correlación entre B) el peso y el CRL, C) la edad y el peso, y D) la edad y el CRL, en *T. occidentalis*.

Fig. 9. Desarrollo de la cresta genital y diferenciación gonadal en *Talpa occidentalis*.

- A)** Inicio de la formación de la cresta genital en un embrión de topo en una fase muy temprana del estadio E4; en este corte transversal, la cresta genital se muestra como un engrosamiento del epitelio celómico (flecha); MN, mesonefros.
- B)** Primordio gonadal (G) de un embrión XX en una fase tardía del estadio E4 (MN, mesonefros).
- C)** A mayor aumento se observa que, en su mayor parte, está compuesto por células somáticas de tipo epitelial, siendo bastante escasas las células germinales y las células somáticas de tipo mesenquimático. No se observan estructuras cordonales
- D)** Gónada femenina durante E5a. Una región medular (RM) y una región cortical (RC) han quedado definidas por la aparición de un septo de tejido mesenquimático que las separa (flechas).
- E)** Detalle a mayor aumento del corte mostrado en D. La flecha señala el tejido mesenquimático.
- F)** La ausencia de una lámina basal que envuelva a los agregados celulares observables en estas gónadas denota que no existen aún verdaderos cordones gonadales en este estadio.
- G)** Gónada masculina durante E5a; no se ha formado ningún septo mesenquimático que separe las regiones medular (RM) y cortical (RC) de esta gónada (MN, mesonefros).
- H)** A mayor aumento se observan los agregados de células somáticas de tipo epitelial que rodean a las células germinales (flechas).

Excepto la figura A (parafina), las demás imágenes han sido obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Las barras representan 5 μm en F, 15 μm en A, 20 μm en E y H, 40 μm en C y 50 μm en B, D y G.



RESULTADOS

observación al microscopio electrónico ha demostrado que no se trata aún de verdaderos cordones gonadales, dada la ausencia de una lámina basal que los envuelva (Fig. 9F).

Por el contrario, en la gónada de los machos de este mismo estadio E5a no se observa ningún septo mesenquimático que delimite dos regiones gonadales (Fig. 9G). Sin embargo, también en estas gónadas masculinas XY se han formado estructuras cordonaes incipientes (Fig. 9H).

DESARROLLO TESTICULAR EN INDIVIDUOS XY DE *T. occidentalis*

E5b es uno de los estadios clave en el desarrollo gonadal de *T. occidentalis*, ya que es aquí cuando tiene lugar la diferenciación testicular de los machos de esta especie. Las gónadas tienen una forma ovoidea clara, bastante independiente del mesonefros y en algunos cortes se observan unidas a éste sólo por un corto, delgado y ancho pedúnculo, que mantiene ambos órganos en disposición paralela en toda su longitud. En la gónada masculina los cordones medulares que comenzaron a formarse en el estadio previo, aparecen separados entre sí gracias a la proliferación e invasión del tejido mesenquimático procedente del mesonefros (Fig. 10 A y B). Este proceso es más evidente en la región central de la gónada y menos en los polos anterior y posterior de la misma. Los cordones testiculares no son aún muy evidentes en los cortes de parafina, pero se ven ya muy claramente en los cortes semifinos. Algunas células del tejido intersticial comienzan a presentar el aspecto típico de las células de Leydig, aunque aún son muy escasas.

La región cortical presenta aún un aspecto muy similar al del estadio E5a, aunque las células germinales primordiales se observan ahora en el interior de los cordones testiculares. Estas células se encuentran ahora en un proceso muy activo de división mitótica. Las escasas células germinales presentes en la región cortical comienzan a mostrar signos de degeneración, tales como un núcleo fragmentado y/o muy picnótico. También se observan vasos sanguíneos (capilares) que separan la región cortical de la medular en unas ocasiones, o los propios cordones entre sí, en otras. El gran desarrollo

RESULTADOS

alcanzado por la región medular relega la región cortical a una estrecha franja en la que no se observan cordones diferenciados. Esta región cortical está constituida por varias capas de tejido mesenquimático que muestran ya una disposición aplanada y en paralelo al epitelio de superficie, constituyendo por tanto, el primer signo de diferenciación de una túnica albugínea del testículo. El epitelio superficial muestra características similares a las del estadio anterior, reduciéndose a una monocapa de células prismáticas (Fig. 10B).

En E5c, el testículo es ya un órgano claramente ovoideo, bastante independiente del mesonefros. En el tejido intersticial se observan grupos de células con citoplasma grande y muy eosinófilo. Se trata de células de Leydig claramente diferenciadas (Fig. 10C). Los cordones testiculares son claramente visibles en ambos tipos de preparaciones histológicas (parafina y resina). Contienen numerosas células germinales, muchas de las cuales se observan en mitosis. Estas ocupan generalmente una posición central y están rodeadas por las células somáticas (Sertoli), que se disponen en la periferia (Fig. 10D). También aquí se observan frecuentes mitosis. La túnica albugínea continua su proceso de formación (Fig. 10D).

Los testículos del estadio E6 presentan dos novedades principales respecto a los del estadio anterior. En primer lugar, el tejido intersticial presenta ya un desarrollo patente, con una clara proliferación y diferenciación de células de Leydig, que frecuentemente forman grupos muy numerosos. Paralelamente al desarrollo del componente endocrino del testículo, se produce el del sistema de vascularización encargado de exportar las hormonas masculinas. En consecuencia, se puede observar una extensa red de vasos capilares y pequeñas arterias y venas, que discurren por todo el tejido intersticial (Fig. 10E).

En segundo lugar, los cordones testiculares, que contienen numerosas células germinales, aparecen por primera vez rodeados por células aplanadas, precursoras de las células mioides que los recubrirán completamente en el futuro. Los núcleos de estas células no muestran todavía la forma extremadamente aplanada que presentarán cuando estén definitivamente diferenciadas. Por otra parte, la túnica albugínea continua su proceso de formación, y las células que la componen aparecen cada vez más aplanadas y más estrechamente compactadas entre sí.

Fig. 10. Desarrollo testicular prenatal (estadios **E5b-E8**) en los machos de *Talpa occidentalis*.

A) Testículo recién diferenciado en un embrión XY en el estadio E5b (T), junto a su mesonefros (MN).

B) A mayor aumento se observan los cordones testiculares (flechas negras) con células germinales primordiales (flechas rojas), separados por mesénquima (M).

C) En E5c el testículo contiene cordones más patentes y algunas células del mesénquima se han diferenciado como células de Leydig (flechas).

D) A mayor aumento se observa que las células germinales (flechas rojas) son más abundantes en los cordones testiculares, que están claramente separados del epitelio de superficie por una túnica albuginea en formación (TA).

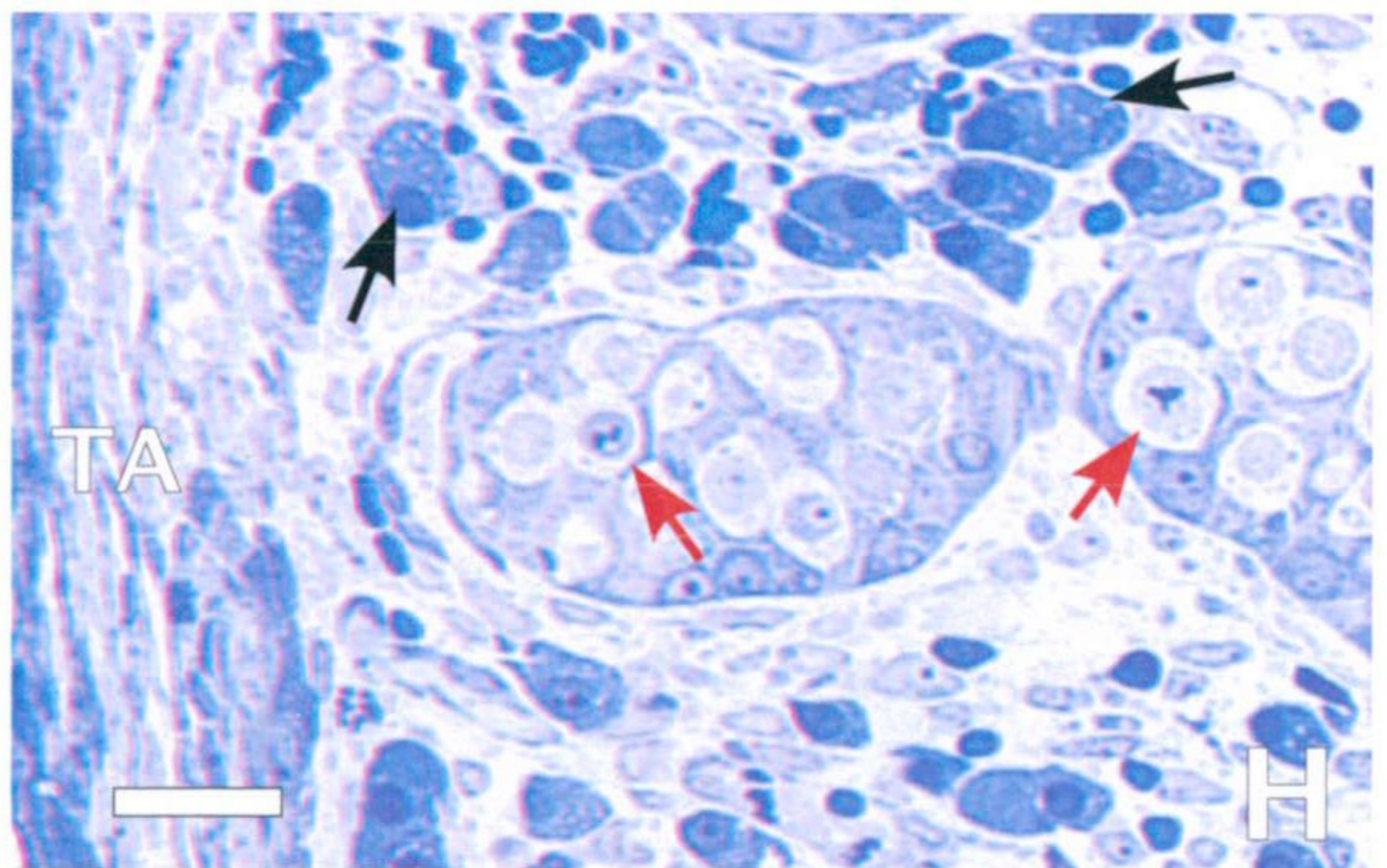
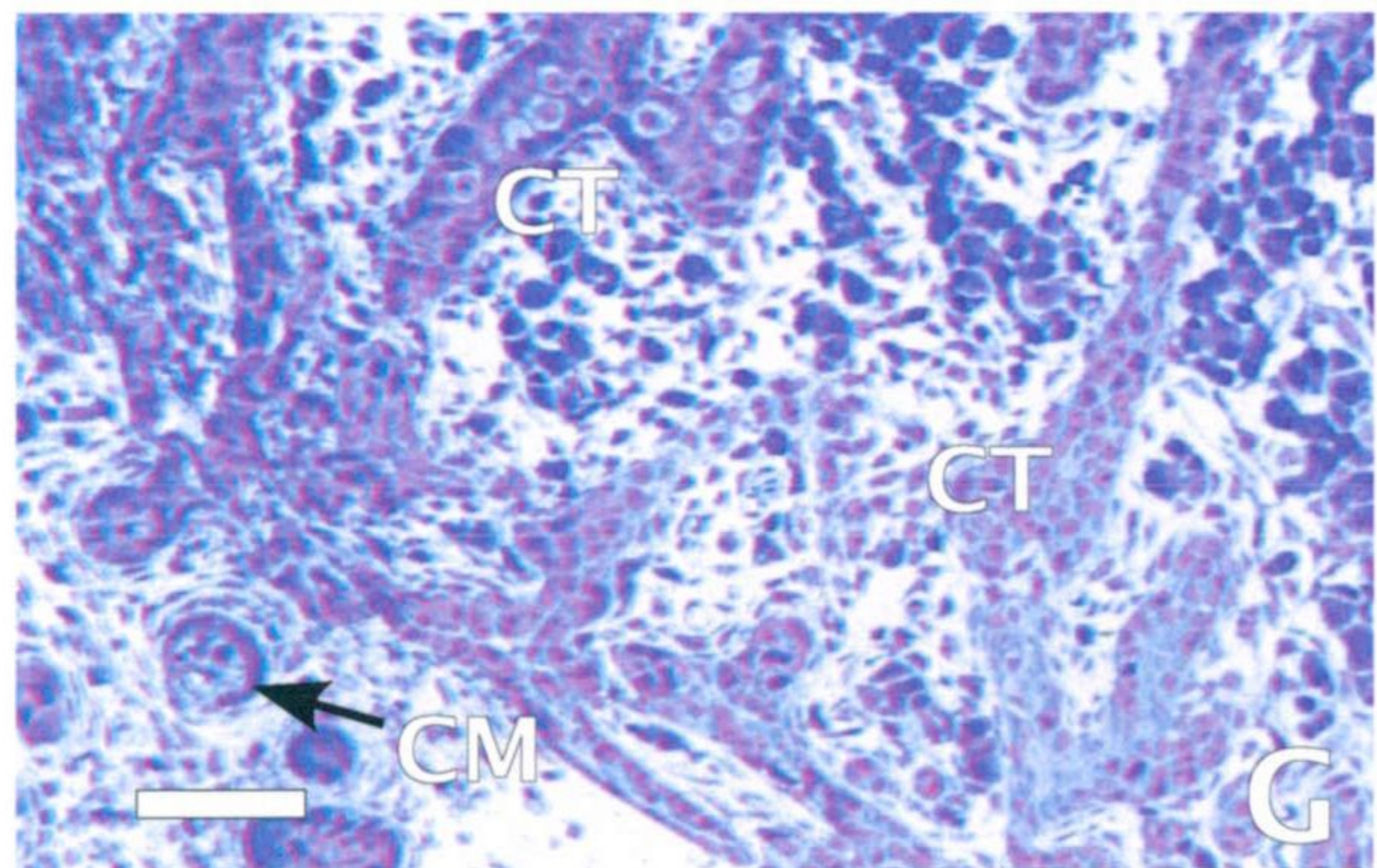
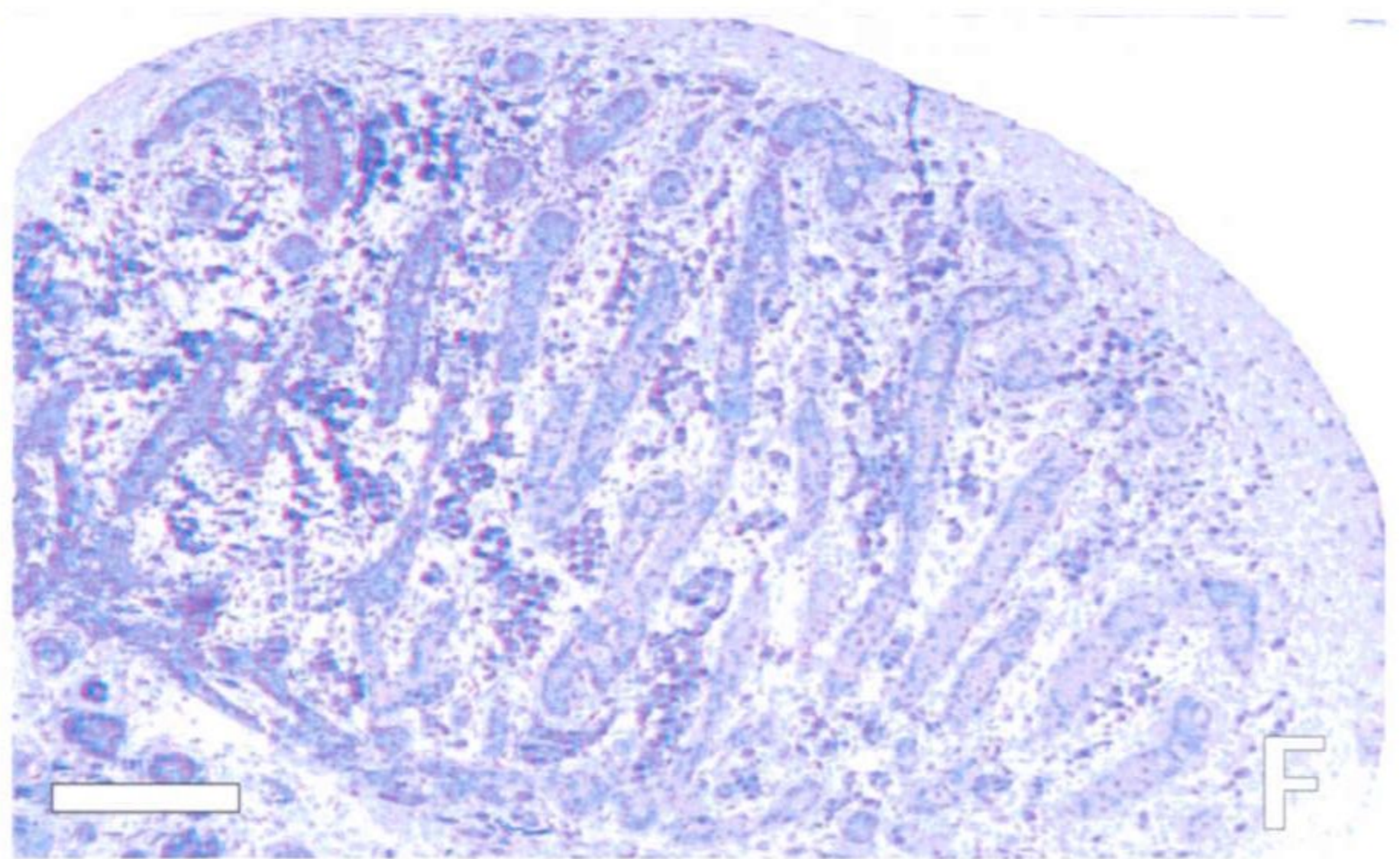
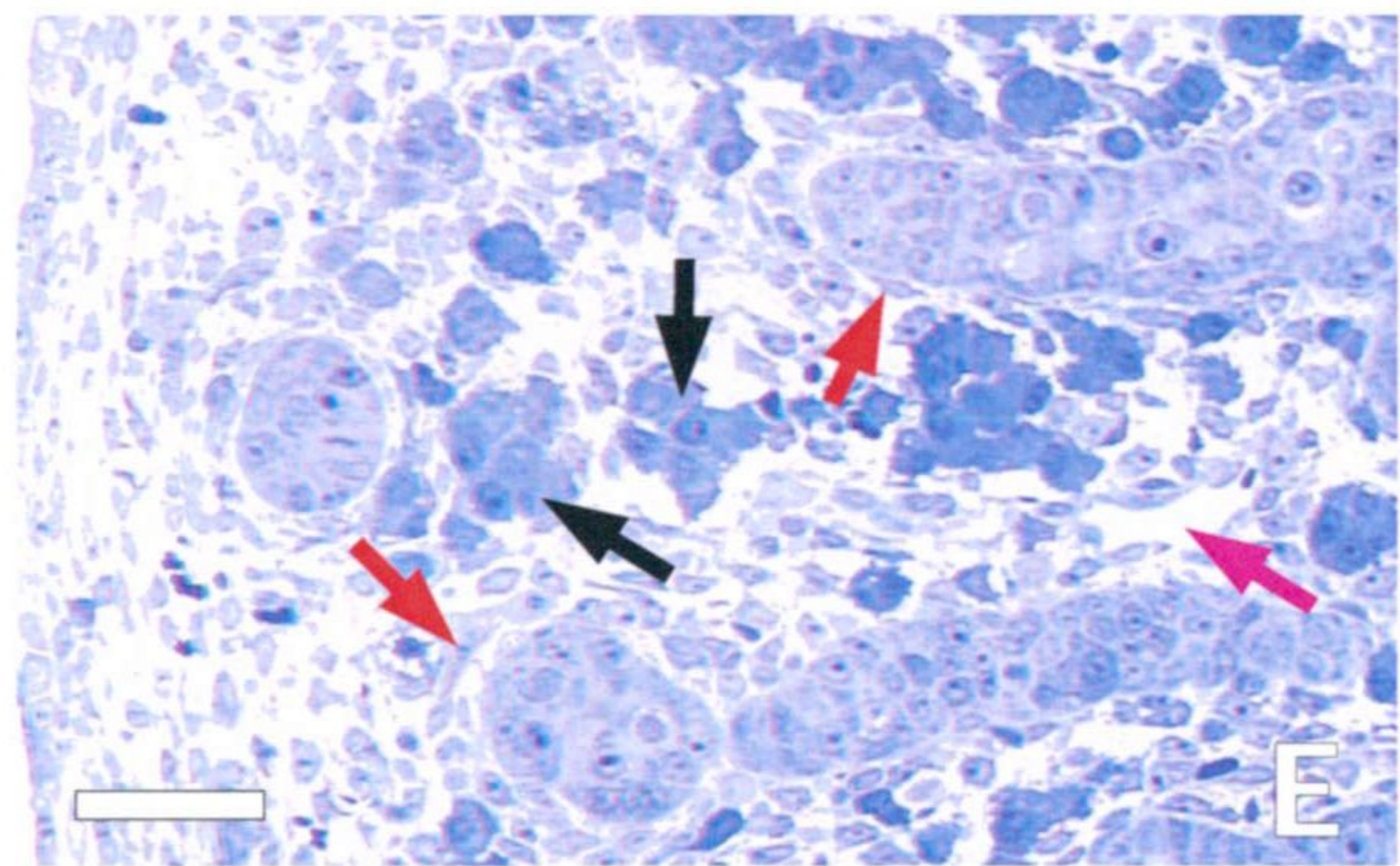
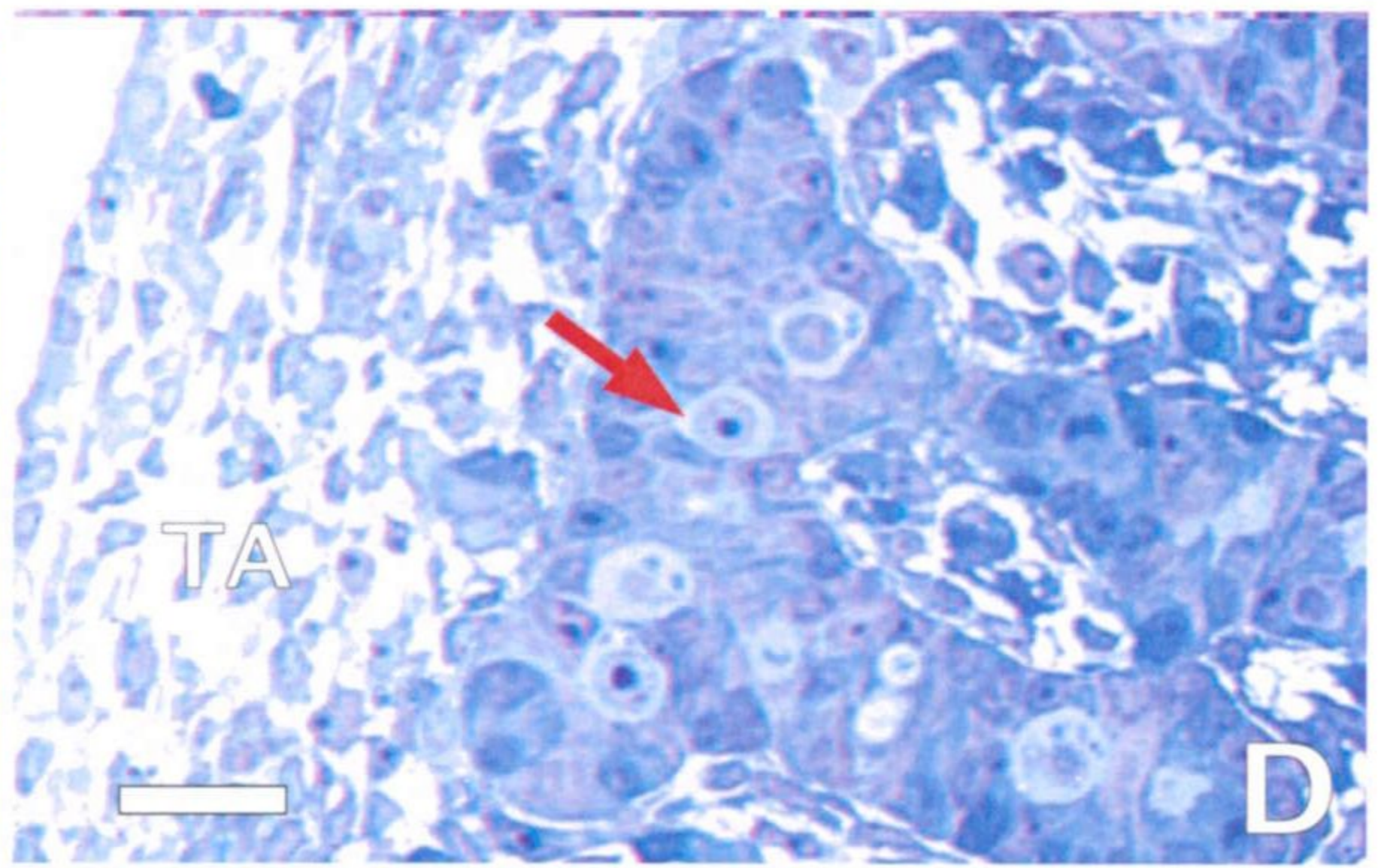
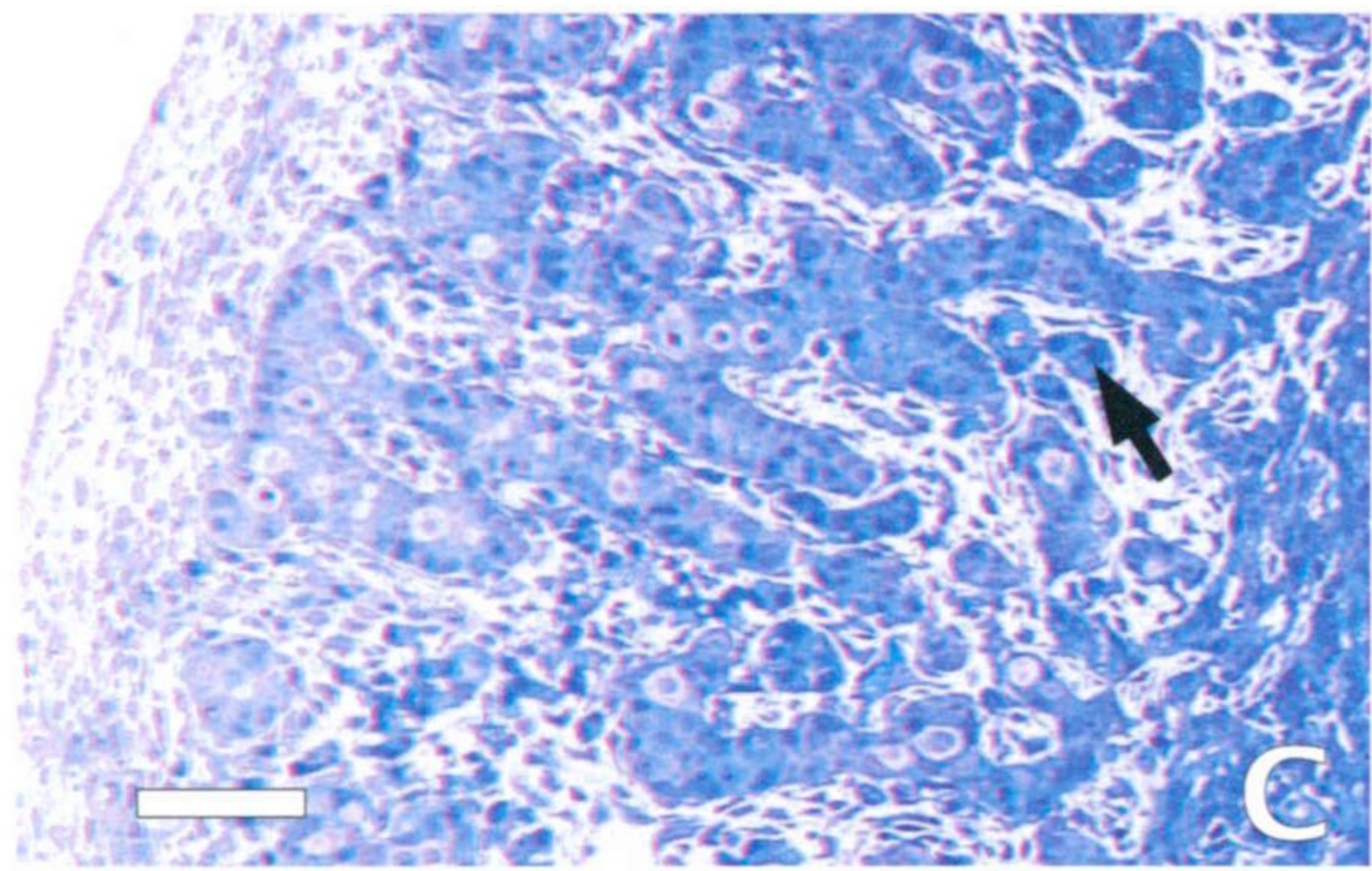
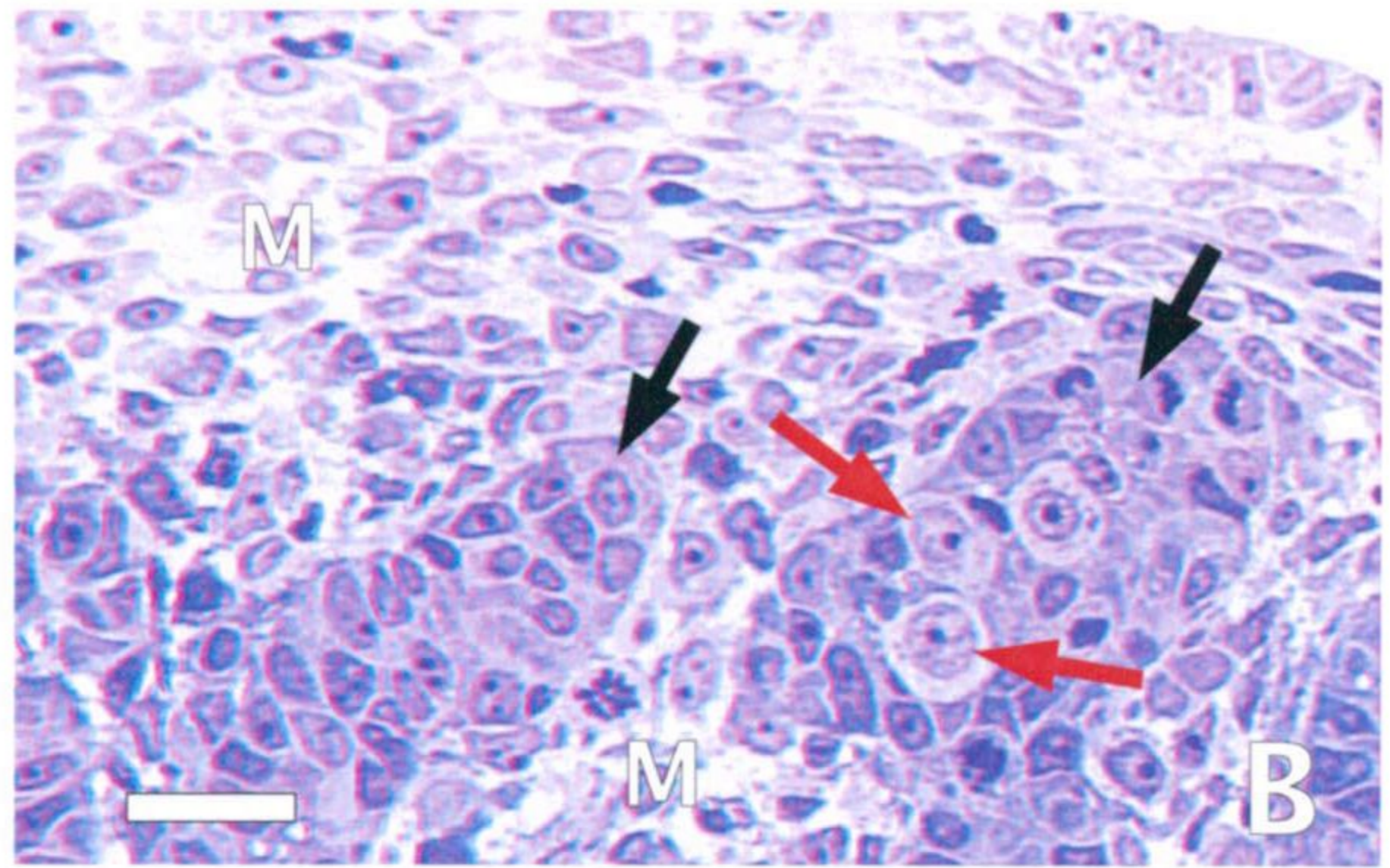
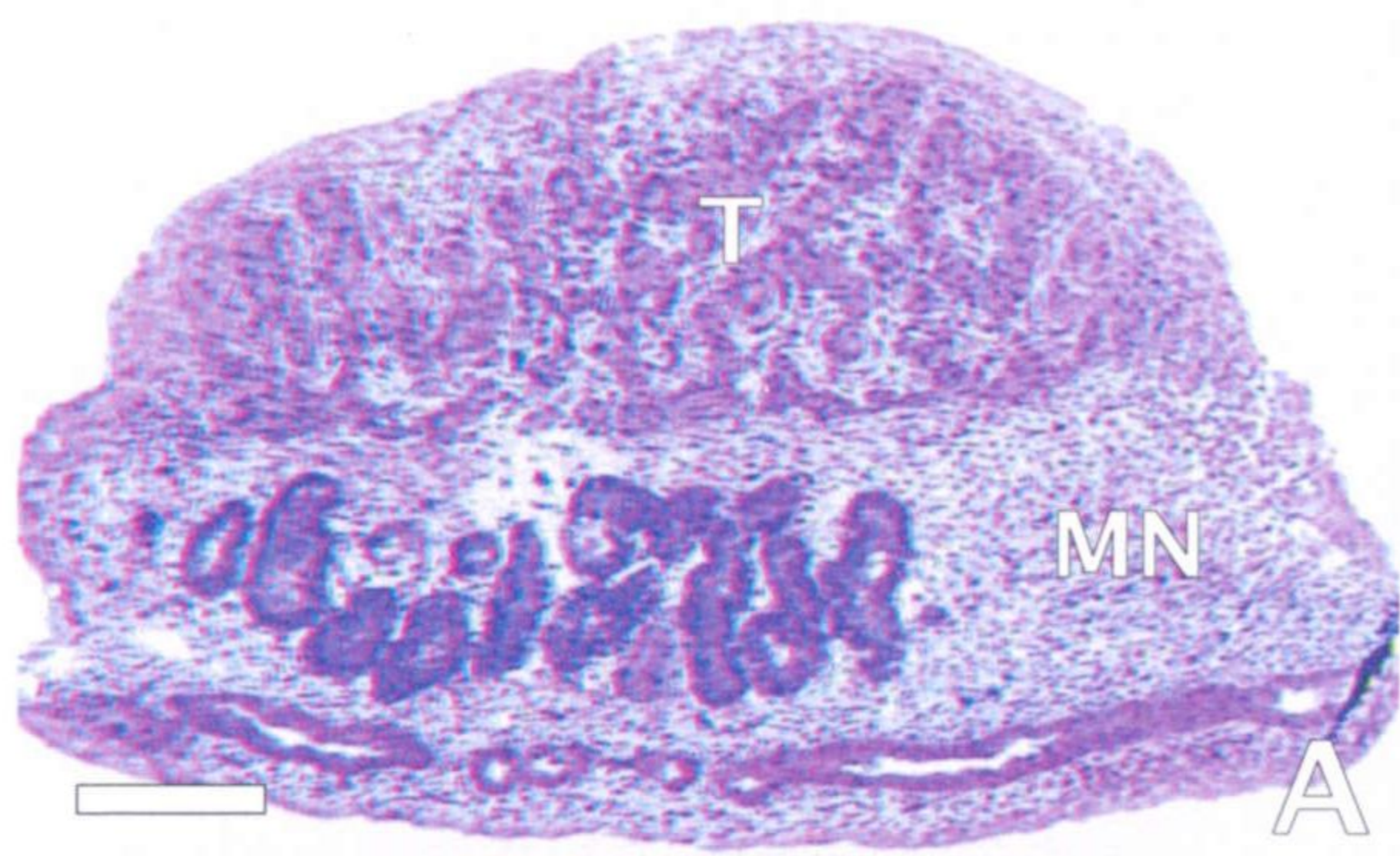
E) En el testículo de embriones XY del estadio E6 las células de Leydig (flechas negras) y los capilares sanguíneos (flecha magenta) son ya abundantes; comienza la diferenciación de las células mioides (flechas rojas).

F) El testículo de embriones E7 es claramente ovoideo y presenta un aspecto típicamente testicular.

G) En E7 comienza a formarse la rete testis, en la que participan canalículos mesonéfricos (CM) y cordones testiculares (CT).

H) En E8 la túnica albuginea (TA) está prácticamente formada y numerosas células intersticiales se han diferenciado ya como células de Leydig (flechas negras); las células germinales (flechas rojas) son muy abundantes en el interior de los cordones testiculares.

Imágenes obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Las barras representan 20 μm en B, D y H, 40 μm en E, 50 μm en C y G y 150 μm en A y F.



RESULTADOS

Las gónadas masculinas tienen en E7 un aspecto muy similar al de los testículos de cualquier especie de mamífero (Fig. 10F). Los cordones testiculares están algo más desarrollados y en su interior hay una gran cantidad de células germinales. El número de células en degeneración es menor que en estadios anteriores. En este estadio comienza la formación de la rete testis, mediante la conexión de canalículos mesonéfricos con los cordones testiculares en uno de los polos de la gónada (Fig. 10G). Se aprecia una mejor diferenciación de la túnica albugínea, y una notable vascularización en el estroma testicular. El volumen del testículo es ya mucho mayor que el de la gónada femenina.

Cuando se alcanza el último estadio de desarrollo prenatal, E8, los testículos están bastante desarrollados (Fig. 10H). La túnica albugínea está prácticamente formada y, adyacente a ella, se observa también un epidídimo en desarrollo incipiente. Los cordones testiculares son muy patentes por estar separados entre sí, y porque el tejido intersticial es menos denso. Muchas de las células del estroma testicular aún no se han diferenciado como Leydig, pero el número de estas es ya muy alto. El sistema vascular está más desarrollado que en estadios anteriores, con numerosos capilares discurriendo entre los cordones testiculares. La densidad de células germinales es mayor que en estadios anteriores. Se observan frecuentes mitosis, y escasas células en degeneración.

En general, las características de los testículos de los machos de *T. occidentalis* recién nacidos (estadio E9) son similares a las de los últimos estadios fetales (Fig. 11A). Los cordones testiculares ocupan en los cortes histológicos una superficie relativamente mayor que en aquellos, quizás debido a la intensa proliferación de las células germinales que tiene lugar en este período. Estas son ahora mucho más abundantes que en fetos macho del estadio E8 (Fig. 11B). En E10 la túnica albugínea ha alcanzado ya casi su desarrollo definitivo (Fig. 11C). Está constituida por numerosas capas de células aplanadas, atravesada por numerosos capilares y pequeños vasos sanguíneos, que tienen un endotelio totalmente formado. Por su parte, las células de Leydig ocupan amplias regiones del espacio intersticial del testículo y forman masas compactas (Fig. 11D).

En el estadio E11, el tejido intersticial parece ser relativamente menos abundante que en estadios anteriores debido al mayor tamaño que han alcanzado los cordones testiculares. No obstante, se observan amplias regiones ocupadas por tejido intersticial en

RESULTADOS

el que hay numerosas células de Leydig. Estas no ocupan todavía todo el espacio intersticial, existiendo aún algunas células mesenquimáticas no diferenciadas. El sistema de vascularización es muy abundante en este tejido intersticial. Todos los cordones testiculares están rodeados por una o más capas de células aplanadas de tipo mioide. Los cordones testiculares tienen un diámetro claramente superior al de los estadios anteriores, y están compuestos por células de Sertoli que ocupan posiciones periféricas y por un alto número de células de germinales, que continúan proliferando tal y como se deduce de las numerosas mitosis que se observan (Fig. 11 E y F). La *rete-testis* se observa completamente desarrollada desde un punto de vista morfológico, aunque sus canales, que ya tienen luz, se cierran al unirse con los cordones testiculares, ya que estos son aún macizos y carecen de luz tubular.

Al final de E11 el testículo alcanza su estructura juvenil definitiva, que se mantendrá hasta el estadio E15b, cuando los jóvenes machos de topo alcancen la pubertad y se inicien los cambios morfológicos y fisiológicos propios de este proceso. Tales cambios se apartan del propósito general de este trabajo y no serán tratados aquí.

DESARROLLO PRENATAL DE LOS OVOTESTES EN INDIVIDUOS XX DE *T. occidentalis*

La gónada femenina de topo comienza a presentar en este estadio unas características morfológicas excepcionales si las comparamos con las de otros mamíferos. A diferencia de lo que ocurre en el estadio E5a, en el E5b ya no se observa claramente un septo de tejido mesenquimático que separa ambas regiones gonadales, si bien las características diferenciales de ambas regiones permiten identificarlas (Fig. 12A). La región medular muestra un desarrollo muy parecido al descrito previamente en la gónada masculina. Los abundantes cordones medulares que aparecieron en E5a se hacen ahora muy patentes debido a la migración y proliferación de células mesenquimáticas que acaban separándolos. Como en los testículos de los machos, estas células mesenquimáticas probablemente provienen del mesonefros adyacente. Podemos decir, por tanto, que estos cordones medulares son homólogos de los cordones testiculares de los machos. A

Fig. 11. Desarrollo testicular postnatal (estadios **E9-E15b**) en los machos de *Talpa occidentalis*.

- A) Testículo de un topo macho recién nacido (estadio E9).
- B) A mayor aumento se observa en E9 la abundancia de células germinales dentro de los cordones testiculares (flechas negras), y de células de Leydig fuera de ellos (flechas rojas).
- C) En E10 la túnica albuginea contiene abundantes vasos sanguíneos (flecha).
- D) En este mismo estadio, las células de Leydig ocupan ya la casi totalidad del espacio intersticial del testículo y forman masas compactas (flecha).
- E) Diez días tras el nacimiento (E11), los testículos alcanzan la morfología juvenil casi definitiva, que se mantendrá hasta la pubertad, al final de E15b.
- F) A mayor aumento se observa que el incremento en el diámetro de los cordones testiculares se debe al elevado número de células germinales que contienen éstos (flechas negras). El número y grado de diferenciación de las células mioides también es muy alto (flechas rojas).

Imágenes obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Las barras representan 20 μm en D y F, 40 μm en B C y E, y 150 μm en A.

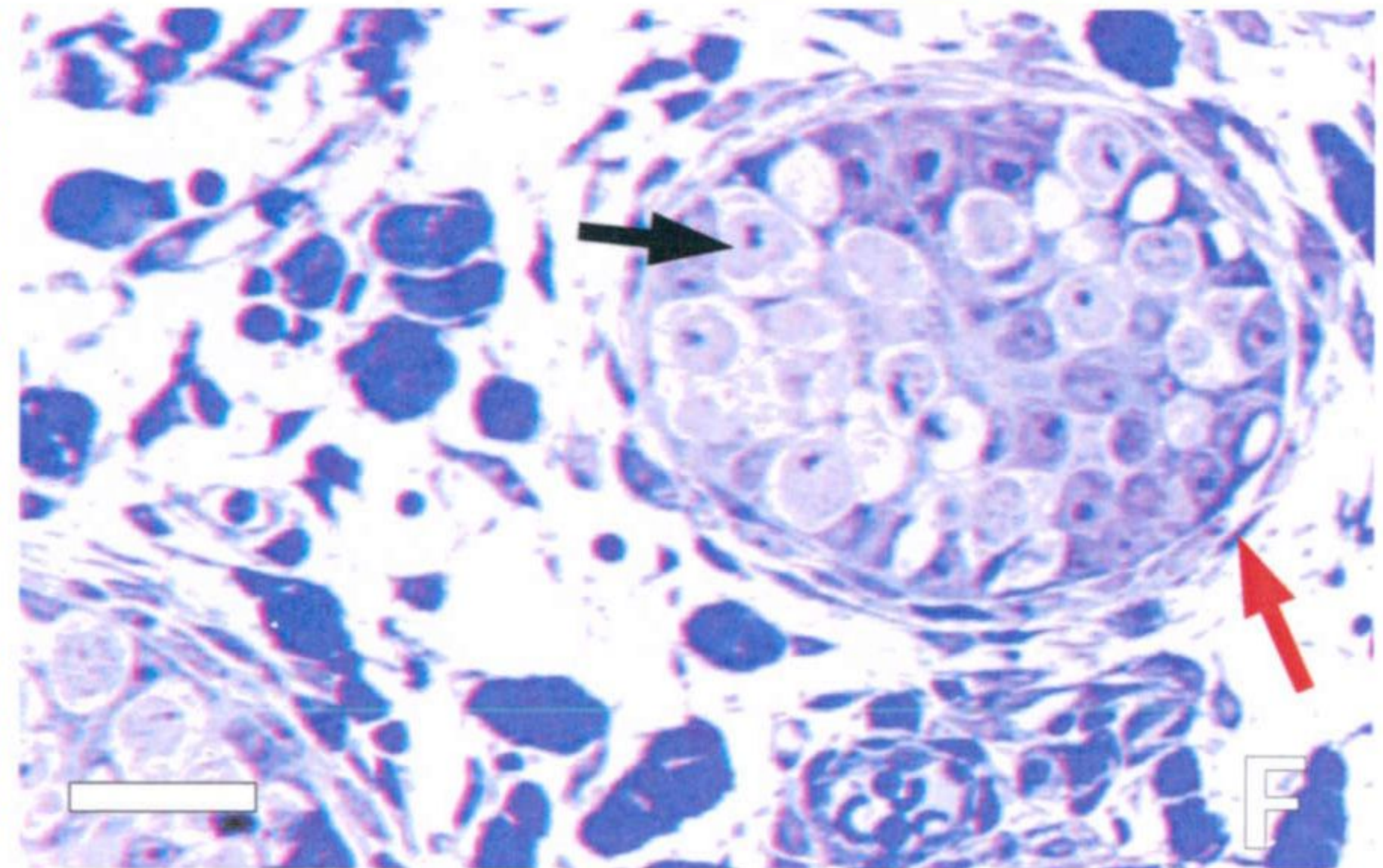
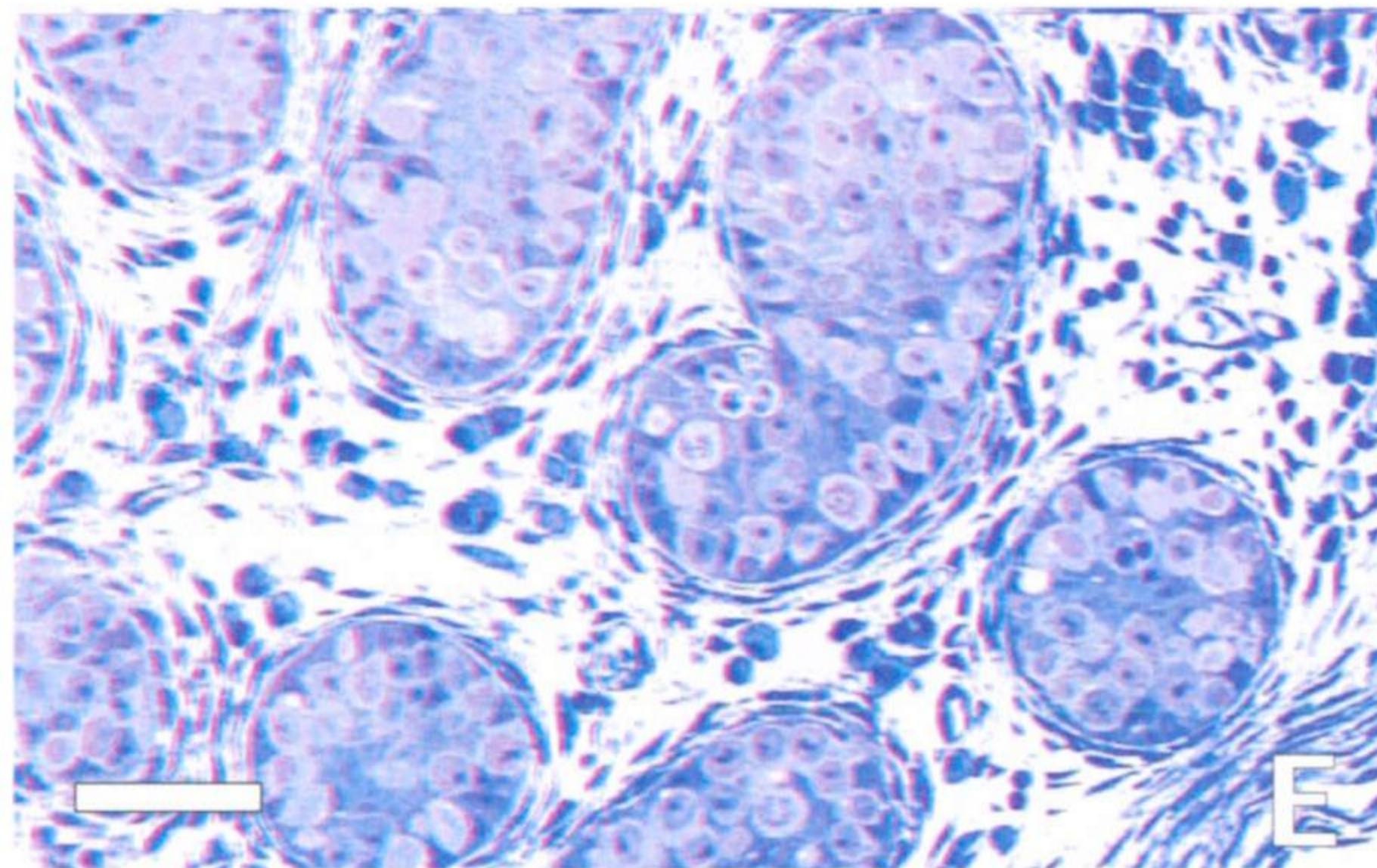
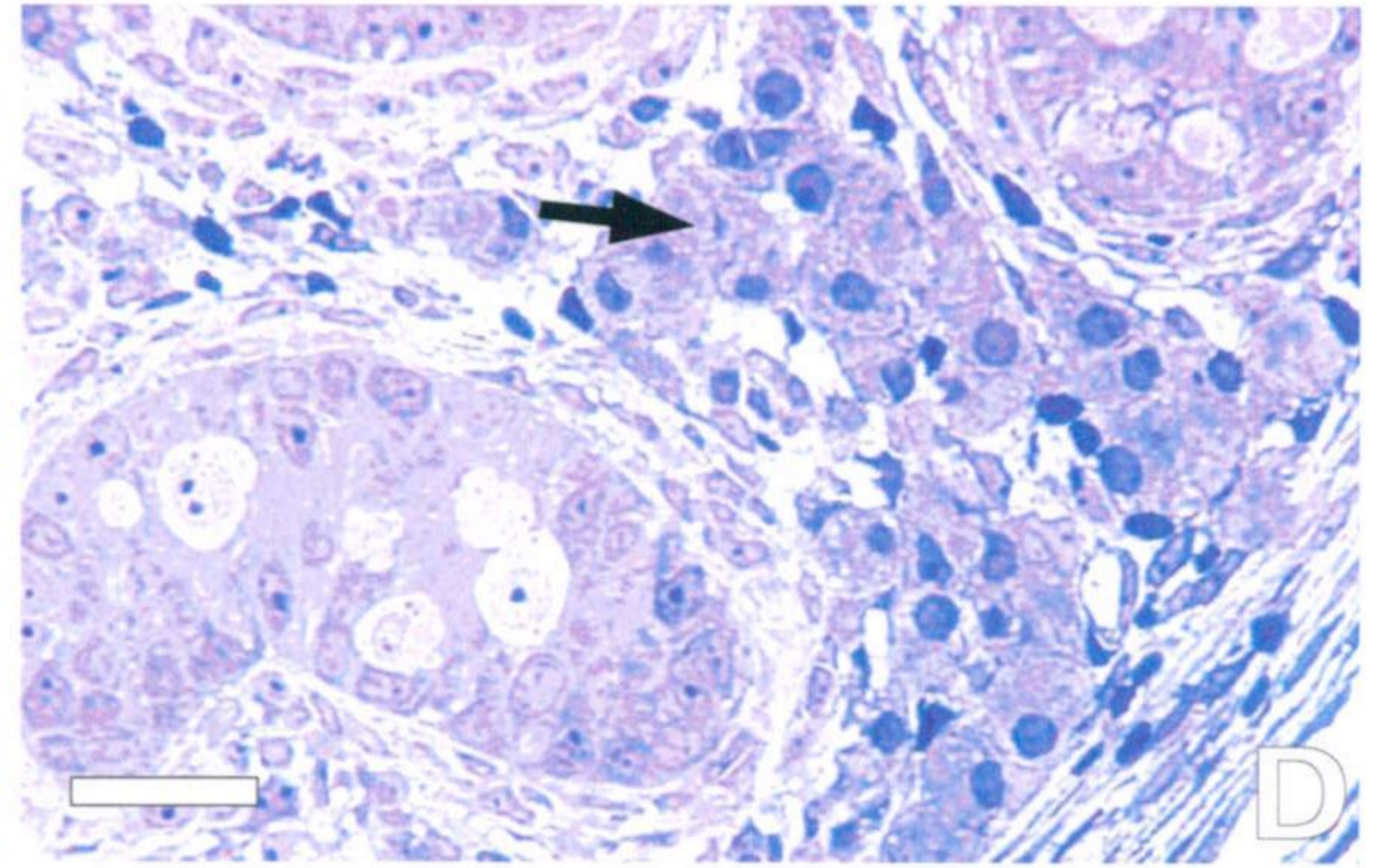
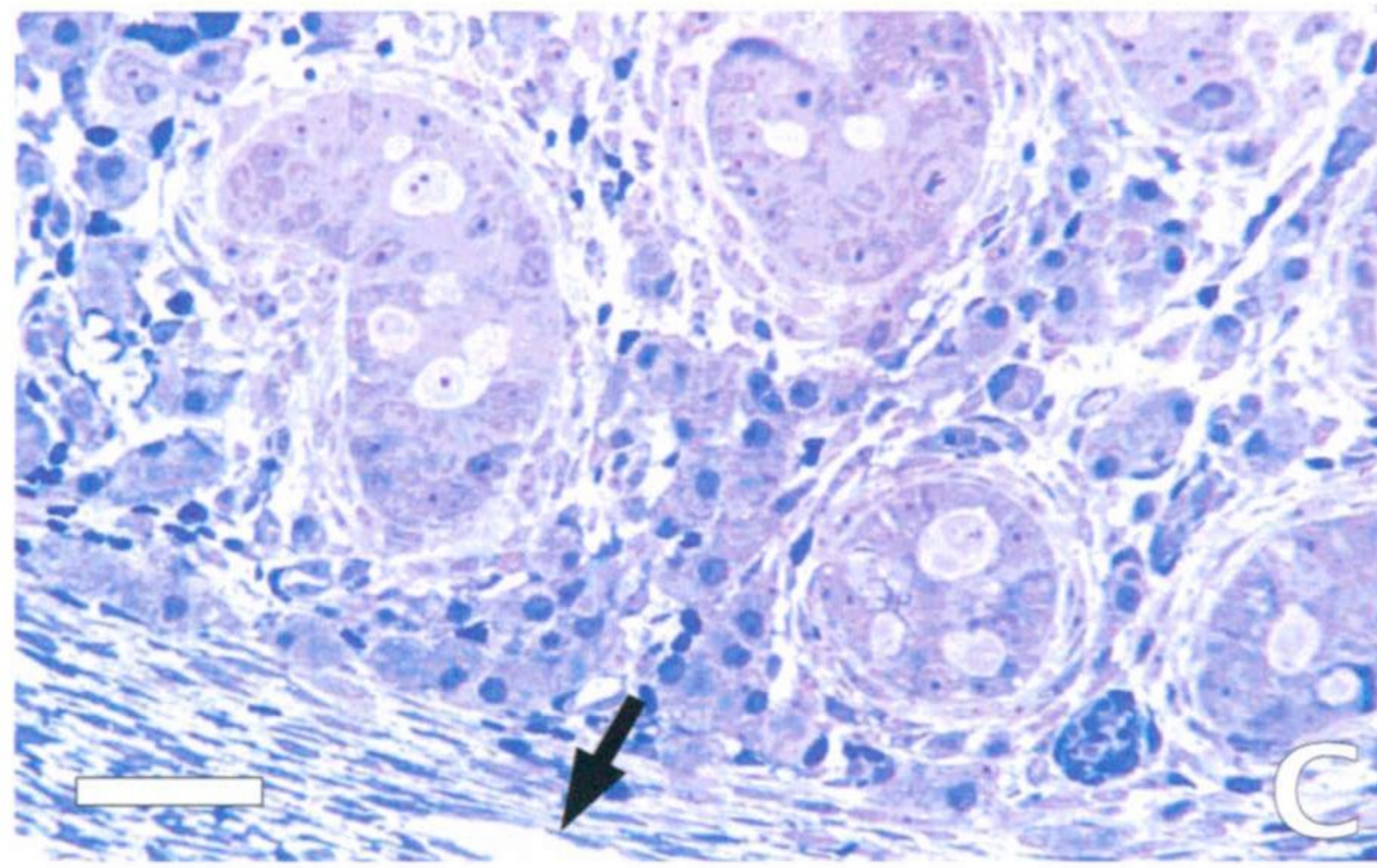
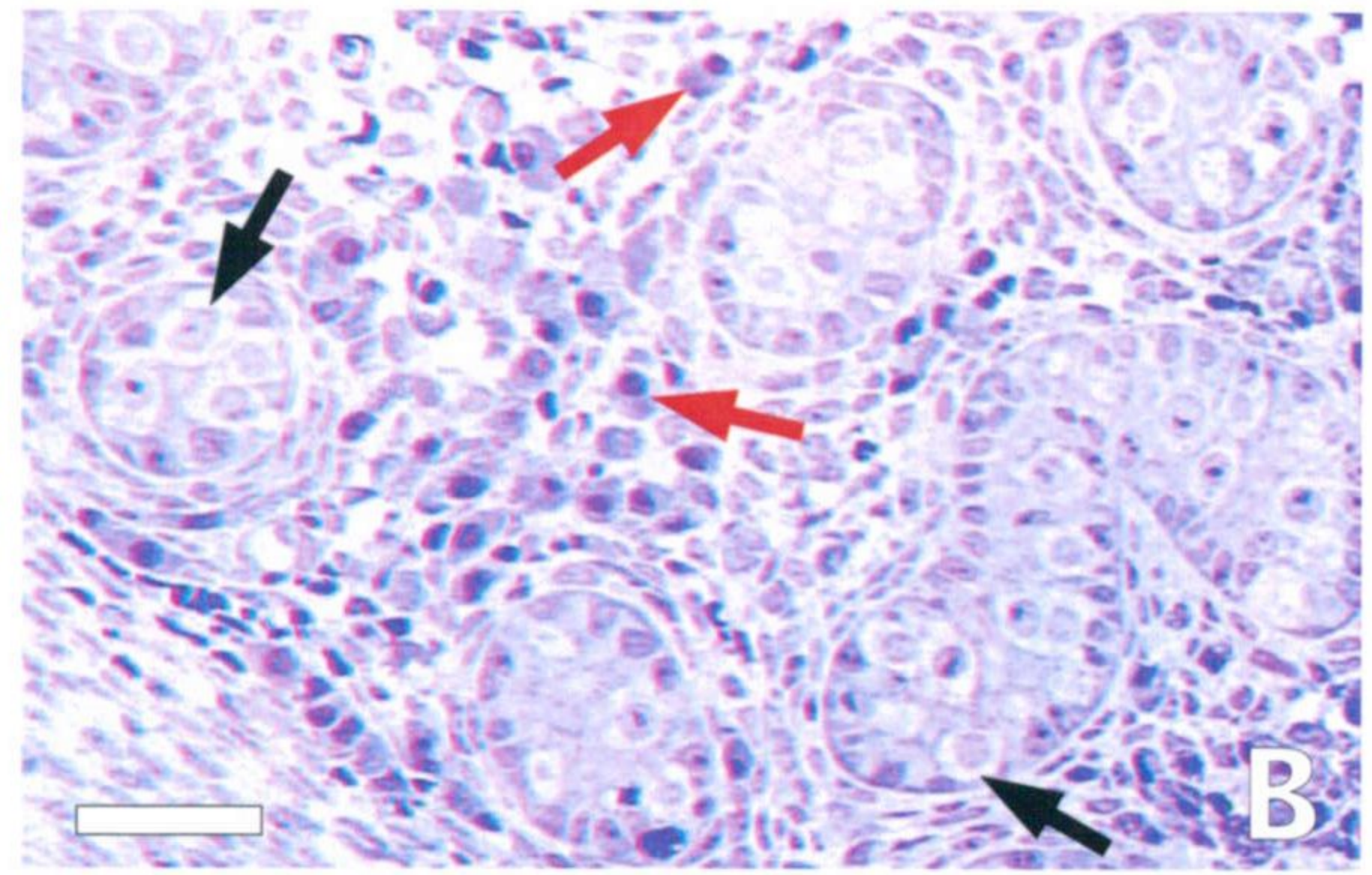
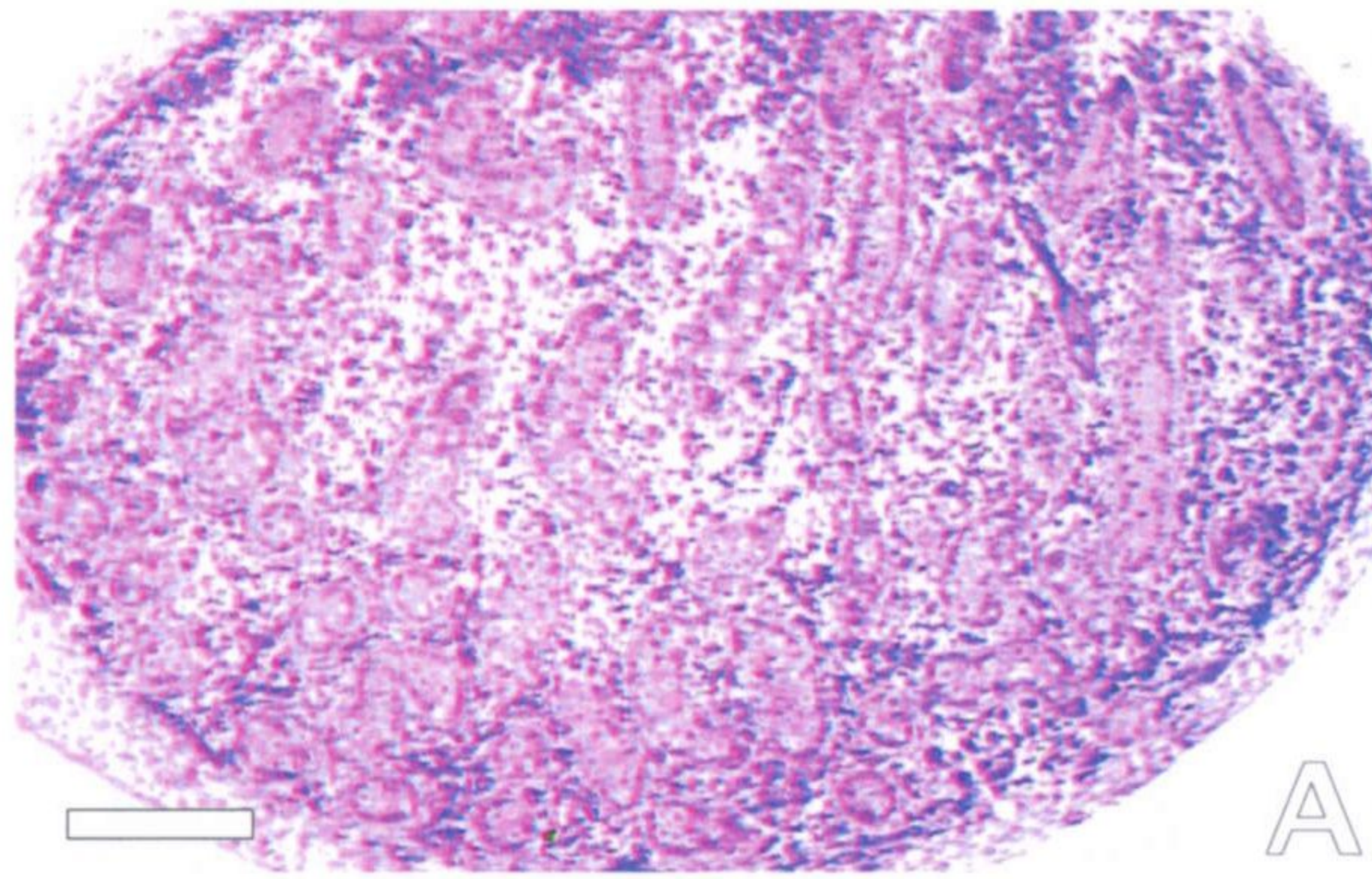
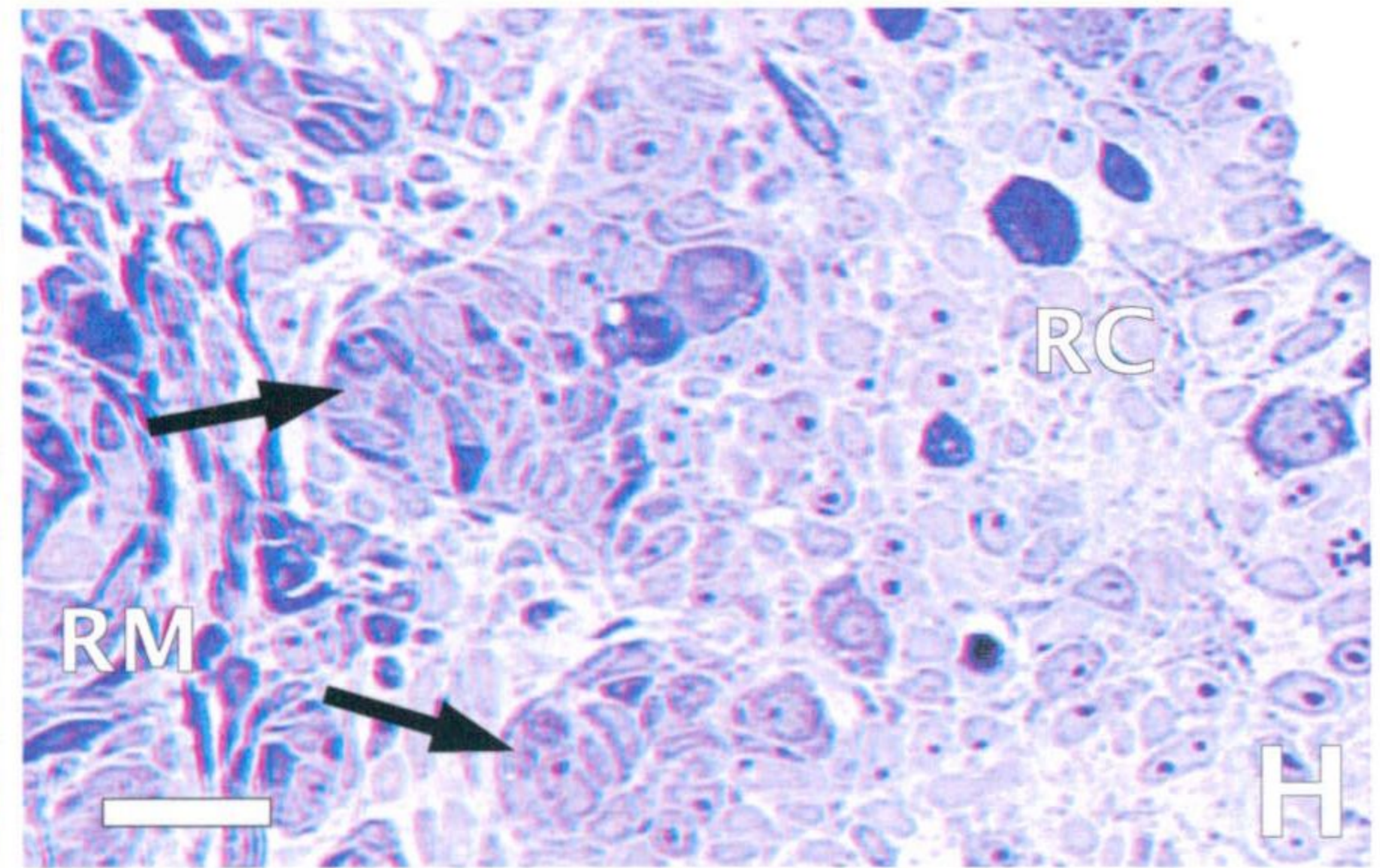
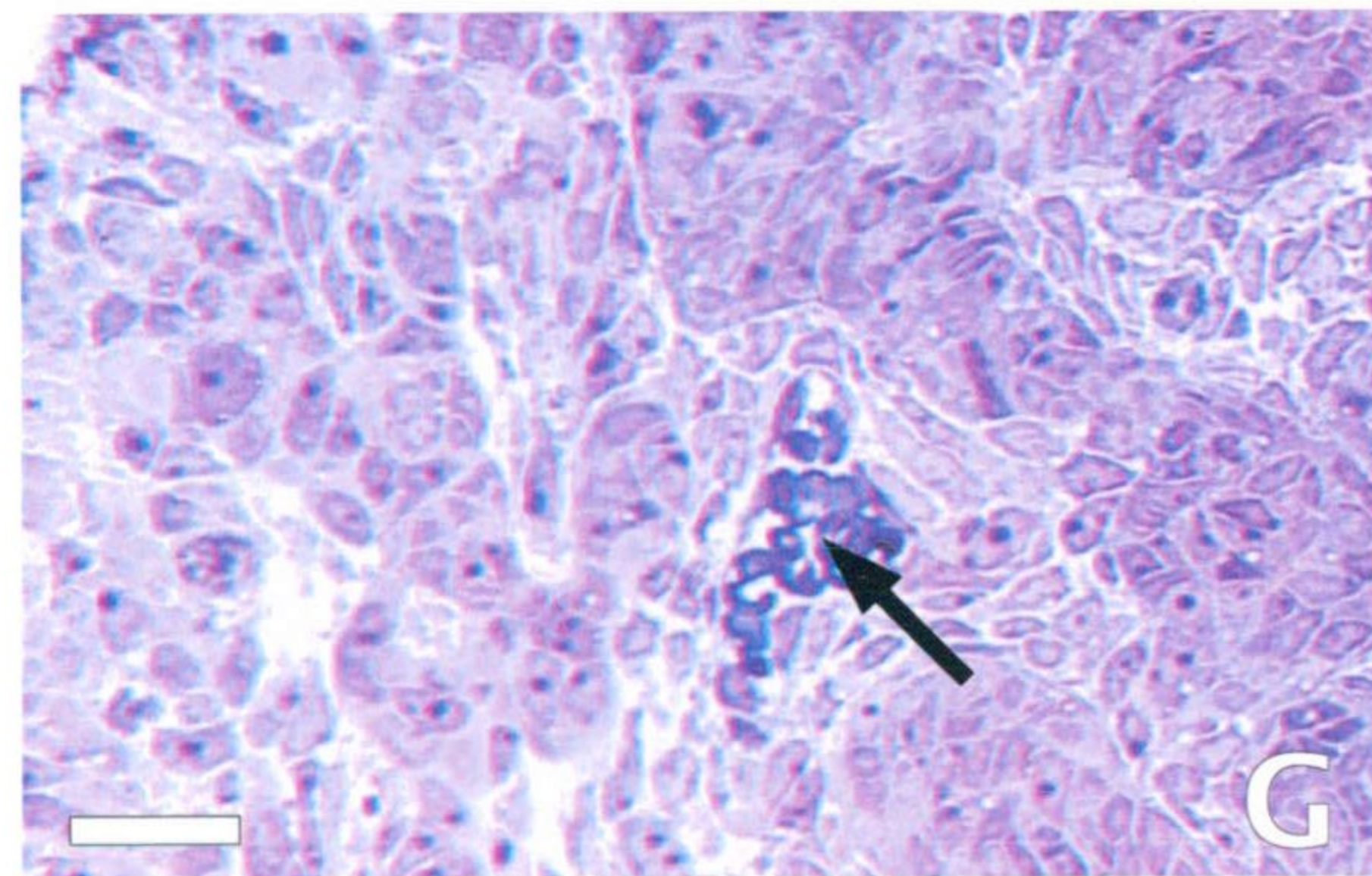
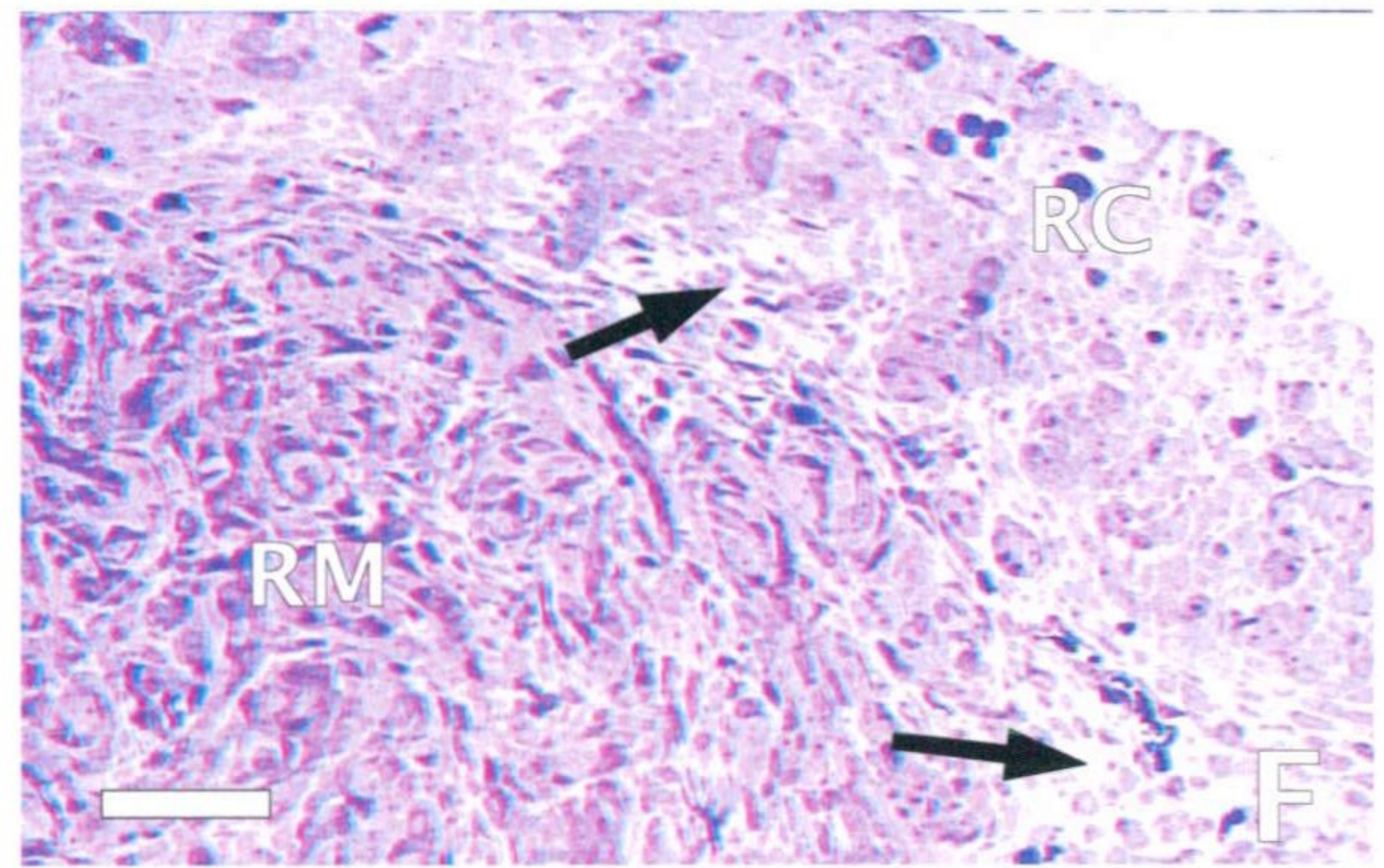
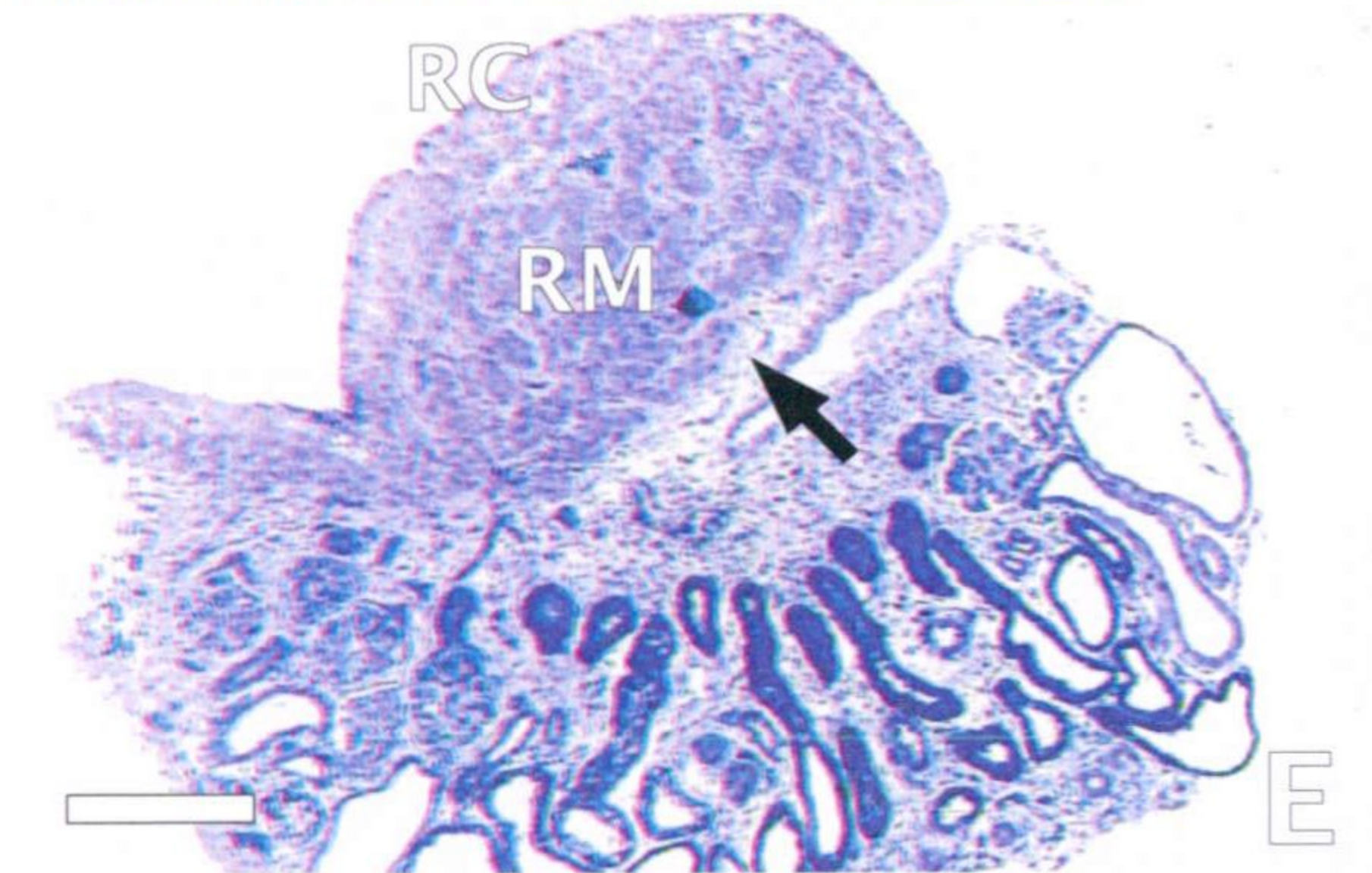
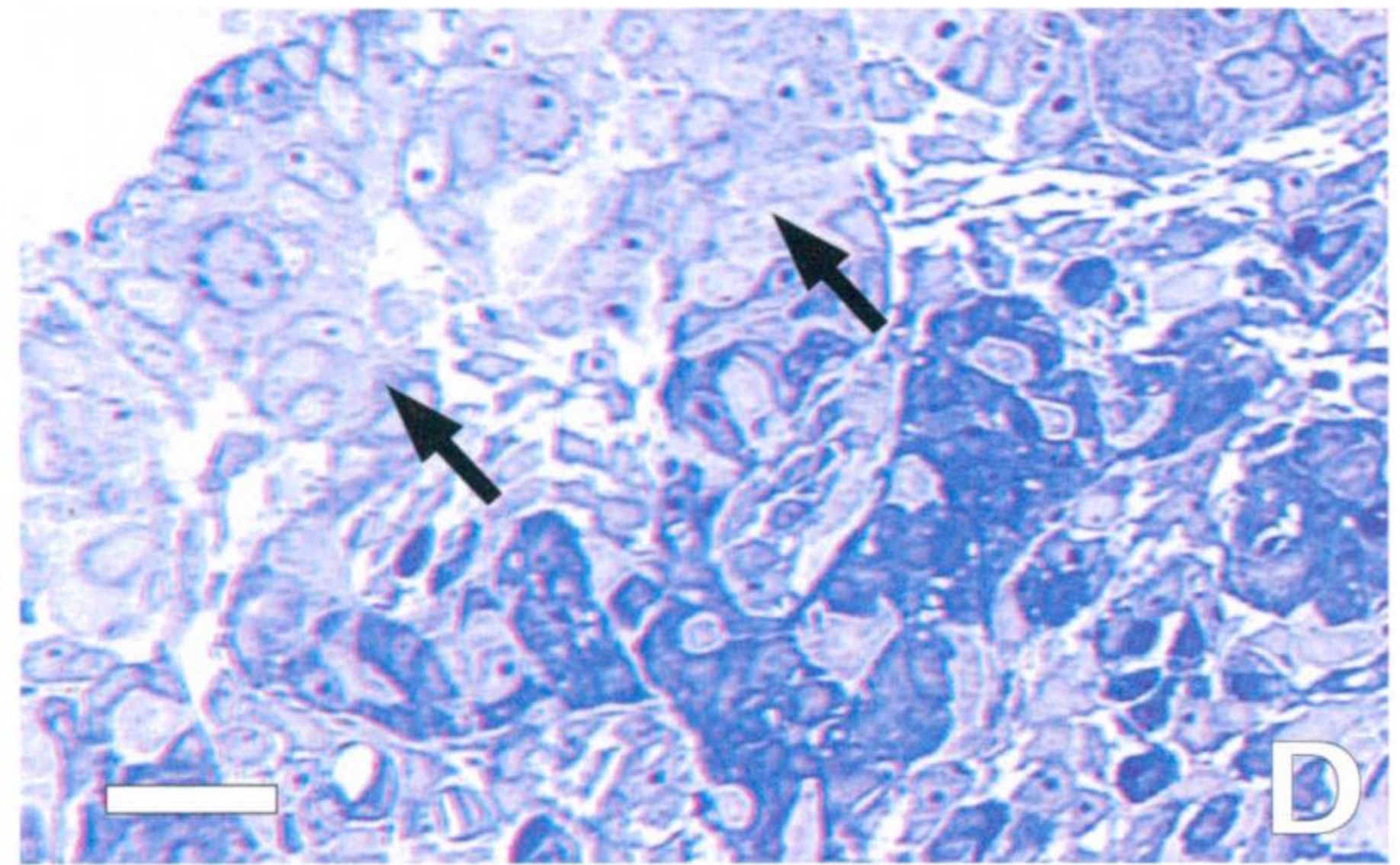
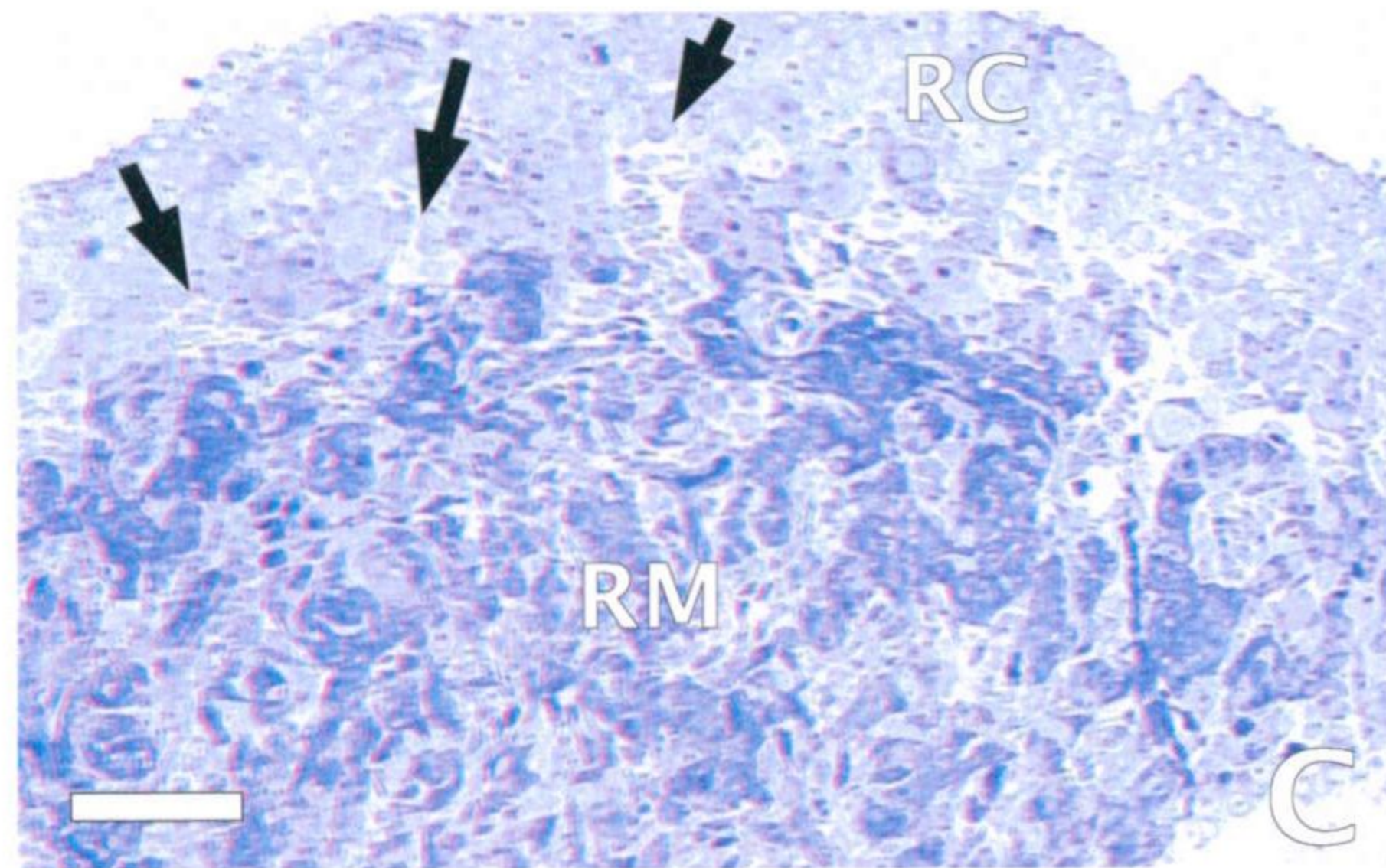
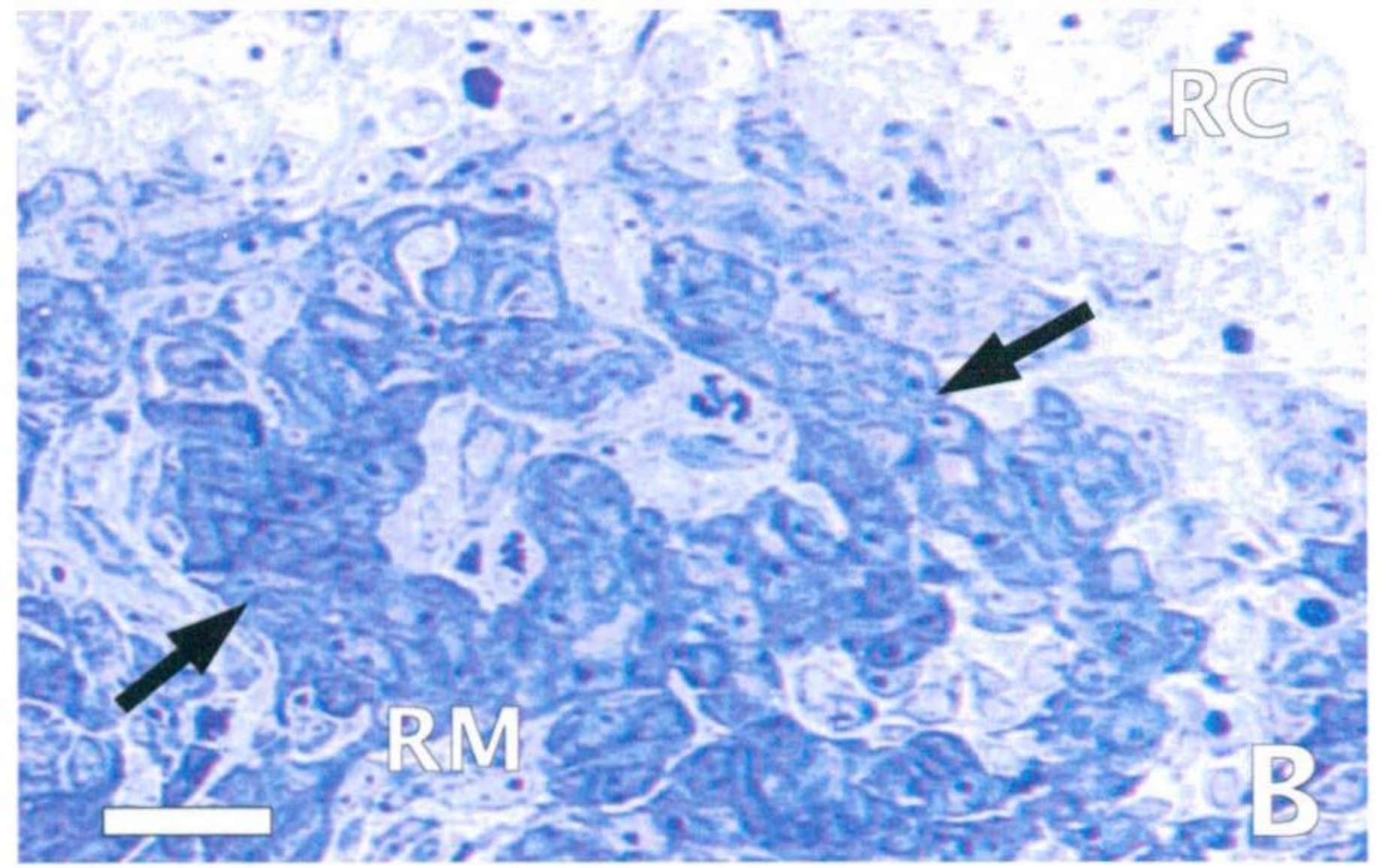
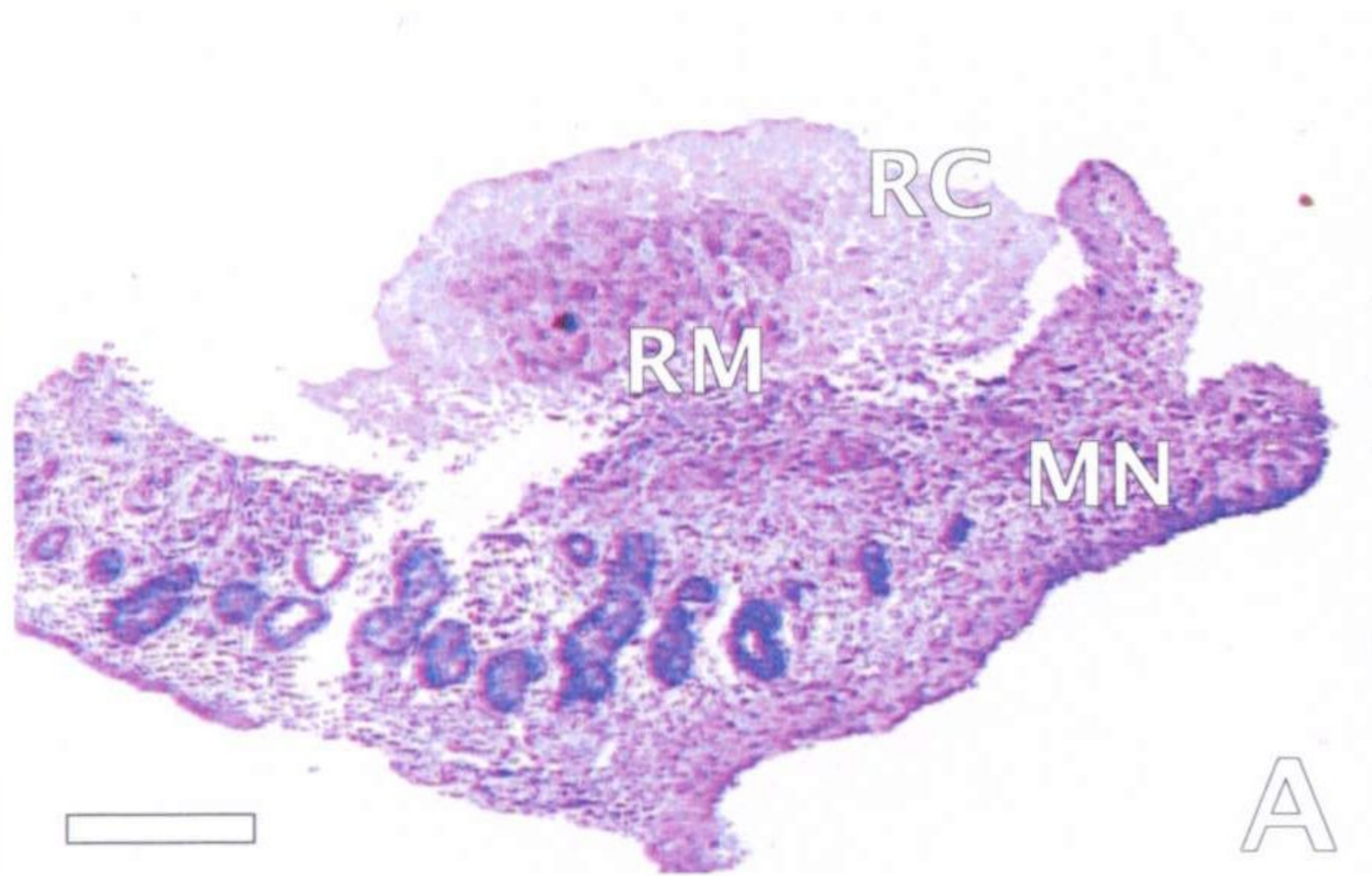


Fig. 12. Desarrollo temprano (estadios E5b-E6) de la gónada XX de *Talpa occidentalis*. En E5b, cuando se produce la diferenciación testicular en sus hermanos XY, las gónadas de los embriones XX de topo presentan unas características de desarrollo típicamente testiculares.

- A) A bajo aumento se diferencian una región cortical más clara (RC) y una región medular más densa (RM), aunque no se observa el septo mesenquimático que apareció en E5a (MN, mesonefros).
- B) A mayor aumento la gónada es muy similar a un testículo E5b: en la región medular (RM) se han formado numerosos cordones gonadales (flechas negras), separados por mesénquima; la región cortical (RC) carece de cordones y de mesénquima y está constituida por células epiteliales estrechamente adosadas entre sí, que engloban escasas células germinales.
- C) Durante E5c, las dos regiones de la gónada femenina, medular (RM) y cortical (RC), se distinguen claramente, aunque el tejido mesenquimático penetra ahora también la zona más profunda de la región cortical (flechas).
- D) Como consecuencia de ello, en esta zona profunda se forman cordones corticales carentes de células germinales (flechas), que se proyectan hacia la región medular y se transforman allí en nuevos cordones medulares.
- E) En E6 la región medular (RM), que ha crecido comparativamente más que la región cortical (RC), comienza a encapsularse con tejido mesenquimático procedente del mesonefros (flecha).
- F) En consecuencia, la zona fronteriza entre ambas regiones gonadales (RC y RM) contiene abundante mesénquima (flechas).
- G) Este mesénquima aporta numerosos capilares sanguíneos (flecha).
- H) En E6 continúa la proyección de cordones corticales hacia la región medular (flechas) (RC, región cortical; RM, región medular).

Imágenes obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Las barras representan 20 μm en B, D, G y H, 50 μm en C y F, y 150 μm en A y E.



RESULTADOS

diferencia de estos, los de la hembra están prácticamente desprovistos de células germinales. Además, su morfología es más irregular, siendo más contorneados y anastomosados, observándose frecuentemente continuidad entre varios de ellos (Fig. 12B). También como en la gónada masculina, la región medular ocupa la mayor parte del volumen, y empieza a estar irrigada por capilares sanguíneos. La región cortical es estrecha, aunque no tanto como en la gónada masculina. Como ocurre en el testículo de los machos, esta zona carece de cordones, ya que los agregados celulares no están rodeados por una lámina basal. Dada la ausencia de septo mesenquimático que existía en el estadio anterior, el límite preciso entre ambas regiones gonadales solo queda definido por dos características morfológicas: (1) los cordones medulares son más densos que la región cortical y (2) ésta tiene células germinales primordiales, y aquellos no (Fig. 12B).

En E5c la gónada femenina presenta ya un aspecto muy diferente a la masculina. La existencia de dos regiones es ahora muy patente. La región medular, que contiene numerosos cordones macizos, está abundantemente vascularizada, con capilares que la recorren en su totalidad. La región cortical no presenta vascularización alguna pero, en cambio, contiene casi la totalidad de las células germinales presentes en la gónada. Los cordones de esta región son ahora bastantes más patentes que en el estadio anterior, dado que en ocasiones se encuentran separados entre sí por travéculas de tejido mesenquimático que provienen de la región medular (Fig. 12C). Esto permite observar claramente que estos cordones corticales proyectan hacia la región medular masas de células somáticas de tipo epitelial que constituyen así nuevos cordones medulares. Estas células somáticas rápidamente adquieren la morfología típica de las células de los cordones medulares, aumentando considerablemente la densidad de su núcleo y su citoplasma. Junto a estas células somáticas migran rara vez células germinales, aunque en algunas ocasiones esto sí ocurre (Fig. 12D). Este hecho apoya claramente la idea de que los cordones medulares próximos a la región cortical, provienen realmente de cordones corticales. Además de esto, los cordones medulares más profundos probablemente llevan a cabo un proceso de proliferación, como se deduce del hecho de que en esta zona se observan abundantes figuras mitóticas. No obstante la actividad mitótica de éstas es muy inferior a la de las células germinales de los testículos de los machos del mismo estadio.

RESULTADOS

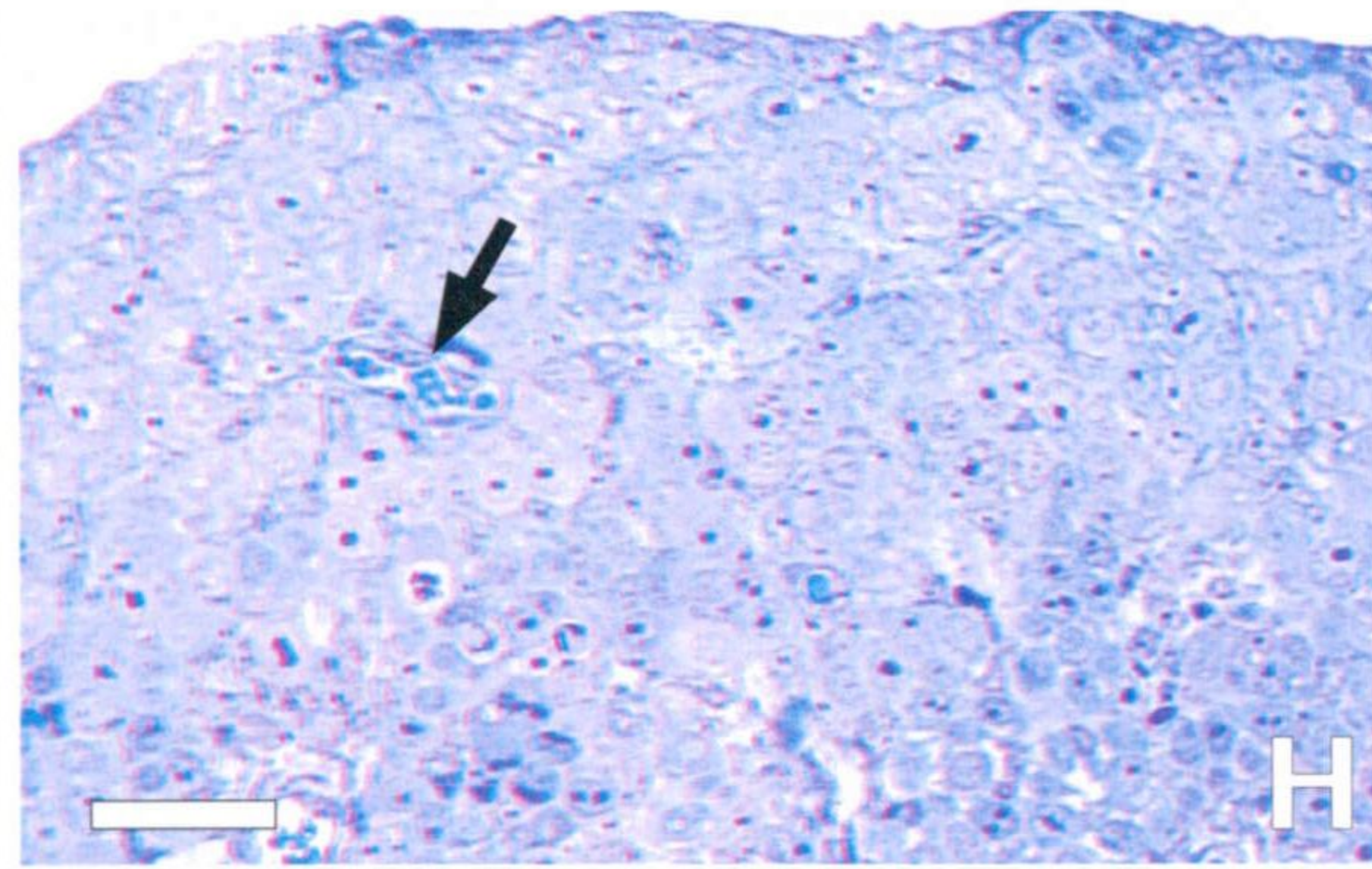
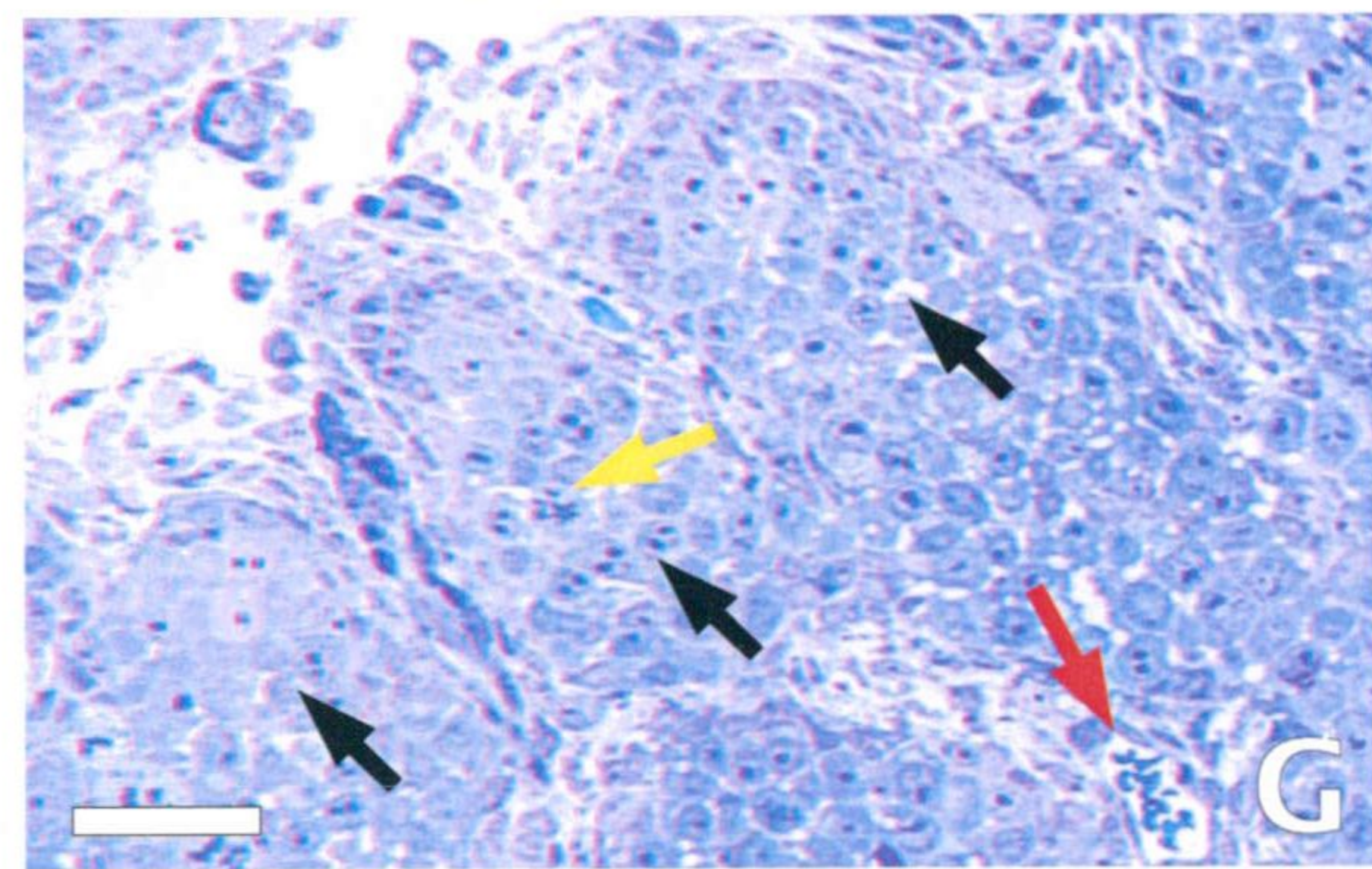
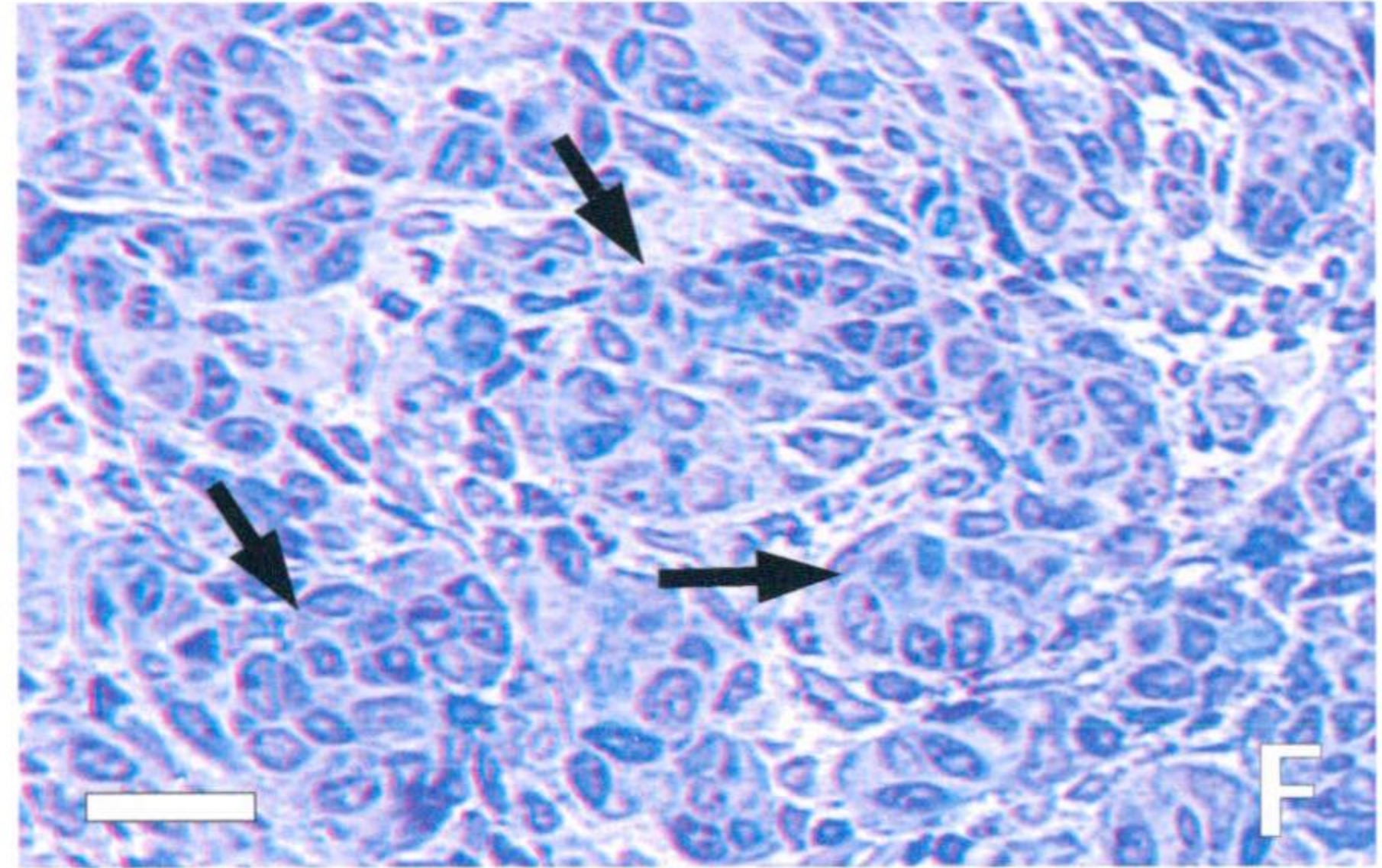
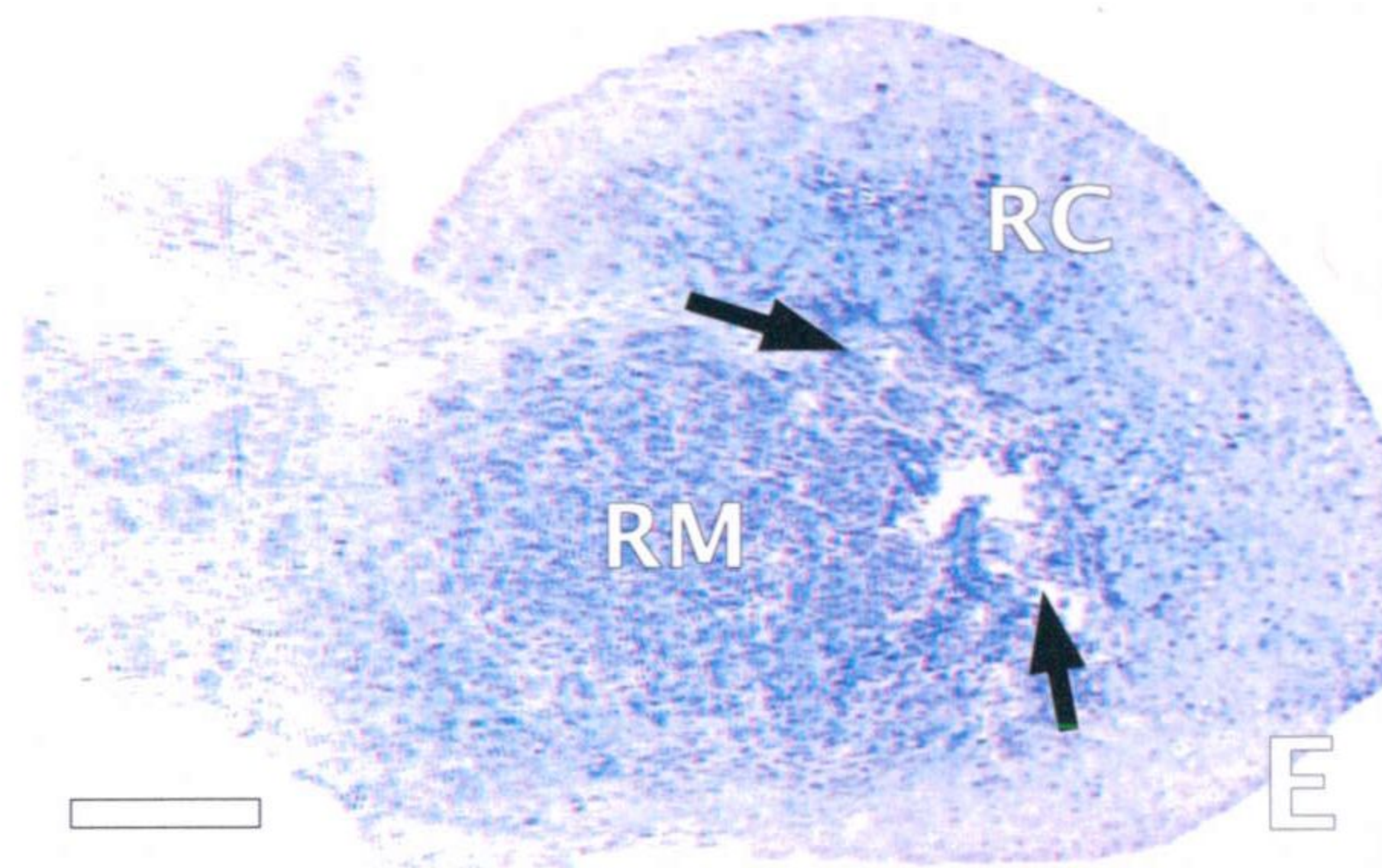
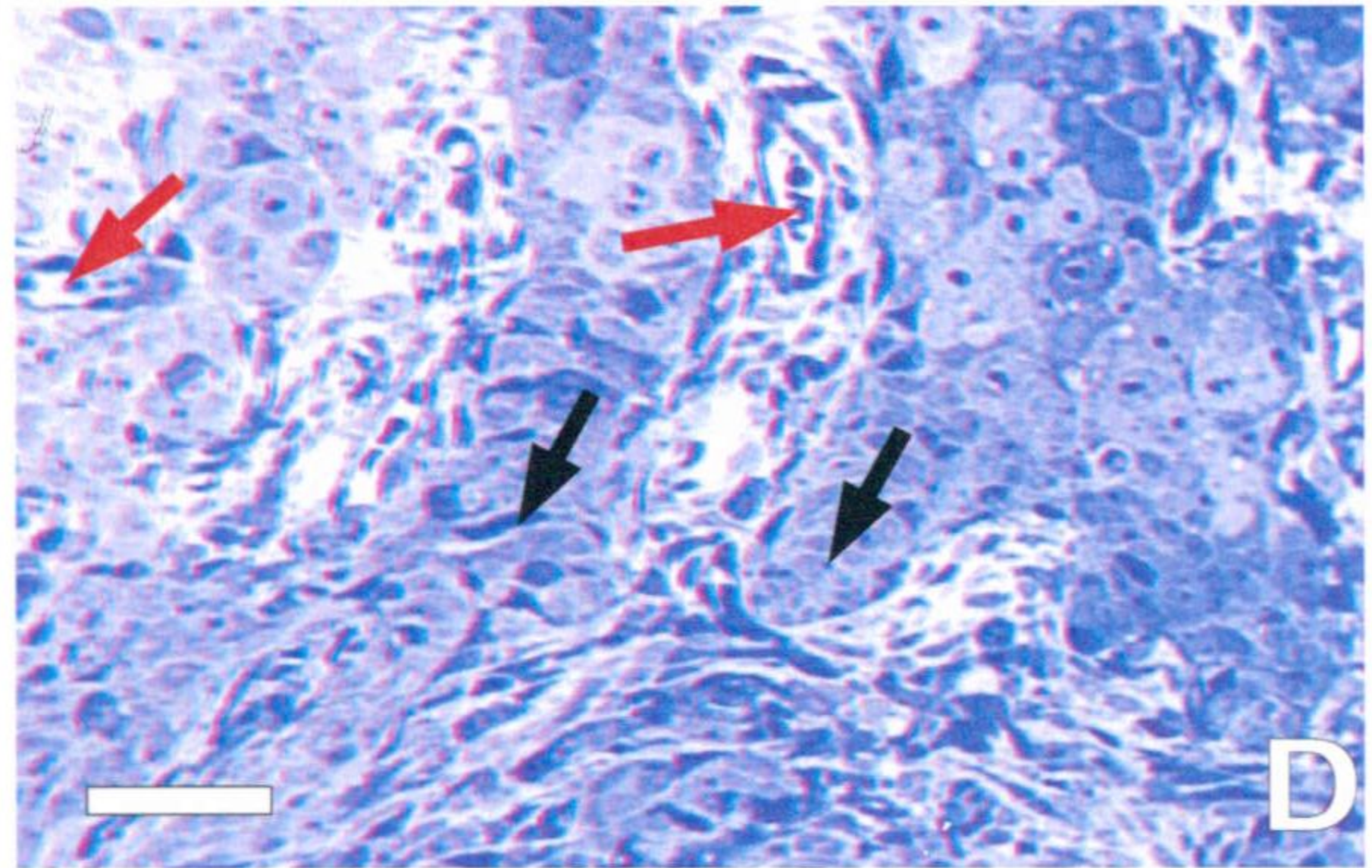
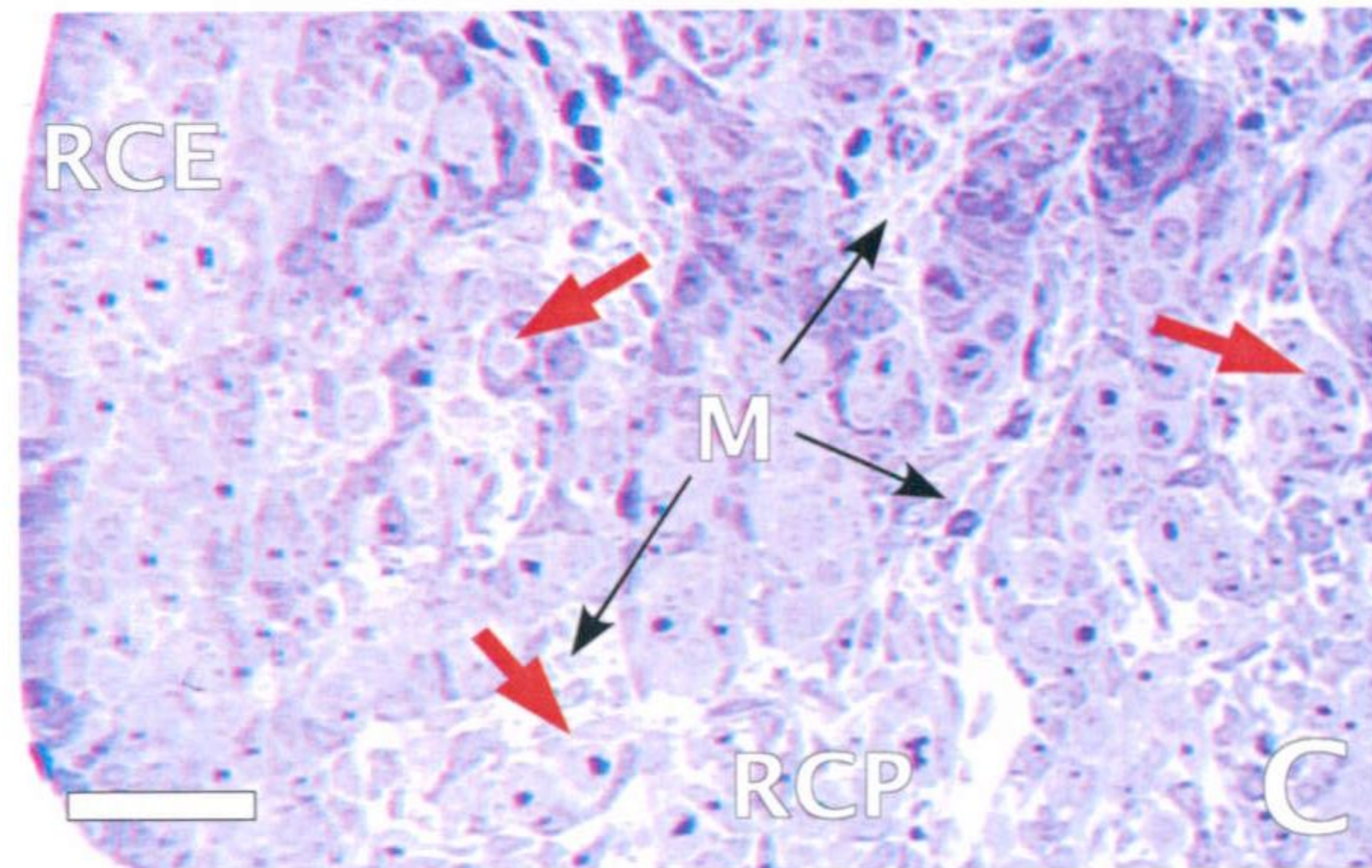
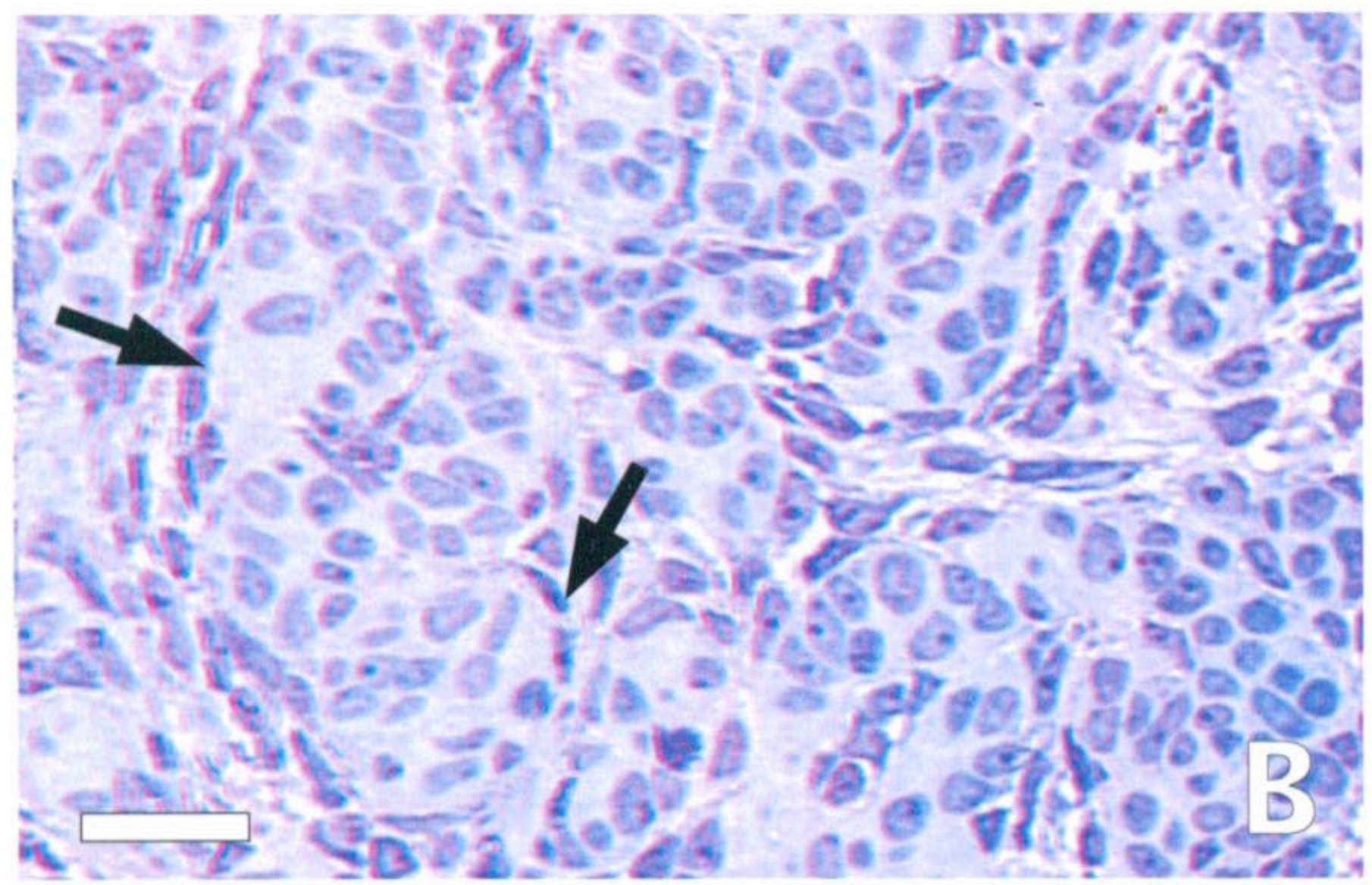
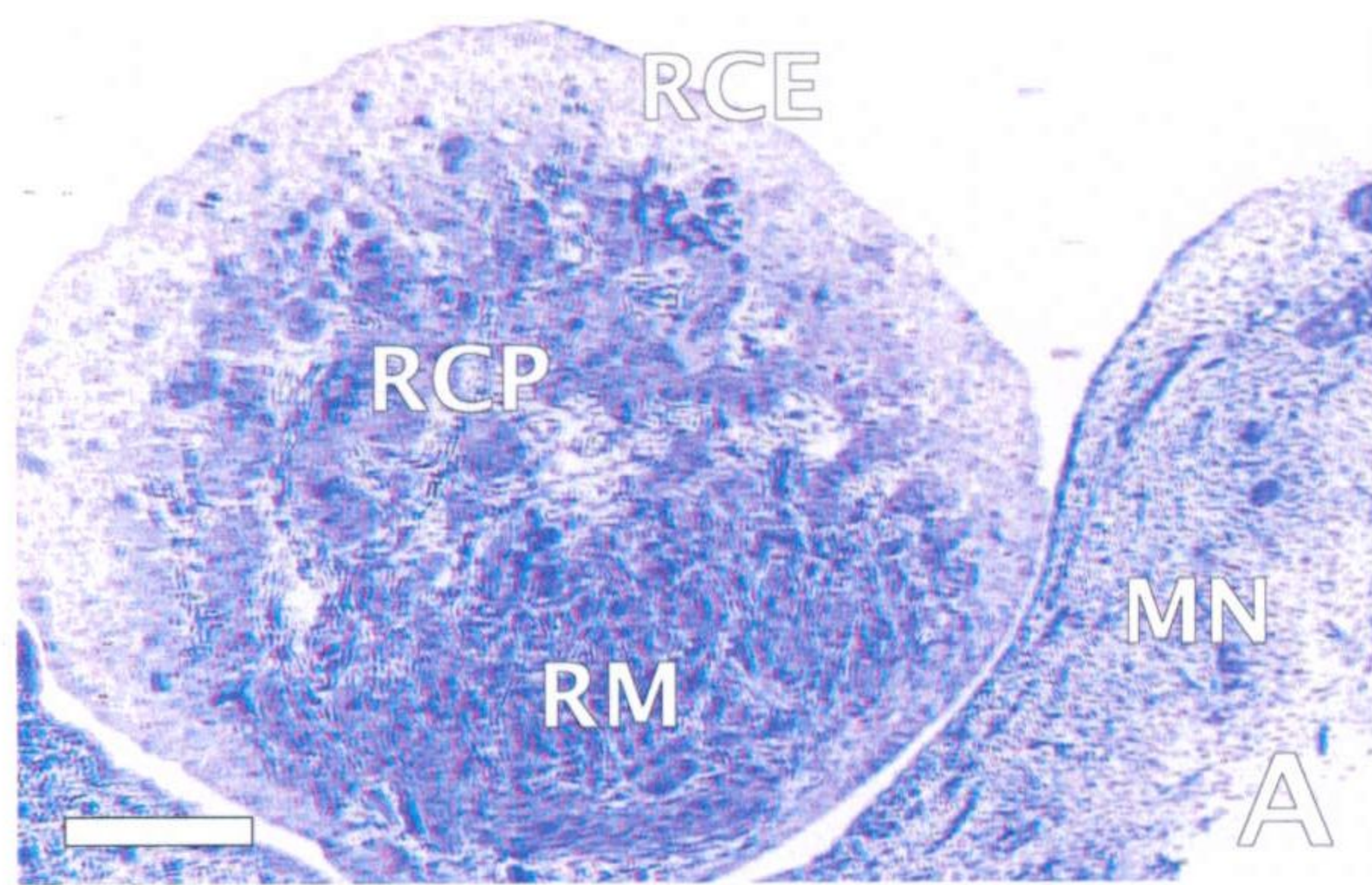
La separación entre las regiones medular y cortical es muy evidente en el estadio E6. Esta separación se acentúa por la formación de una capa de células mesenquimáticas provenientes del mesonefros, que comienzan así un proceso de encapsulamiento de la porción medular, que culminará en etapas posteriores (Fig. 12 E y F). En este tejido mesenquimático se desarrollan numerosos capilares sanguíneos (Fig. 12G). El mayor crecimiento relativo de la porción medular hace que la porción cortical aparezca como una envoltura parcial de aquella, adoptando en los cortes histológicos una morfología de media luna. Por otra parte, aunque la porción medular estaba situada entre el mesonefros y la porción cortical, ésta mantenía una zona de contacto con aquella por sus extremos. Sin embargo, este contacto entre la porción cortical y el mesonefros comienza a romperse en este estadio, mediante la formación de una escotadura que aparece en ambos extremos de la porción cortical. El cortex gonadal contiene la casi totalidad de las células germinales. Existe una gran variabilidad en cuanto al número de células germinales presentes en el cortex gonadal entre los individuos de este estadio, variabilidad que está asociada a la edad, de tal forma que los fetos de CRL=15 mm contienen muy pocas células germinales (5-10 por corte), mientras que en los fetos con CRL=16-18 mm. dicho número se ha multiplicado del orden de 4-5 veces. Esto es coherente con el hecho de que el número de células germinales que se observan en mitosis es muy elevado en estos individuos. Resulta evidente por tanto, que en este estadio se produce un proceso intenso de proliferación de las células germinales primordiales. Las que persisten en la región medular se encuentran agrupados en islotes, formados por unas pocas células aisladas del resto. La región medular presenta un aspecto muy similar al del estadio anterior, aunque su volumen es sensiblemente mayor. La formación de cordones medulares a partir de los corticales también resulta evidente en este estadio (Fig 12H). Por otra parte, el proceso de proliferación celular dentro de los cordones medulares es muy intenso.

En el siguiente estadio (E7) la gónada femenina comienza a tener forma ovoidea, y presenta notables transformaciones respecto al estadio anterior (Fig. 13A). Continúa el encapsulado de la porción medular de la gónada mediante la formación del septo de tejido mesenquimático que la separa de la región cortical. La región medular contiene cordones bien organizados, normalmente carentes de células germinales, aunque esporádicamente se

Fig. 13. Desarrollo prenatal tardío (estadios E7-E8) de la gónada XX de *Talpa occidentalis*.

- A)** En E7 la gónada femenina es un órgano claramente ovoideo, en el que se pueden diferenciar ahora tres regiones: una región cortical externa (RCE), una región cortical profunda (RCP) y la antigua región medular (RM) (MN, mesonefros).
- B)** La región medular es muy compacta y contiene células mioides rodeando los cordones medulares (flechas).
- C)** La región cortical externa (RCE) es clara, contiene pocas células germinales y no muestra cordones; la región cortical profunda (RCP) esta organizada en grandes cordones separados por abundante mesénquima (M) y contiene muchas células germinales (flechas rojas).
- D)** Los cordones corticales profundos continúan proyectando células somáticas hacia la región medular (flechas negras); en esta región abundan los capilares sanguíneos (flecha roja).
- E)** En E8, la gónada contiene una región medular (RM) claramente encapsulada en mesénquima (flechas), y una región cortical (RC) que ahora es de mayor tamaño que aquella.
- F)** En el centro de la región medular los cordones medulares comienzan a fragmentarse originando esférulas medulares (flechas).
- G)** La región cortical profunda contiene amplios cordones corticales (flechas negras) cargados de células germinales, muchas de las cuales están en mitosis (flecha amarilla), y separados por mesénquima que incluye vasos sanguíneos (flecha roja).
- H)** El cortex externo, que también contiene mesénquima y capilares sanguíneos (flecha), es más grueso que en estadios anteriores y contiene muchas más células germinales.

Imágenes obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Las barras representan 20 μm en B y F, 40 μm en C, D, G y H, y 150 μm en A y E.



RESULTADOS

puede ver alguno que encierra varias de ellas. La presencia de células de tipo mioide se hace patente en este estadio (Fig. 13B). Estas células poseen un núcleo más alargado y alineado alrededor de los cordones. Apenas se observan células en degeneración. En los cortes semifinos los cordones medulares se observan separados entre sí por un estroma mesenquimático. Este estroma es relativamente menos abundante que en estadios anteriores, de manera que ahora la mayor parte de la superficie del corte está ocupada por los cordones medulares. La región medular contiene numerosos senos venosos, con un incremento notable de su nivel de vascularización.

La región cortical presenta en este estadio una notable transformación en su estructura. En ella, por primera vez, se puede apreciar dos regiones que envuelven sucesivamente a la región medular a modo de media luna (Fig. 13A). En la región cortical más externa, poco densa, difícilmente se puede apreciar la existencia de estructuras cordonaes. Su contenido en células germinales no es muy elevado. En cierto modo recuerda a la organización de la región cortical de los estadios iniciales del desarrollo (Fig. 13C). La región cortical más profunda, situada entre la anterior y la región medular, muestra una estructura claramente diferente. Es extremadamente rica en células germinales, que ocupan la mayor parte de los numerosos cordones que la componen. Estos cordones tiene una morfología muy irregular, pudiendo ser largos o cortos, estrechos o anchos. También presentan frecuentes anastomosis entre ellos (Fig. 13C). Algunos de los cordones más profundos continúan proyectando células somáticas hacia la porción medular, aportando nuevos cordones medulares. Estos cordones de la región cortical son muy patentes debido a su gran densidad y al hecho de que están separados entre sí por abundante tejido mesenquimático. Como consecuencia de ello, abundantes capilares sanguíneos recorren por primera vez la región cortical de la gónada (Fig. 13D). La presencia del septo de tejido mesenquimático que separaba la región cortical de la medular en el estadio anterior sugiere que muchas de estas células mesenquimáticas han migrado hacia la región cortical, infiltrándose entre los cordones más profundos, separándolos y haciéndolos así más patentes. Estas nuevas travéculas de tejido mesenquimático alcanzan la región cortical más externa, pero nunca alcanzan el epitelio de superficie (Fig. 13D).

RESULTADOS

En el siguiente estadio, E8, la gónada es bastante más grande que en estadios anteriores. La evolución que sufre la región cortical a partir de este estadio provoca un cambio general en la morfología externa de la gónada. En estadios anteriores ésta tenía forma ovoidea o casi esférica, y contenía una región medular de forma similar y otra cortical que la envolvía en forma de media luna. A partir del estadio E8, la gónada pasa a tener una morfología bipartita, constituida por dos lóbulos adheridos entre sí. Uno de ellos, el que está adosado directamente a los restos del antiguo mesonefros está constituido por la región medular que aparece netamente encapsulada por tejido mesenquimático. El otro lóbulo lo constituye la región cortical, que ha cambiado su morfología, pasando de ser una especie de corteza que recubría a la región medular como una media luna, a ser un cuerpo de tamaño mayor que el de la porción medular, adosado a su cara opuesta al mesonefros (Fig. 13E).

Muchos de los cordones medulares muestran una estructura similar a la descrita en estadios anteriores. Sin embargo, muchos de estos cordones comienzan en este estadio un proceso de fragmentación y diferenciación que dará lugar a un tejido morfológicamente diferente. Este está compuesto por estructuras prácticamente esféricas constituidas casi exclusivamente por células somáticas, que en adelante llamaremos esférulas medulares. Este proceso de diferenciación se inicia en el centro de la región medular (Fig. 13F). Como veremos más adelante, este nuevo tejido es el precursor del tejido testicular, que ocupará definitivamente la mayor parte del ovoteste adulto de la hembra de topo. Se observan figuras mitóticas, y muy pocas células en degeneración. El epitelio de superficie adyacente a la región medular comienza a construir una verdadera túnica albugínea con varias capas de células aplanadas.

Las dos zonas componentes de la región cortical que habíamos descrito en el estadio anterior sufren ahora una evolución diferente. La región cortical más profunda presenta unas características generales muy similares a las ya descritas en el estadio anterior, a excepción de su mayor tamaño (Fig. 13G). El sistema de vascularización en esta zona es muy abundante, existiendo numerosos capilares y senos sanguíneos, que recorren y definen el límite entre la región cortical más profunda y la más externa. La región cortical más externa sufre cambios incluso más significativos (Fig. 13H). Su grosor es algo mayor que

RESULTADOS

en estadio anterior, y no aparece como una estructura desorganizada constituida por células somáticas y germinales que recuerde al primitivo blastema gonadal indiferenciado. Por el contrario, la región cortical más externa está formada por cordones corticales perfectamente organizados constituidos por células somáticas y germinales. El número de estas últimas aumenta considerablemente respecto al estadio anterior. Las figuras mitóticas son extraordinariamente abundantes en toda la región cortical.

DESARROLLO POSTNATAL DE LOS OVOTESTES EN INDIVIDUOS XX DE *T. occidentalis*

En los topos XX recién nacidos (estadio E9), la gónada muestra una morfología en la que se distinguen a simple vista las dos regiones gonadales, tal como ya ocurría en el estadio anterior (Fig. 14A). La región medular aparece casi completamente rodeada por mesénquima derivado del antiguo mesonefros. El proceso de fraccionamiento y diferenciación de los cordones medulares que comenzó en E8 se observa de una forma mucho más patente en E9 (Fig. 14B). La mayor parte de los cordones medulares se han transformado en esférulas medulares, quedando un grupo de cordones aún no diferenciados relegados a la porción medular adyacente a la cápsula de tejido conectivo que la envuelve. Este proceso de diferenciación de los cordones medulares en esférulas medulares no ocurre de manera simultánea en todos los cordones, sino que va ocurriendo de forma secuencial a modo de radiación, que parte del centro y avanza hacia la periferia. El considerable aumento de volumen que sufre la región medular en este estadio sugiere claramente que el proceso de fraccionamiento de los cordones medulares en estructuras esféricas va acompañado de un proceso de proliferación celular bastante acusado. La presencia de numerosas figuras mitóticas en esta zona corrobora esta idea. Además el tejido medular continúa siendo alimentado por nuevos cordones de células somáticas provenientes de los cordones de la región cortical más profunda.

La región cortical tiene un gran tamaño. Es claramente más voluminosa que la región medular. El número y la densidad de células germinales son extraordinariamente altos, siendo mucho más abundantes que las células somáticas. Los cambios ocurridos en

RESULTADOS

esta región cortical no permiten ya afirmar la existencia de dos zonas corticales bien diferenciadas (externa y profunda). Los cordones formados en la región cortical más externa en el estadio E8 han alcanzado tal grado de desarrollo que se confunden con los que constituían la región cortical más profunda (Fig. 14C). Esto se ve acusado por el hecho de que las proyecciones de tejido mesenquimático procedentes del septo de tejido que separa la región cortical de la medular casi han alcanzado el epitelio de superficie, lo que individualiza los cordones corticales externos, y los hace, por tanto, más similares a los más profundos.

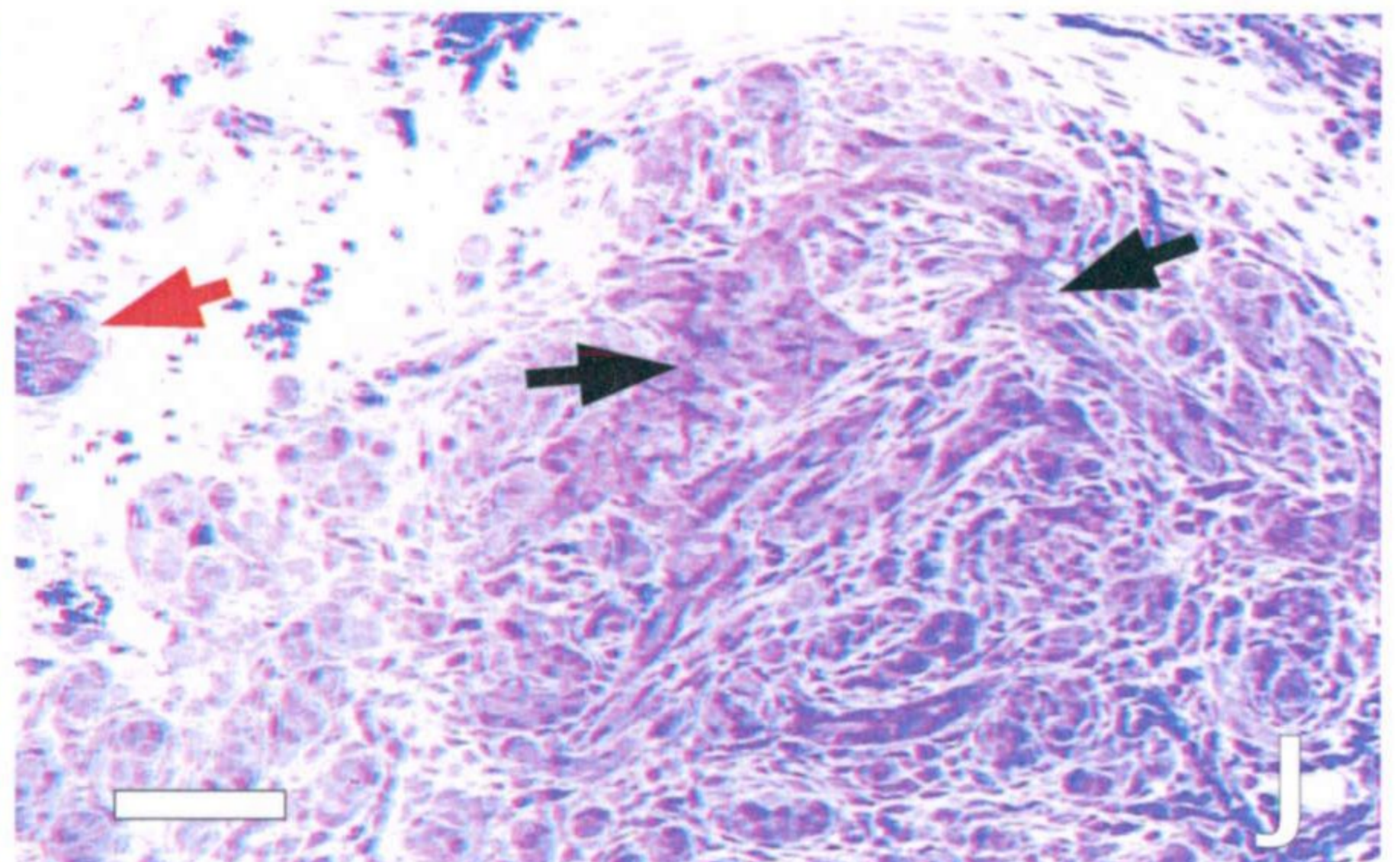
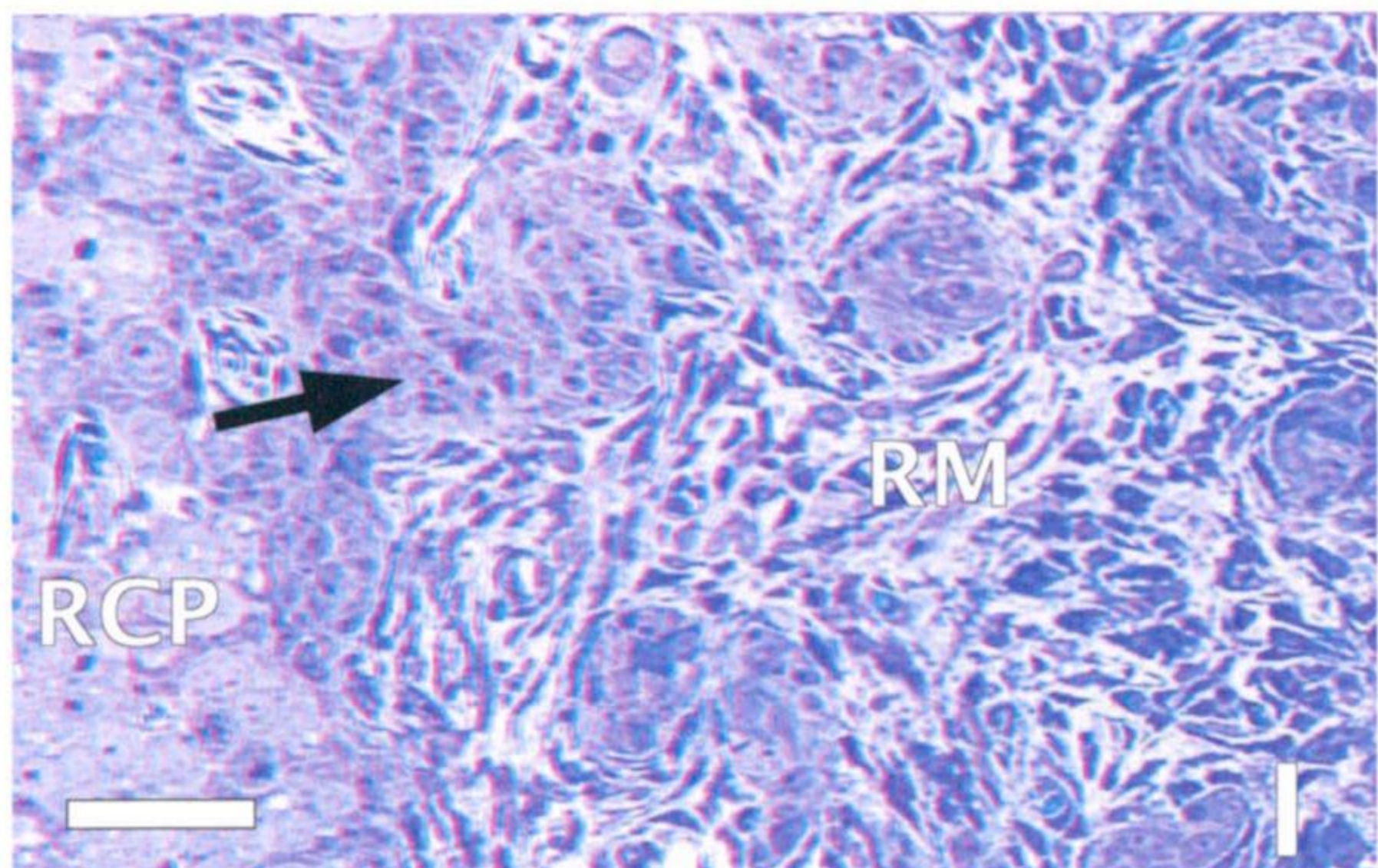
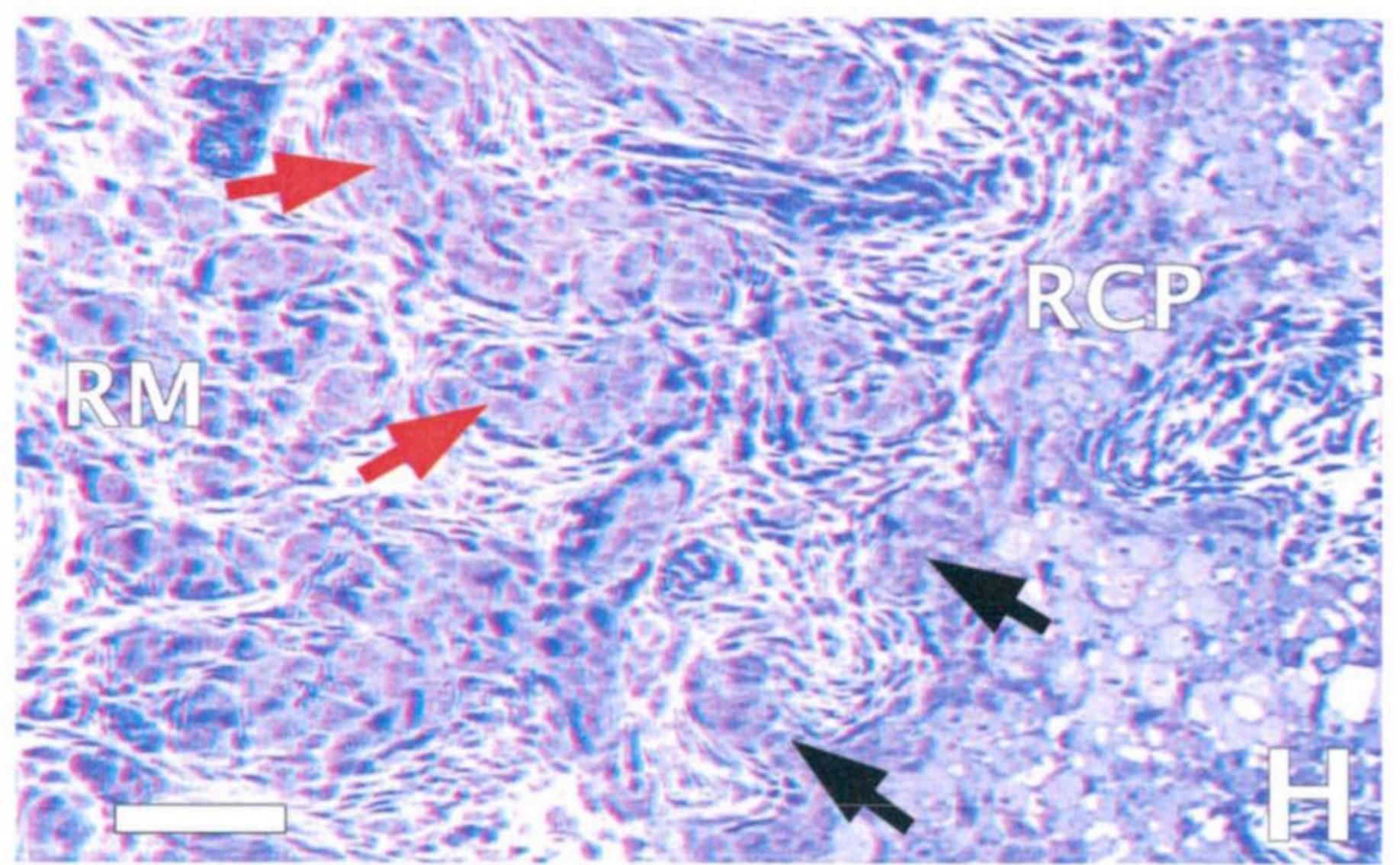
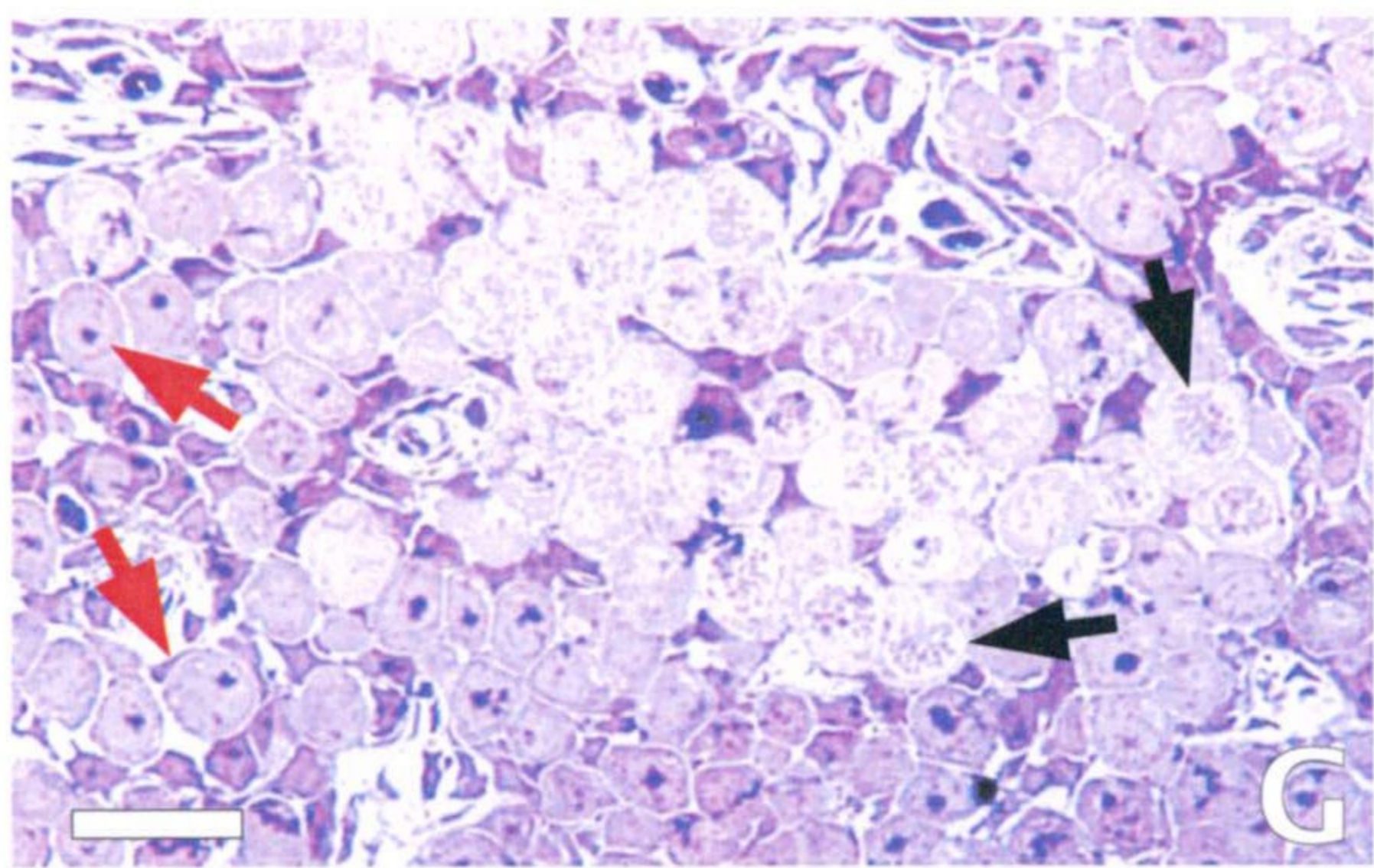
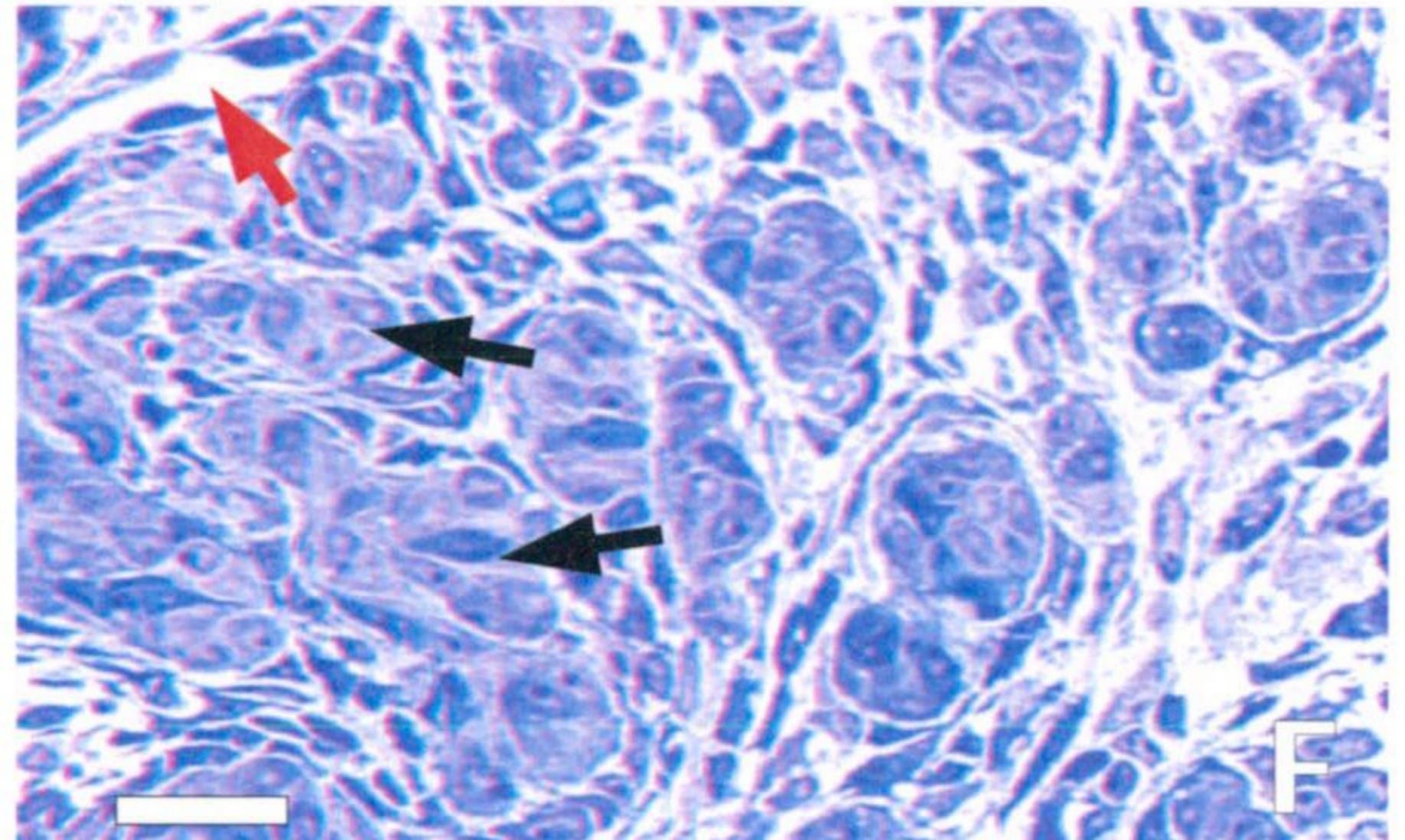
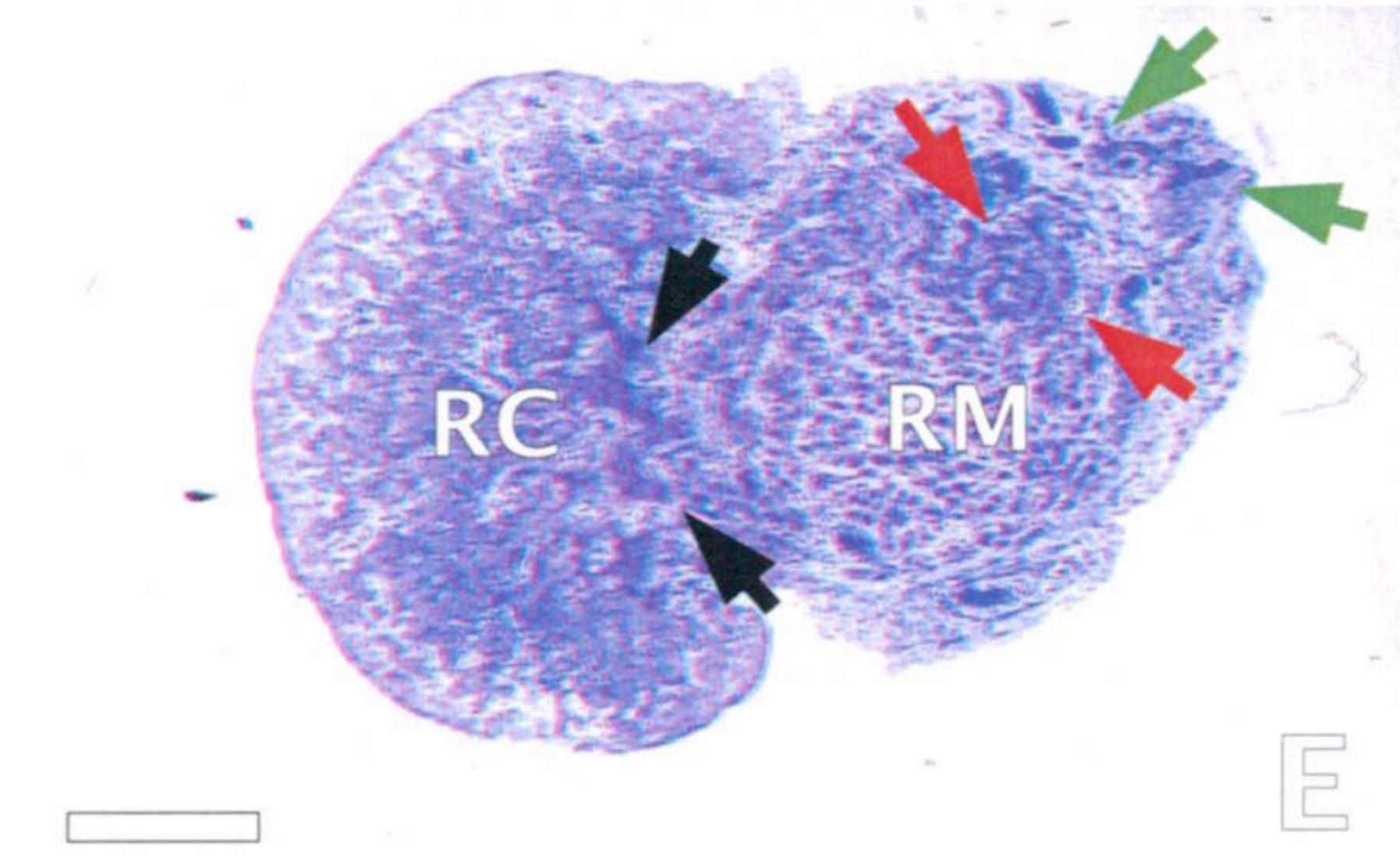
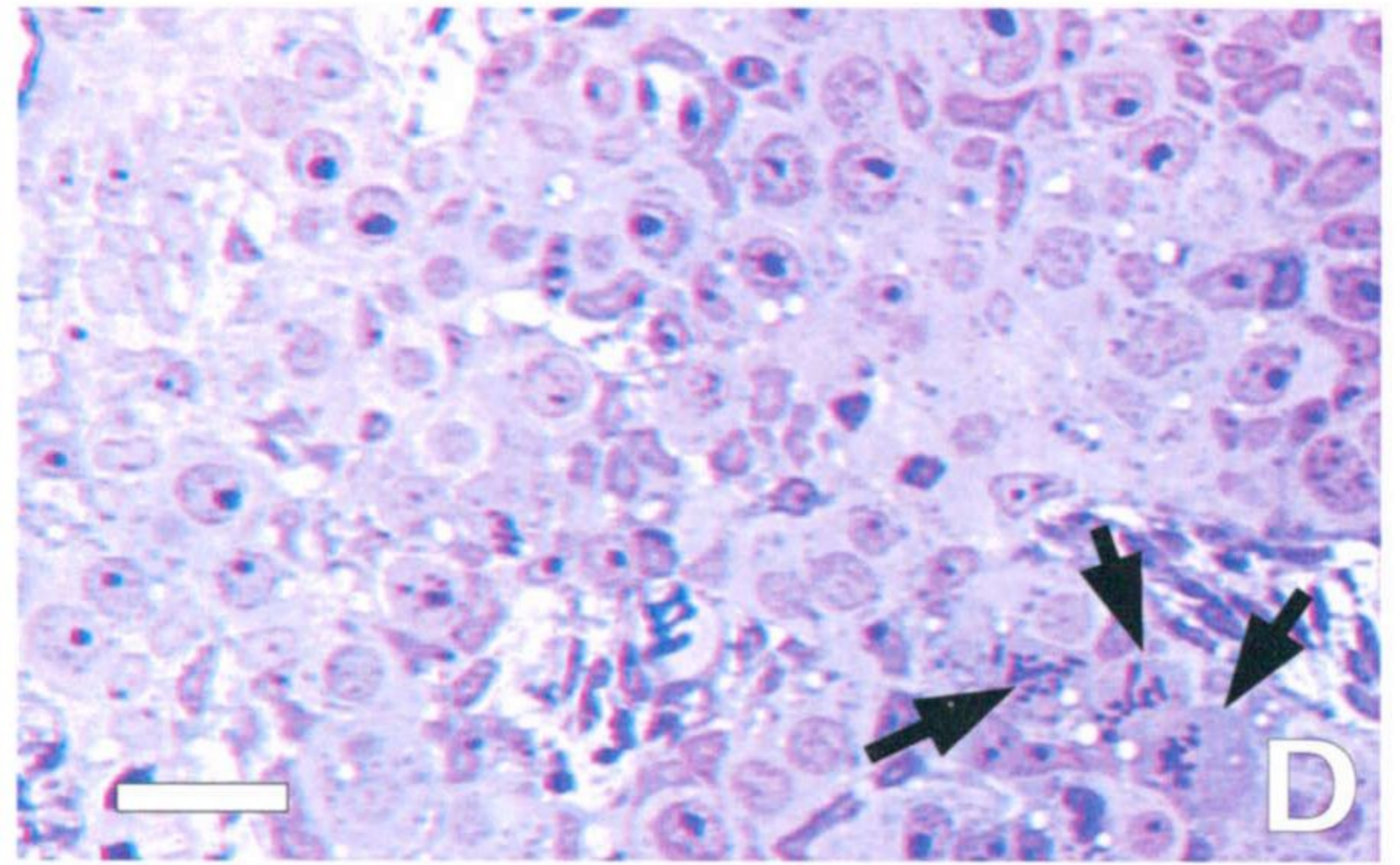
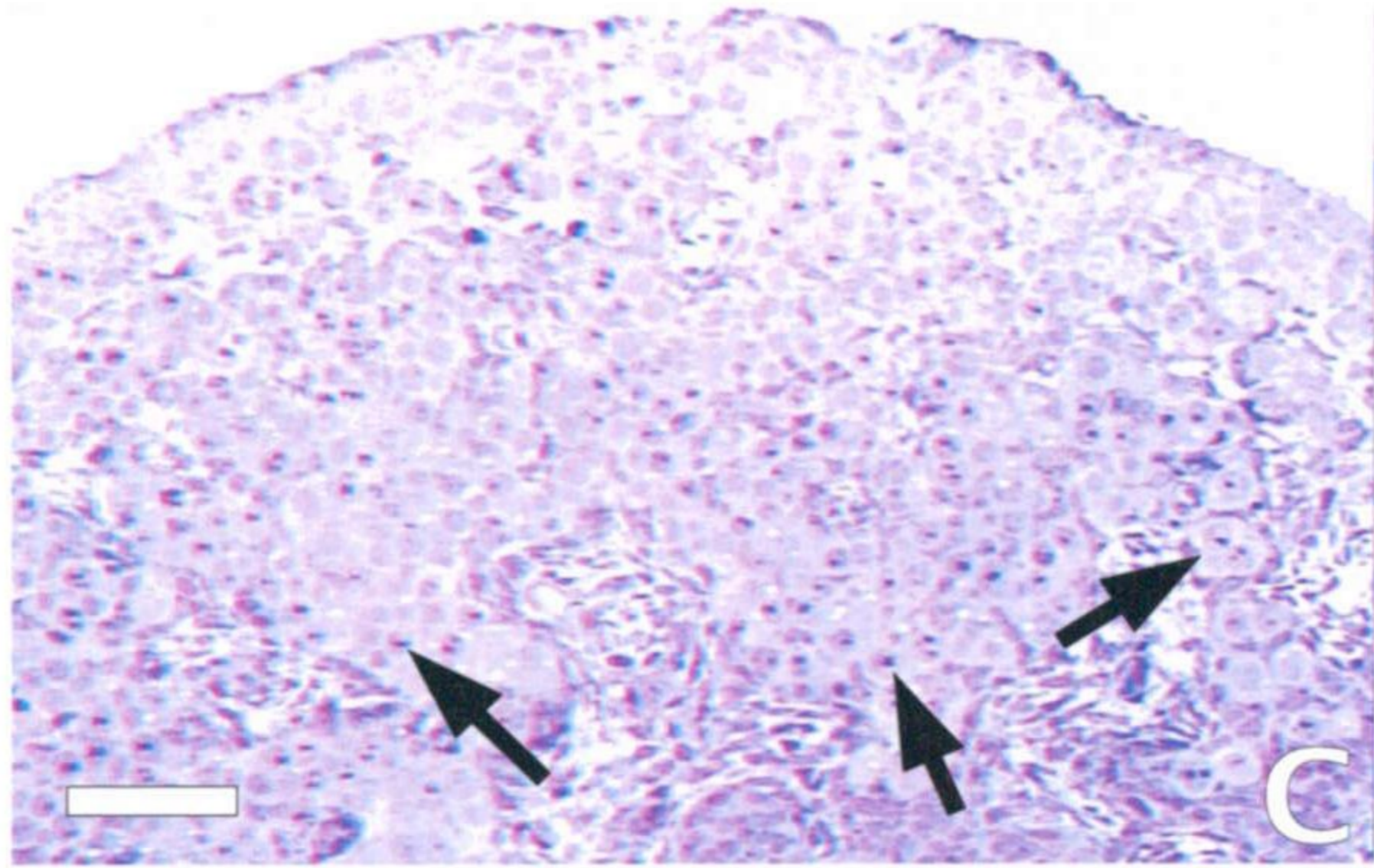
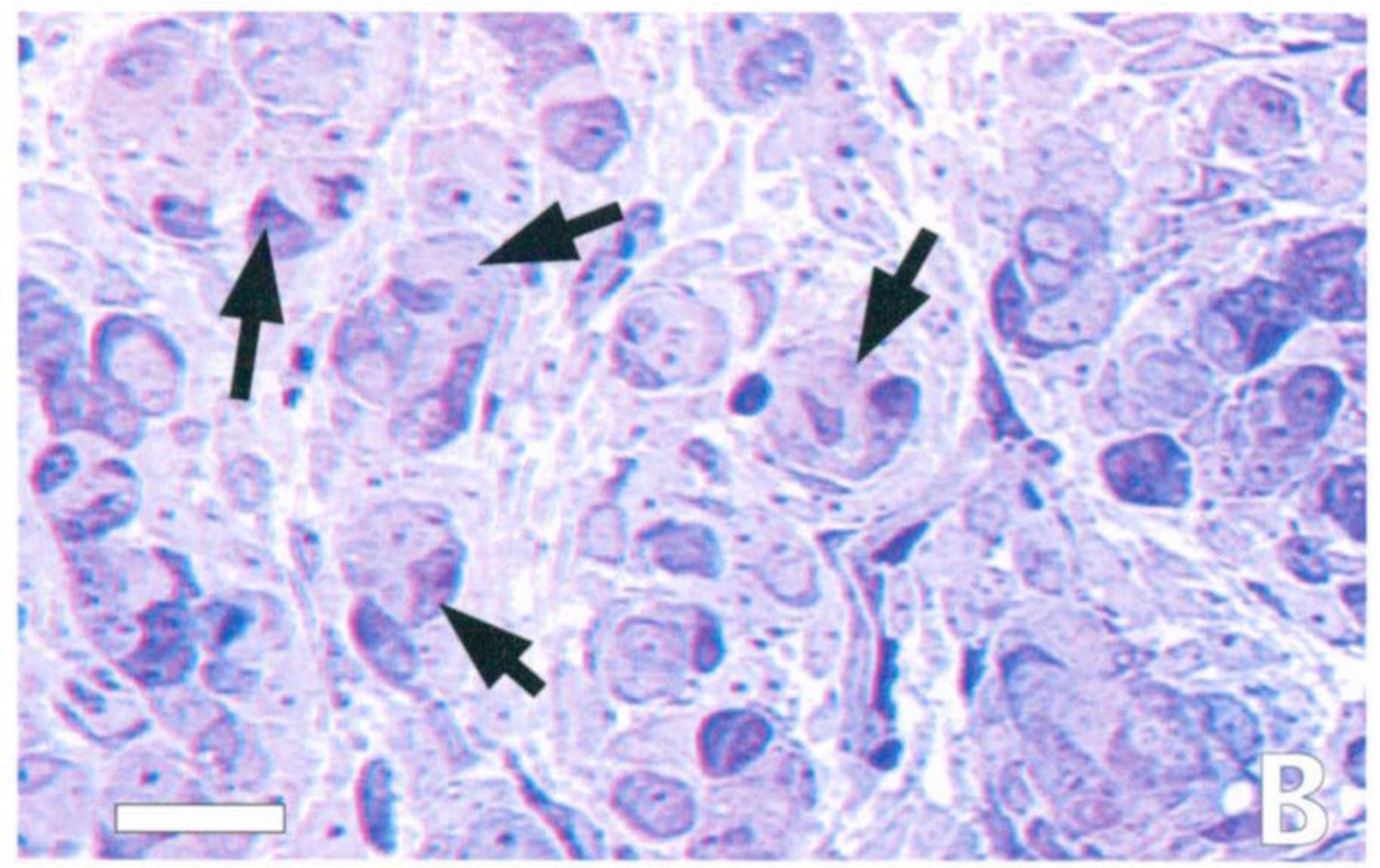
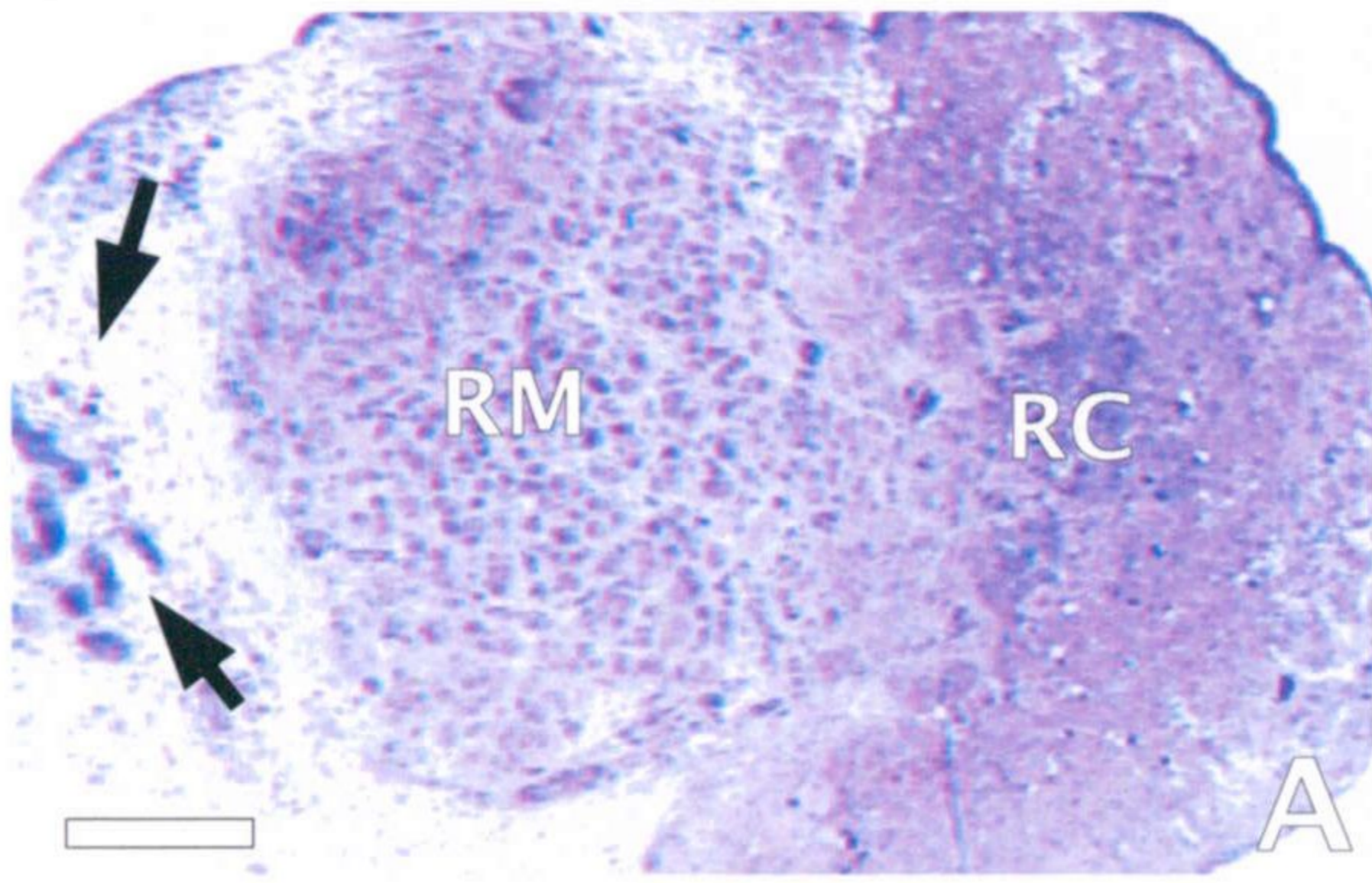
En la región cortical más profunda la cantidad de tejido mesenquimático es relativamente menor que en el estadio anterior debido a que los cordones corticales son mucho más gruesos y ocupan mayor superficie en los cortes. Esto es consecuencia del intenso proceso de proliferación descrito anteriormente, proceso que se ha detenido en este estadio. Las figuras mitóticas siguen siendo muy abundantes (Fig. 14D).

En el siguiente estadio (E10), la gónada femenina presenta una estructura claramente bipartita, formada por dos lóbulos similares en tamaño, que corresponden a la región cortical y la nueva región medular. Esta se encuentra completamente encapsulada por una gruesa pared de tejido conectivo excepto por la zona central de contacto con la región cortical. Este tejido conectivo está constituido por la totalidad de los restos del antiguo mesonefros. En su seno se observan todavía algunas estructuras mesonéfricas, como restos de canalículos, y sobre todo el antiguo Conducto de Wolff, ya bastante reducido en diámetro, y carente de luz (Fig. 14E). La mayor parte del volumen de la región medular está ocupado por esférulas medulares. No obstante, aun persiste un grupo de los antiguos cordones medulares que no se han diferenciado. Este grupo de cordones ocupa una posición lateral y periférica, generalmente adyacente a los restos del Conducto de Wolff (Fig. 14E). Además, existe otro grupo de cordones medulares situados en la zona fronteriza con la región cortical. Estos cordones son los recién formados a partir de los cordones corticales, y su vigencia es transitoria, ya que rápidamente se transformarán en esférulas medulares. Como ya se ha descrito previamente estas esférulas carecen de células germinales. En este estadio, las esférulas medulares presentan un mayor desarrollo, estando constituidos por un mayor número de células, que conforman una morfología esférica

Fig. 14. Desarrollo postnatal temprano (estadios E9-E10) de la gónada XX de *Talpa occidentalis*.

- A)** En los topos XX recién nacidos (E9) la gónada tiene una estructura claramente bipartita, compuesta por una gran región cortical (RC) unida por su parte central a la región medular (RM), que se asocia a su vez a los restos del antiguo mesonefros (flechas).
- B)** En la región medular, casi todos los cordones medulares se han fragmentado, originando numerosas esférulas medulares, precursoras de las futuras esférulas testiculares del ovoteste adulto (flechas).
- C)** En la región cortical, la zona profunda con muchas más células germinales (flechas negras) no es ya tan diferente de la zona externa.
- D)** El número de células germinales ha aumentado muy considerablemente debido a la intensa proliferación que tiene lugar en este estadio (flechas: células germinales en metafase mitótica).
- E)** Las dos partes que componen la gónada XX se aprecian ya muy claramente en E10. En el área fronteriza entre la región medular (RM) y la región cortical (RC), existe un grupo de cordones medulares recién formados a partir de los cordones corticales más profundos (flechas negras); en el polo opuesto, también en la región medular, existe otro grupo de cordones medulares antiguos que no se han fragmentado en esférulas medulares (flechas rojas) y permanecen en la periferia, adyacentes a los restos del conducto de Wolf (flechas verdes).
- F)** En la región medular, la mayor parte de los cordones medulares se han fragmentado, originando así nuevas esférulas medulares; aquí se observa este proceso (flechas negras). El mesénquima es muy abundante y contiene numerosos capilares y vasos sanguíneos (flecha roja).
- G)** En E10 comienza la meiosis en muchas células germinales de los cordones corticales más profundos, las cuales se observan en leptotene-zygotene (flechas negras), aunque otras muchas no lo hacen hasta más tarde, continuando en interfase (flechas rojas).
- H)** Los cordones de la región cortical más profunda (RCP) continúan proyectando masas de células somáticas (flechas negras) hacia la región medular (RM), originando nuevos cordones medulares (flechas rojas).
- I)** Detalle a mayor aumento del fenómeno anterior (flecha).
- J)** Un grupo de antiguos cordones medulares no fragmentados (flechas negras) persiste en el polo de la región medular opuesto a la región cortical; este grupo se observa generalmente adyacente a los restos del antiguo conducto de Wolf (flecha roja). Imágenes obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina.

Las barras representan 20 μm en B, D, F y G, 40 μm en I, 50 en C, H y J, 150 μm en A, y 250 μm en E.



RESULTADOS

mejor definida. Estas estructuras continúan rodeándose de células aplanadas de tipo mioide (Fig. 14F). También aquí comienzan a producirse la organización de las esférulas medulares en lóbulos que engloban a grupos de ellos que tienden a rodearse de travéculas de tejido conectivo. En el mesénquima de esta región medular algunas células comienzan a adquirir la morfología de las células de Leydig de un testículo, aunque estas son aún muy escasas. Dentro de las esférulas medulares se observan casi exclusivamente células somáticas cuyo aspecto, al microscopio óptico, recuerda al de las células de Sertoli de un testículo en desarrollo (Fig. 14F).

En cualquier caso, el evento más importante que tiene lugar en este estadio, es el inicio de la meiosis por parte de las células germinales (Fig. 14G). Este proceso no afecta de manera sincrónica a todas las células germinales, sino que se inicia a los cuatro días post parto (dpp) en las células germinales de los cordones más profundos de la región cortical. Todas las células de un mismo cordón entran simultáneamente en meiosis, mientras que las de cordones adyacentes pueden no hacerlo. El proceso se va extendiendo de manera radial hacia la periferia de la región cortical, de manera que los individuos más avanzados de este estadio (6-7 dpp) ya tienen todas sus células germinales en meiosis.

En la región cortical más externa, cabe destacar la diferenciación de un epitelio de superficie muy similar al del tejido ovárico adulto, así como el hecho de que prácticamente debajo del mismo se ha desarrollado un extenso mesénquima que individualiza casi todos los cordones periféricos. Por su parte la región cortical más profunda presenta un aspecto más denso que en el estadio anterior, dado que el mesénquima presente en esta zona ha quedado reducido a pequeños islotes inconexos entre sí, que generalmente contienen uno o varios vasos sanguíneos. El proceso de formación de nuevos cordones medulares a partir de los cordones corticales más profundos continúa en este estadio (Fig. 14 H e I). En el otro extremo de la gónada, el grupo de antiguos cordones medulares no fraccionados sigue estando adyacente a los restos del conducto de Wolff (Fig. 14J).

La forma bilobulada de la gónada femenina en el estadio E11 es fácilmente observable a simple vista (Fig. 15A). La región cortical en este estadio presenta un aspecto general parecido al del estadio anterior. El epitelio de superficie es casi idéntico al que se observa recubriendo a la región ovárica del ovoteste adulto. En los cordones corticales la

RESULTADOS

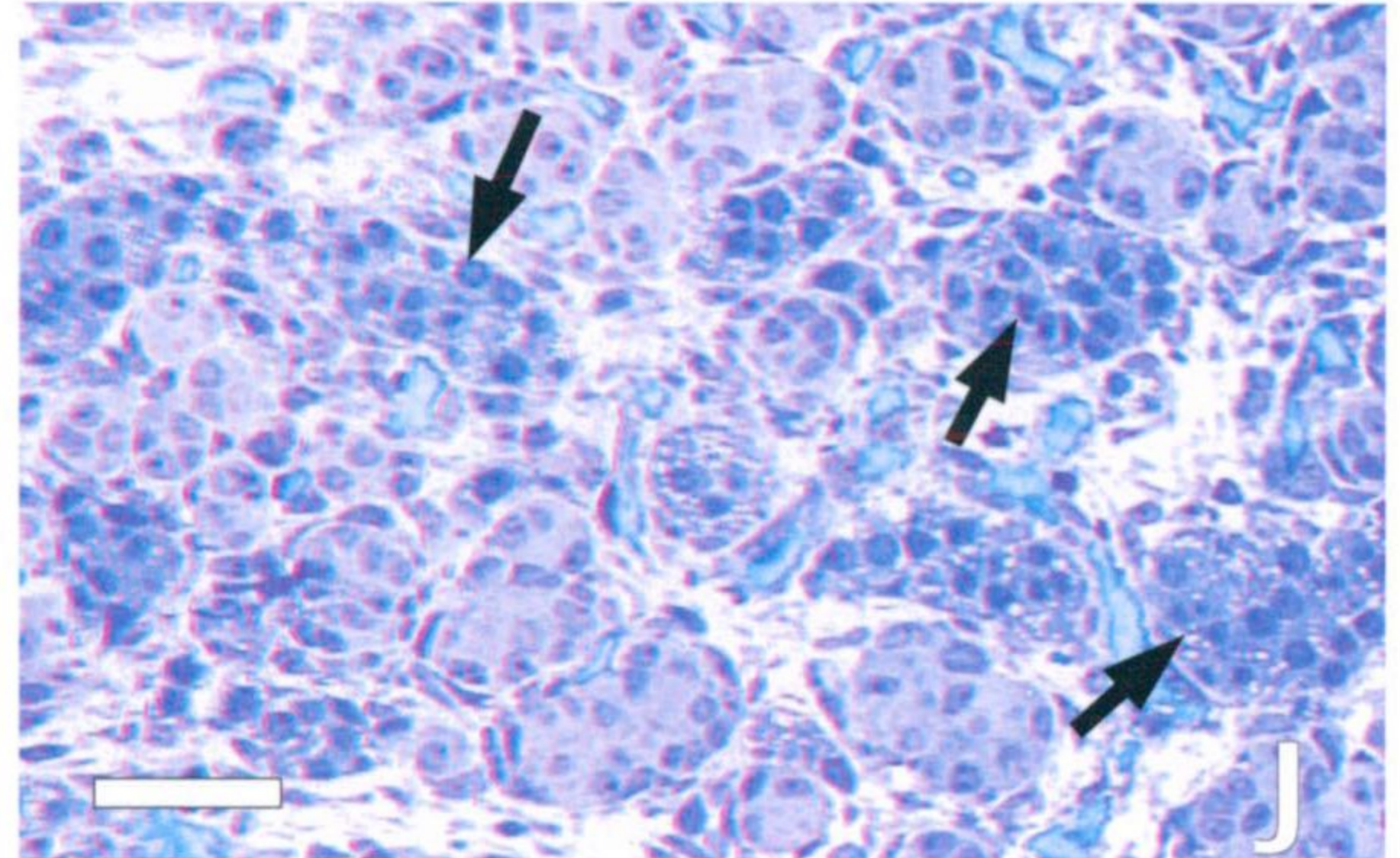
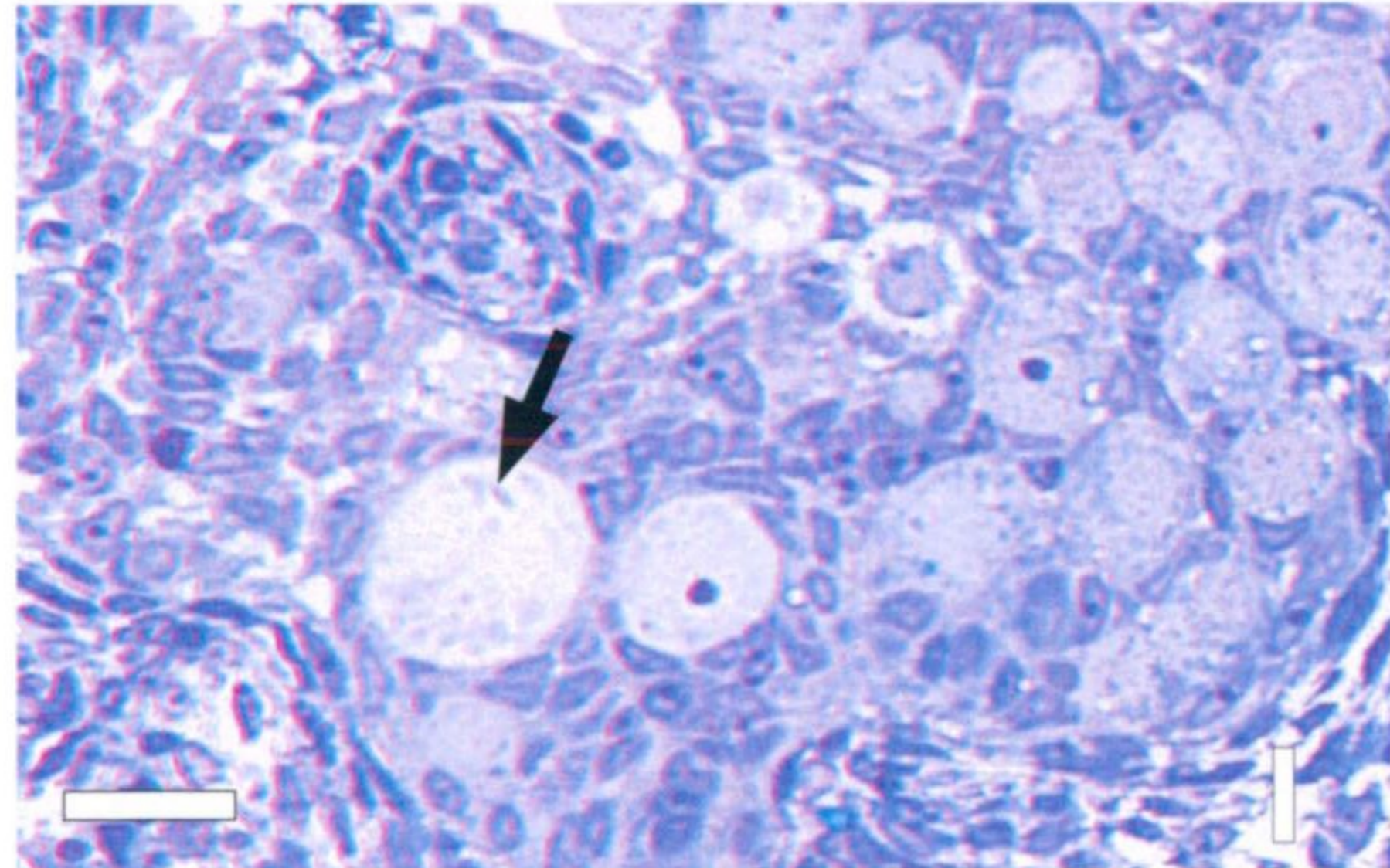
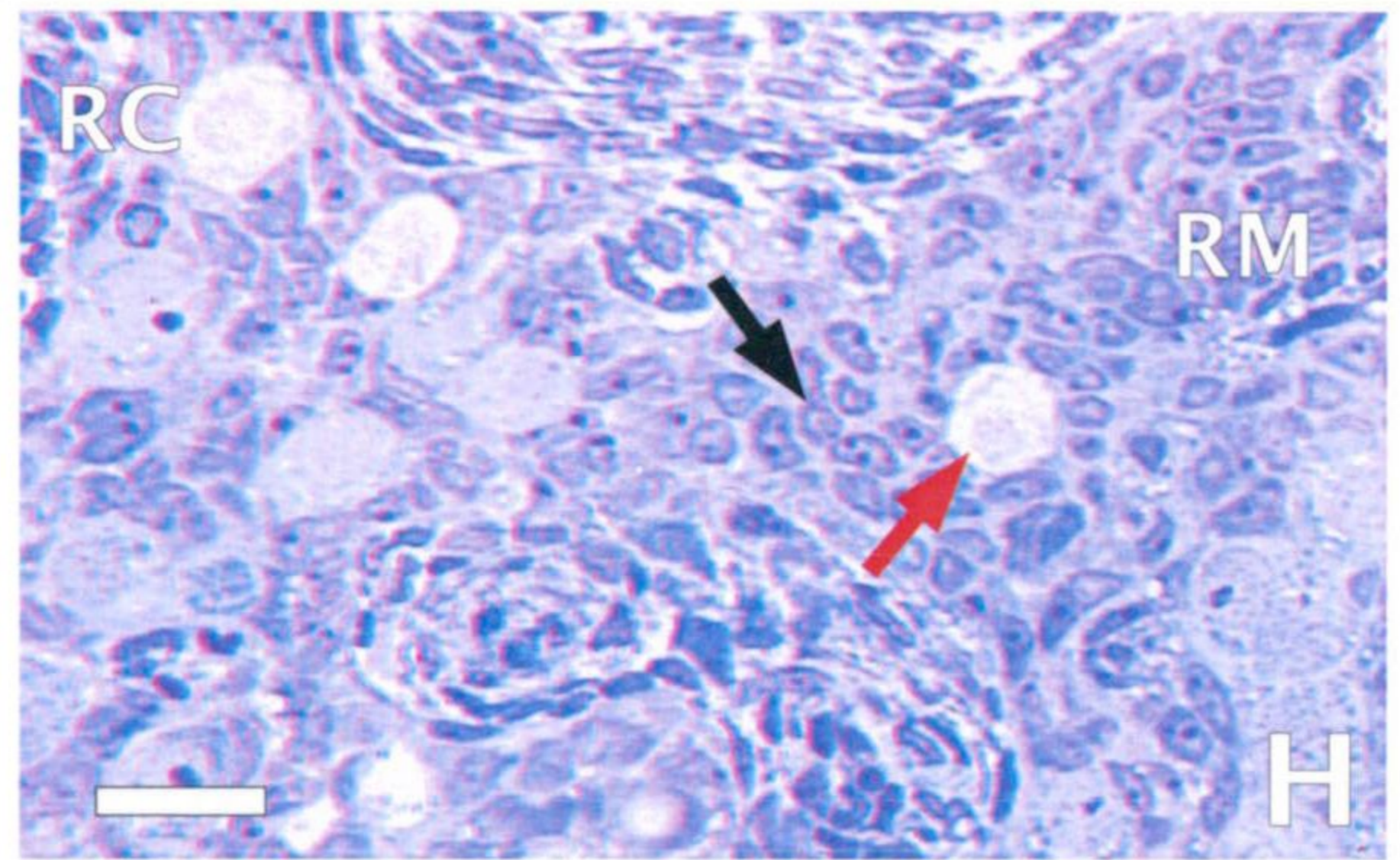
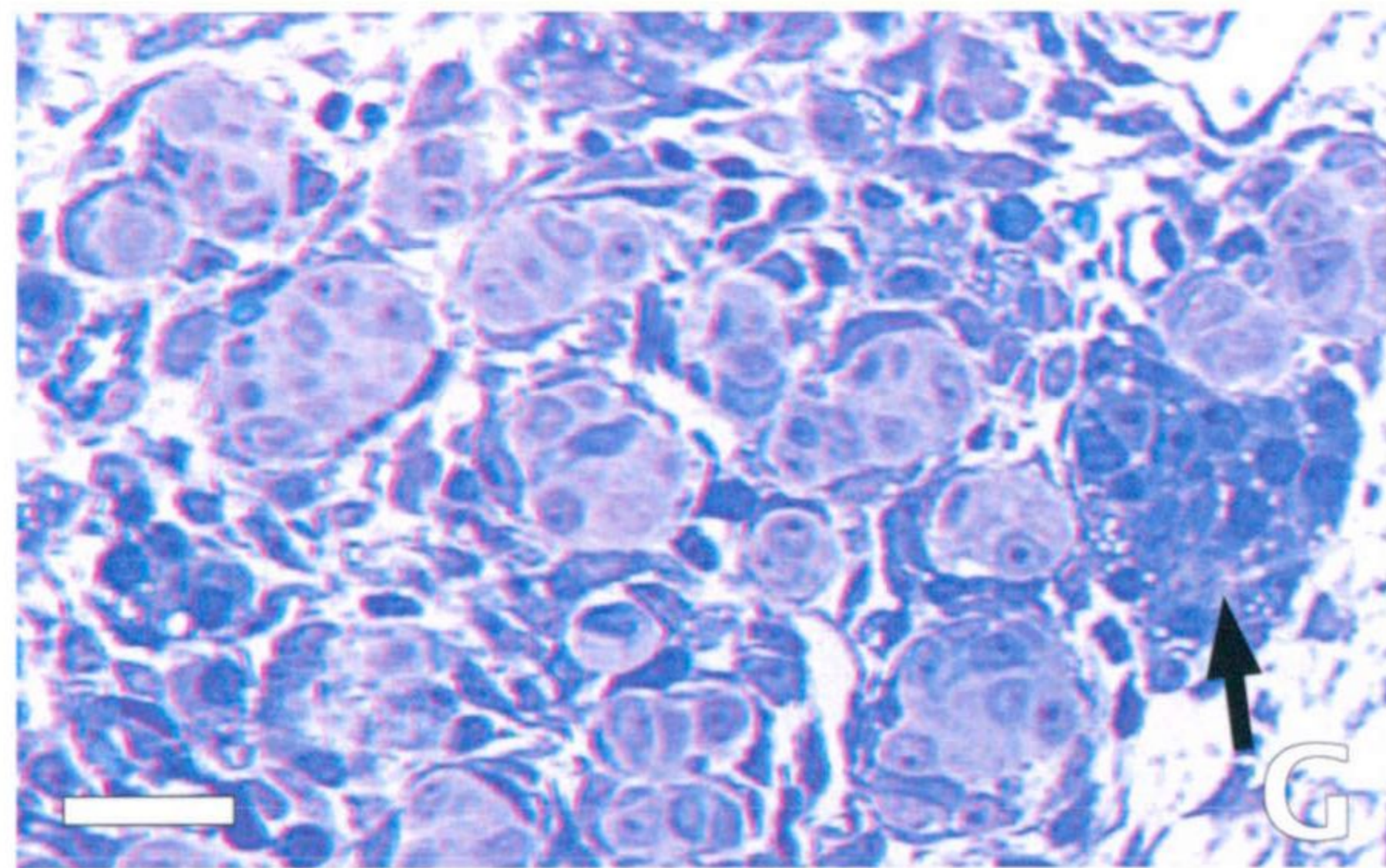
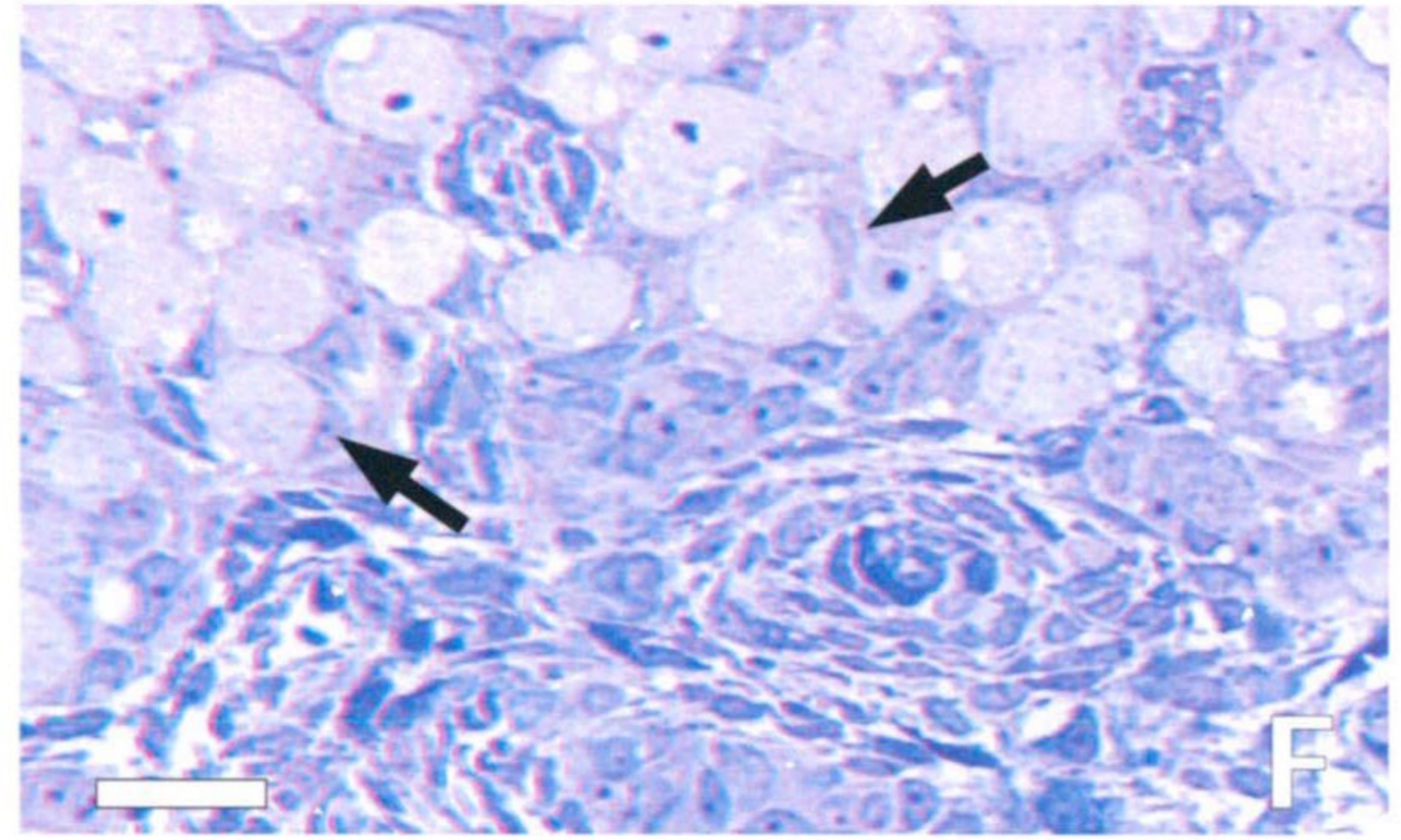
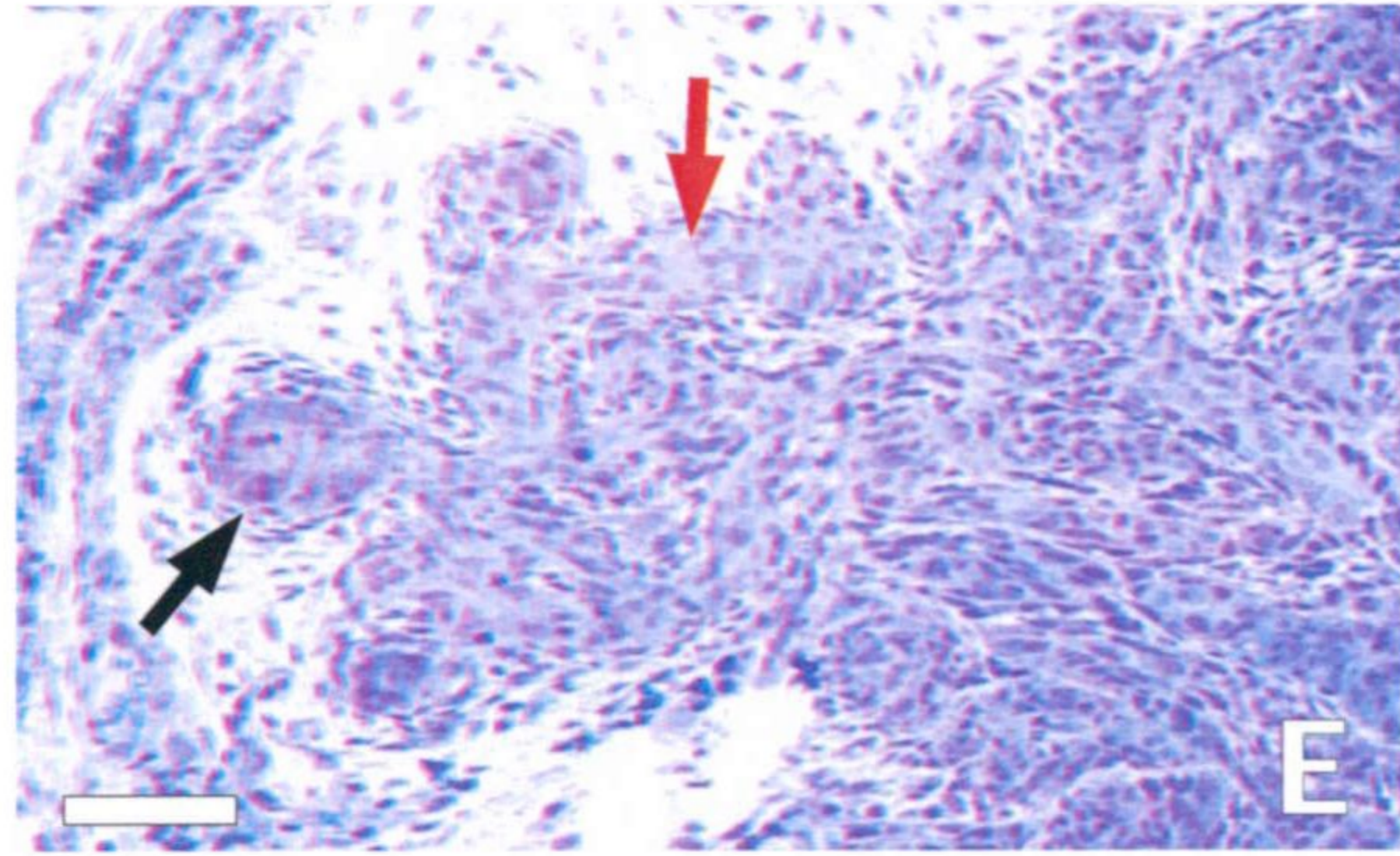
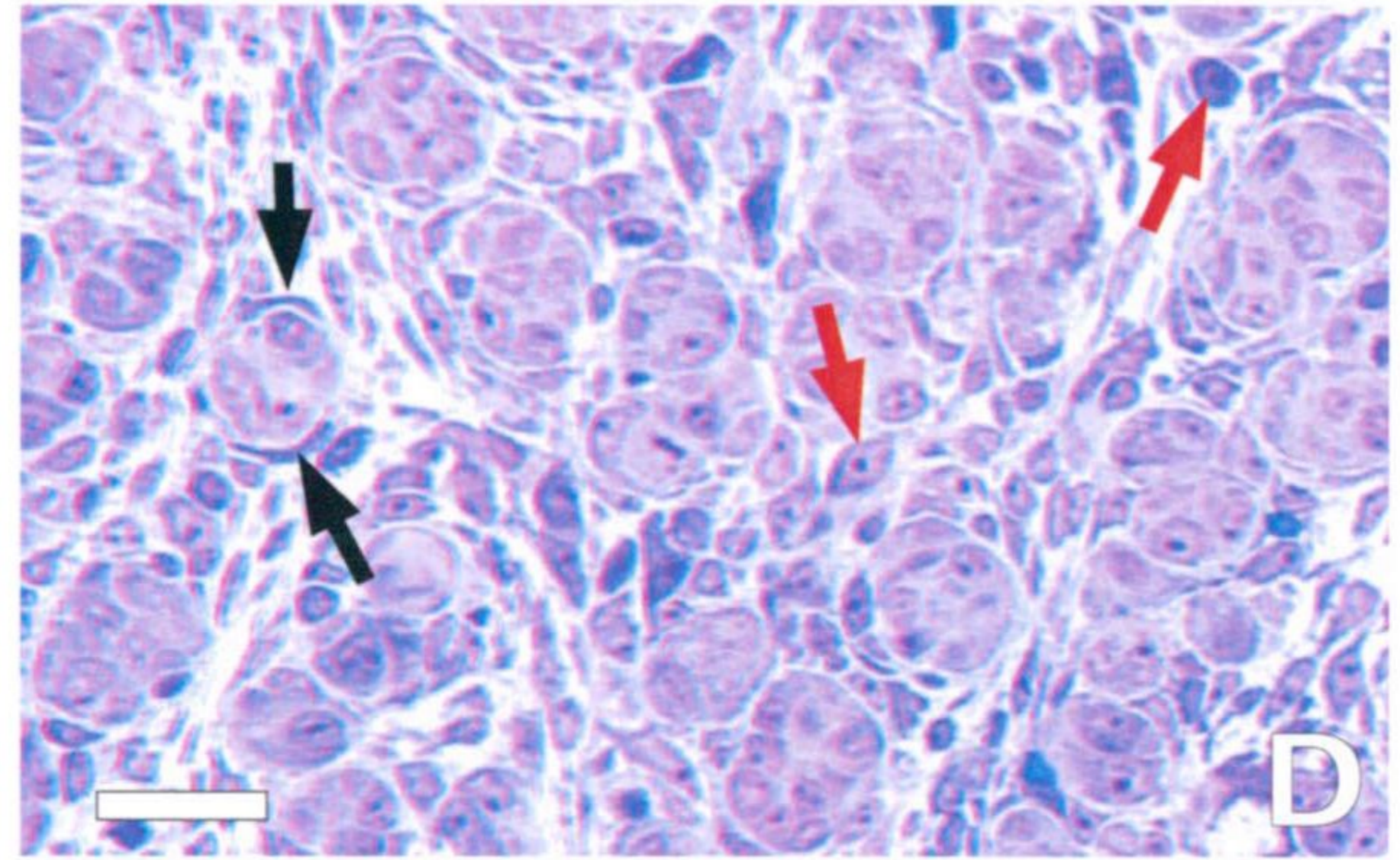
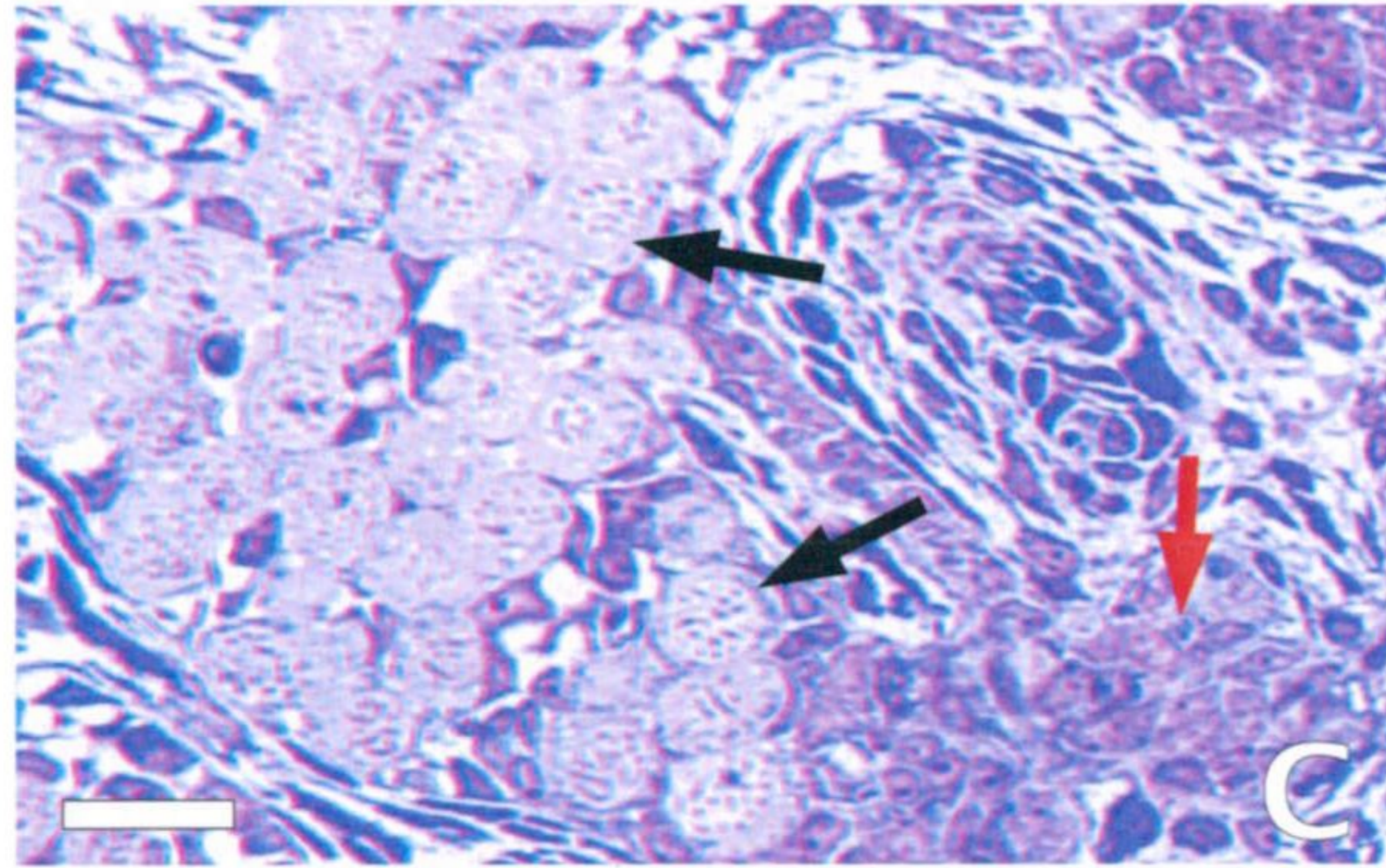
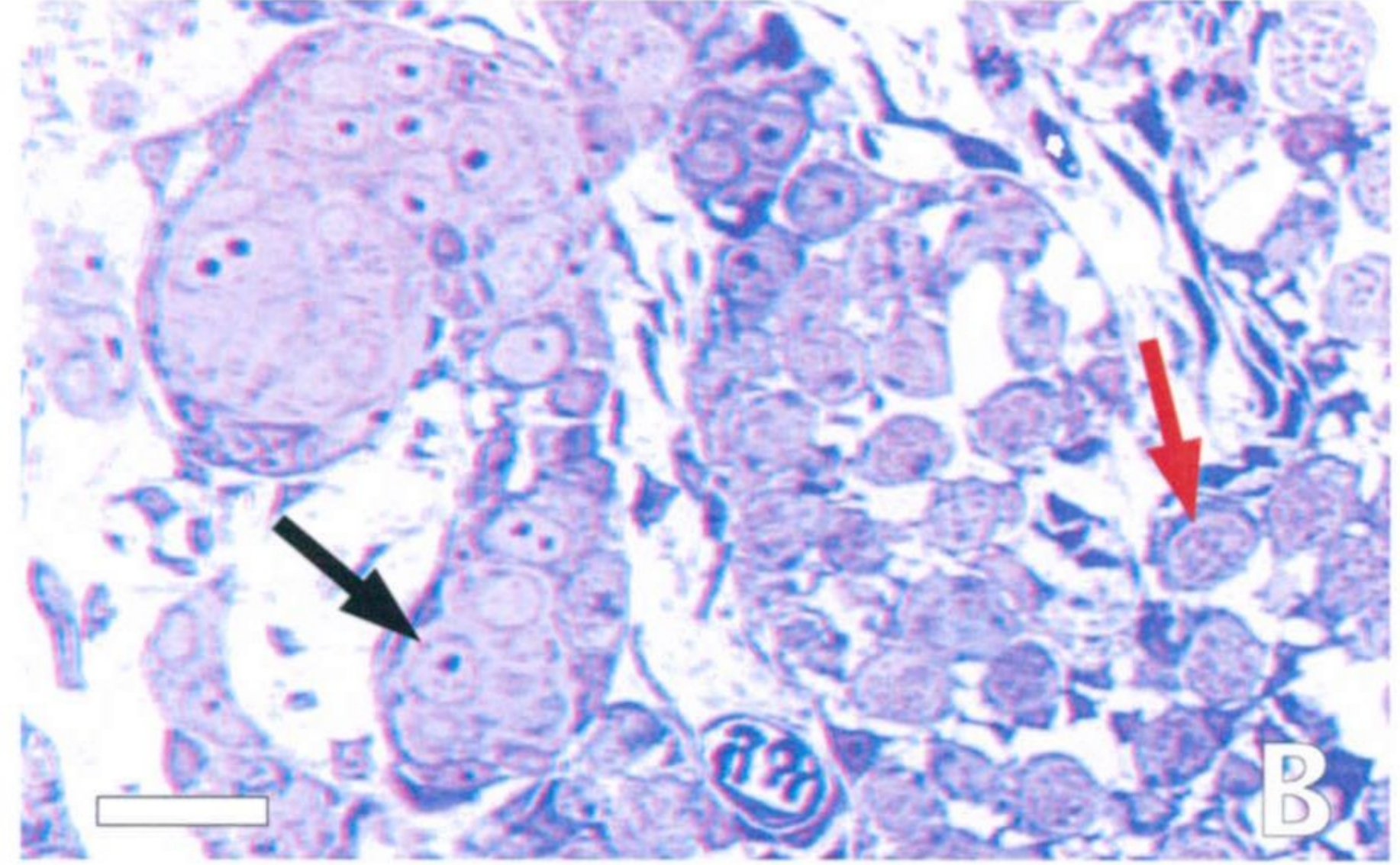
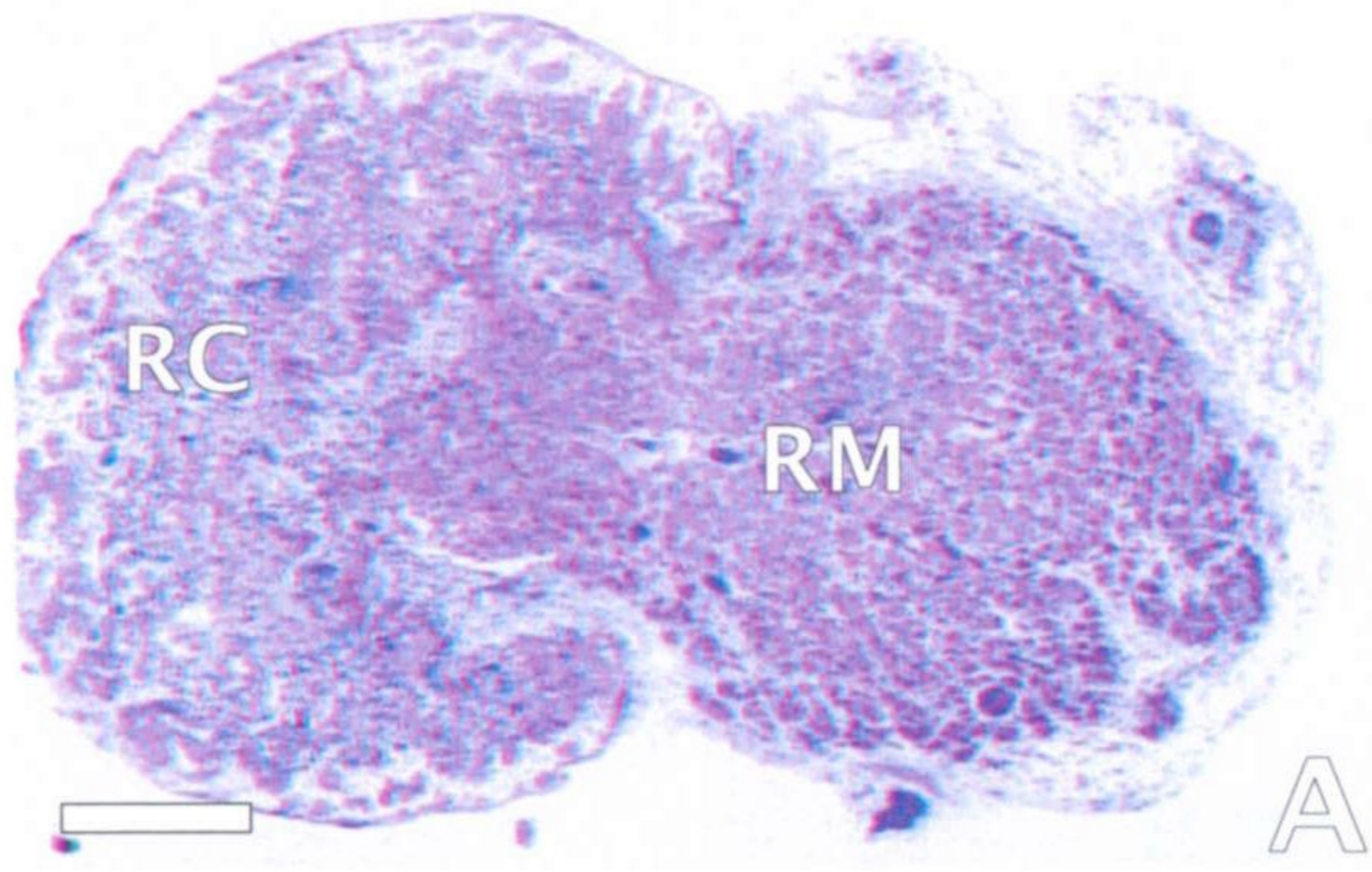
gran mayoría de las células germinales se encuentran en meiosis, aunque todavía es posible observar algunos cordones en la región más periférica que contienen las células germinales en mitosis (Fig. 15B). No se observan signos de inicio del proceso de foliculogénesis. En la región cortical más profunda, los cordones corticales están cargados de oocitos pero, no obstante, continúan proyectando masas de células somáticas hacia la región medular, que se transforman en nuevos cordones medulares (Fig. 15C). Esta zona continua estando abundantemente vascularizada.

La región medular de esta gónada presenta ya toda una serie de características morfológicas que permiten identificarla como tejido testicular disgenésico. En su mayor parte está compuesto por esférulas medulares, que en adelante llamaremos esférulas testiculares, de un diámetro algo superior al del estadio anterior. El recubrimiento de estas esférulas testiculares por células mioides está mucho más generalizado en este estadio (Fig. 15D). Las células que componen estas esférulas se parecen ya bastante a las células de Sertoli inmaduras de los testículos de los machos E5b, pero no han alcanzado su morfología definitiva (ver más adelante el estudio ultraestructural). Estas células continúan con su proceso de proliferación como se deduce de la observación de figuras mitóticas en el interior de estas esférulas. El estroma medular presenta un aspecto bastante diferente al del estadio anterior. Por primera vez se observan masas más o menos extensas de células con núcleos redondeados y citoplasma voluminoso y denso cuya morfología se ajusta típicamente a la de las células de Leydig (Fig. 15D). La organización de las esférulas testiculares en lóbulos separados por travéculas de tejido estromático resulta ya evidente en este estadio. Los capilares y vasos sanguíneos de mayor calibre son muy abundantes por toda la región medular. Tal como se describió en estadios anteriores, persiste un grupo de cordones medulares no diferenciados, íntimamente adosados a la zona de la envuelta conjuntiva de la región medular que contiene los restos del Conducto de Wolff (Fig. 15E). Como hemos visto, también aquí se observan los cordones medulares recién formados en la estrecha zona frontera entre ambas partes de la gónada. La región medular está casi totalmente envuelta por una gruesa capa de tejido conectivo que es fruto de la transformación de los restos del antiguo mesonefros. Por algunas zonas esta envuelta comienza a tener el aspecto típico de la túnica albugínea de un testículo.

Fig. 15. Desarrollo postnatal (estadios **E11-E13**) de la gónada XX de *Talpa occidentalis*.

- A)** En E11 las dos regiones gonadales (RC y RM) tienen un volumen similar.
- B)** La región cortical de la gónada contiene aún algunas células germinales primordiales que no han iniciado la meiosis (flecha negra), aunque la mayoría de ellas si lo han hecho (flechas rojas).
- C)** Los cordones corticales más profundos están constituidos principalmente por oocitos (flechas negras), aunque desde ellos todavía salen proyecciones de células somáticas que generan nuevos cordones medulares (flecha roja).
- D)** La región medular de la gónada E11 tiene ya las características de un tejido testicular disgenésico: las esférulas testiculares están parcialmente recubiertas por células mioides (flechas negras), y en el tejido intersticial se aprecian ya numerosas células que han adquirido las características de las células de Leydig (flechas rojas).
- E)** En las proximidades del conducto de Wolf (flecha negra) aún persisten antiguos cordones medulares no fragmentados (flechas rojas).
- F)** En E12 se inicia el proceso de foliculogénesis: los oocitos ya han alcanzado el estado de dictiotene y se rodean individualmente por una monocapa de células foliculares (flechas).
- G)** En la región testicular se observa un aumento significativo del número de células de Leydig, que por primera vez forman verdaderas masas con decenas de ellas (flechas).
- H)** En E13 continua la formación de nuevos cordones medulares (flecha negra) a partir de células somáticas corticales, que a veces arrastran oocitos hacia la región testicular (flecha roja)(RC, región cortical; RM, región medular).
- I)** En la región ovárica se comienzan a observar algunas células polinucleadas (flecha).
- J)** La región testicular continúa creciendo, principalmente gracias al aumento del número y volumen de los grupos de células de Leydig (flechas).

Imágenes obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina. Las barras representan 20 μm en B, C, D, F, G, H e I, 40 μm en J, 50 μm en E, y 250 μm en A.



RESULTADOS

En el estadio E12 la gónada ha perdido el aspecto bilobulado de los estadios anteriores. Ahora tiene forma netamente ovoidea, en el que uno de sus polos está constituido por un casquete blanquecino que corresponde a la porción ovárica de la gónada. El resto es una masa bastante homogénea de tejido denso fuertemente empaquetado que en su mayor parte es idéntica a la túnica albugínea que se puede observar en el ovoteste adulto. No obstante aún existe un pequeño surco más o menos profundo que delimita el paso de la porción ovárica a la testicular. Adyacente a este surco, de la túnica albugínea que recubre la porción testicular se proyecta sobre la porción ovárica la pared de la futura *bursa ovarica*, cuyo desarrollo alcanza ya el extremo apical de dicha porción ovárica. En el otro extremo de la gónada resulta evidente en algunos cortes una recuperación parcial del Conducto de Wolff. Este, a diferencia de lo que ocurría en estadios anteriores, de nuevo vuelve a tener luz tubular, al menos en algún segmento de su recorrido. Como dijimos anteriormente, suele observarse en las cercanías de la porción de tejido medular que aún persiste adyacente a la túnica albugínea. Estas características morfológicas que acabamos de describir se mantendrán y agudizarán en estadios posteriores, por lo que más adelante se mostrarán imágenes para ilustrarlas.

En el tejido ovárico es de destacar el proceso de foliculogénesis, que se inicia en los cordones corticales más profundos mediante la migración y proliferación de células somáticas cordonales, que se interponen entre los oocitos separándolos (Fig. 15F). Estos ya han alcanzado el estadio de dictiotene. El proceso de foliculogénesis no es aún muy intenso y no alcanza a los oocitos situados en la zona periférica de la porción cortical.

La región medular que a partir de ahora denominaremos porción testicular del ovoteste, ha experimentado un crecimiento muy considerable, y tiene en E12 un volumen de tres a seis veces mayor que el de la porción ovárica. Las características de este tejido son, en general similares a las descritas anteriormente, aunque hay algunas diferencias dignas de mención. Las esférulas testiculares están claramente rodeadas por células de tipo mioide, y sobre todo, el tejido intersticial está ocupado mayoritariamente por células de Leydig. Estas se pueden ver, bien aisladas en los intersticios, o agrupadas formando grandes masas. Las características de estas células de Leydig, tales como la presencia de un citoplasma denso o la existencia de numerosas gotas lipídicas en el mismo denotan que

RESULTADOS

estas células probablemente están realizando una considerable actividad esteroideogénica (Fig. 15G). El tránsito desde esta porción de tejido con características testiculares hasta el tejido ovárico adyacente se realiza todavía a través de una amplia masa de tejido mesenquimático en el que aún persisten, aunque ya escasos, cordones de tipo medular.

En topos de tres semanas (estadio E13) la gónada continua creciendo y adoptando una morfología cada vez más parecida a la del ovoteste adulto. En el tejido ovárico continúa el proceso de foliculogénesis, que afecta ya a todos los oocitos. En las zonas más profundas de la porción ovárica, algunos oocitos son arrastrados hasta el tejido testicular adyacente por las células somáticas de origen ovárico que continúan migrando hacia la porción testicular (Fig. 15H). Por otra parte, también resulta llamativo el hecho de que en E13 aparecen algunos oocitos polinucleados, generalmente binucleados (Fig. 15I). En este estadio la bursa ovárica parece estar completamente formada y en ella desemboca el oviducto con una morfología parecida a la del adulto. También comienzan a verse aquí los primeros signos de formación de una rete-testis, por la aparición de canalículos similares a los que existen en el ovoteste adulto (estas estructuras serán mostradas mas adelante).

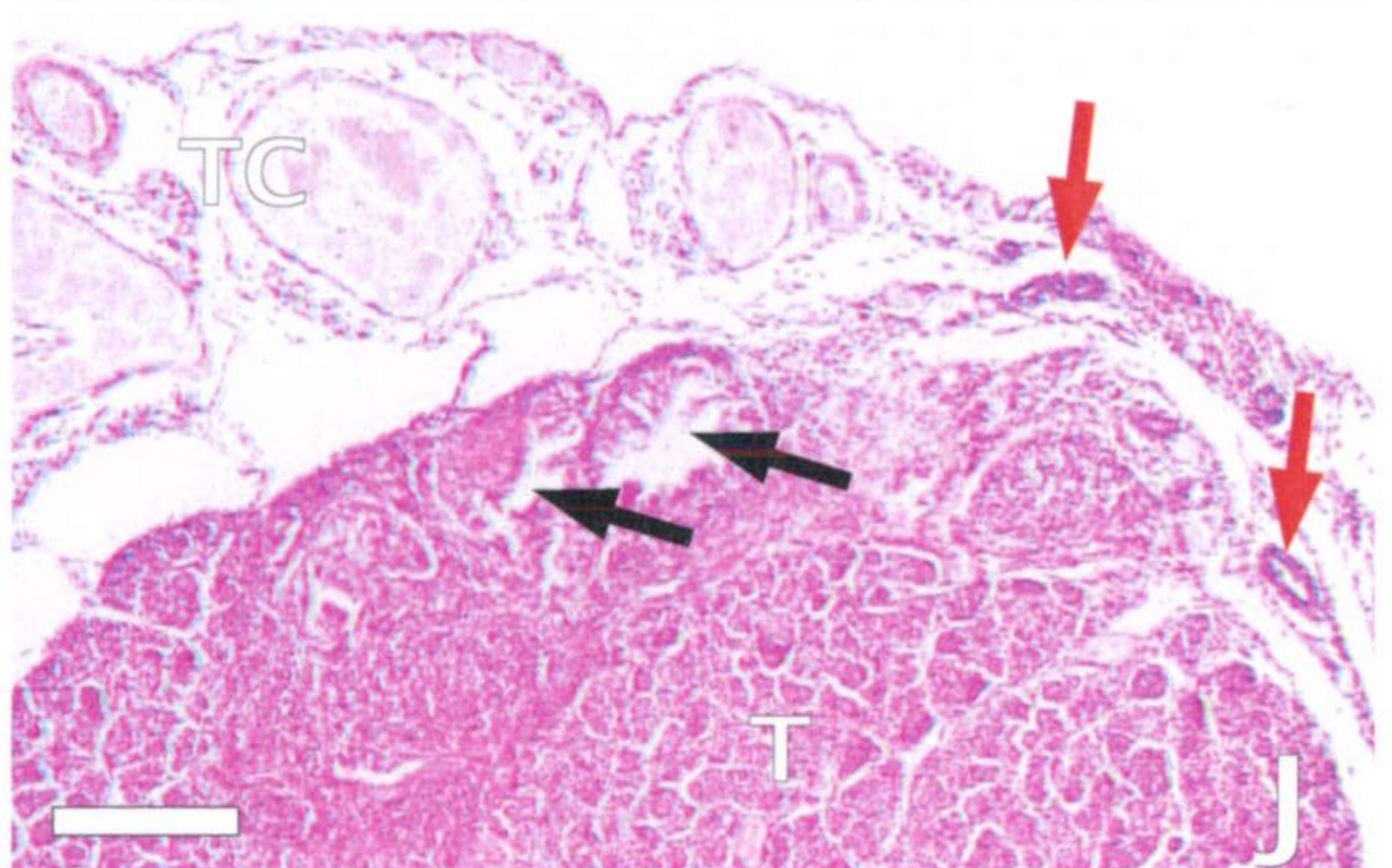
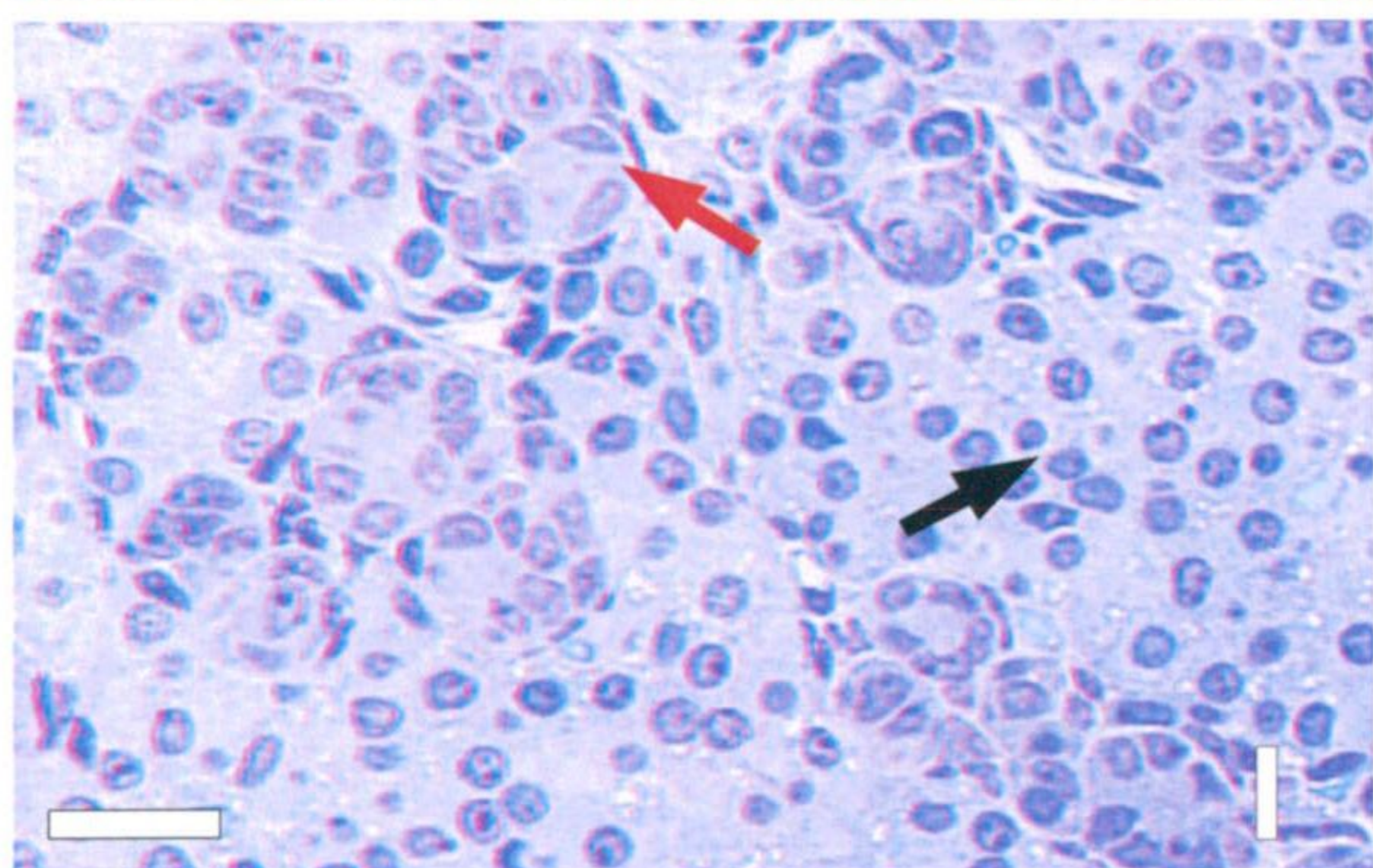
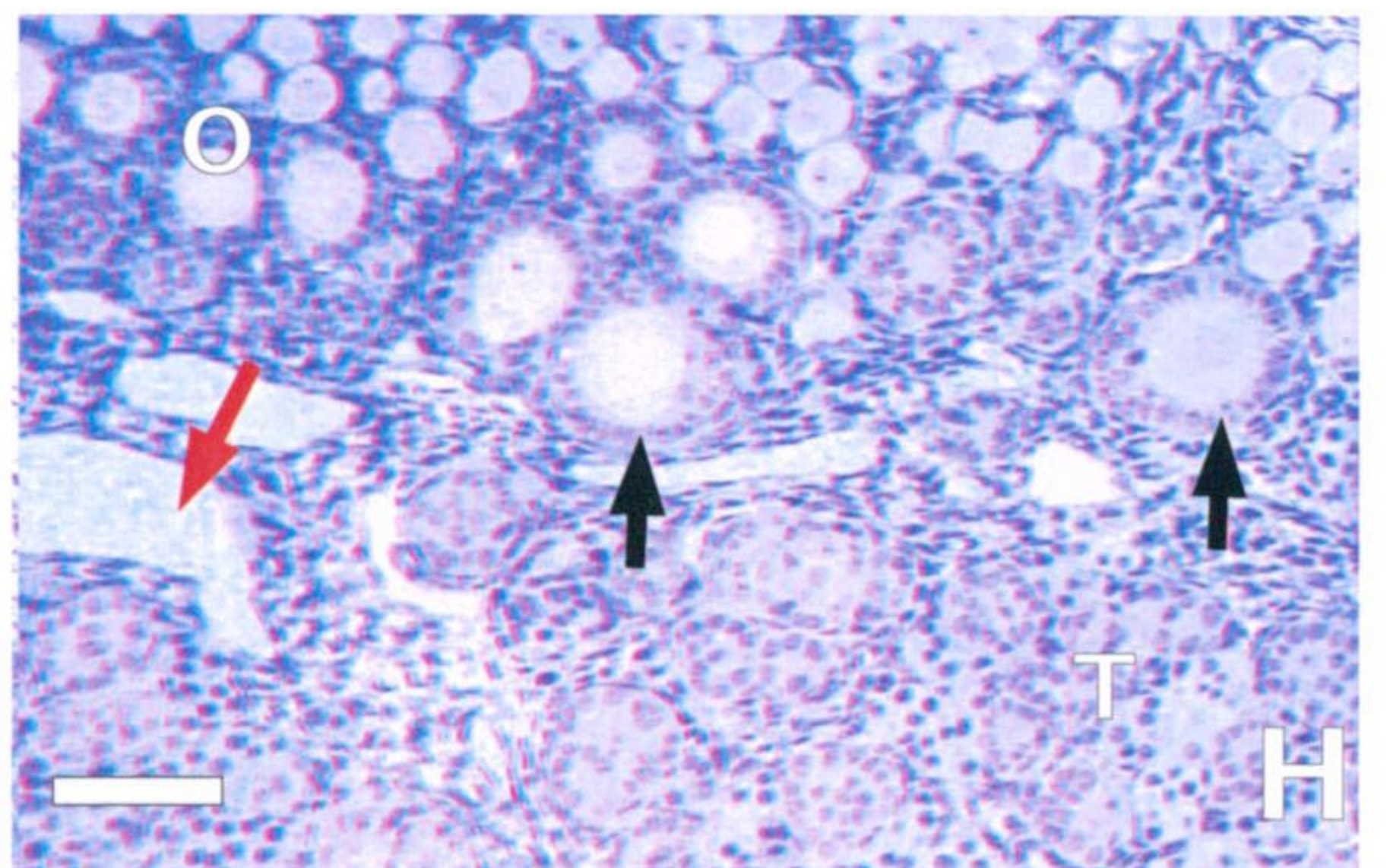
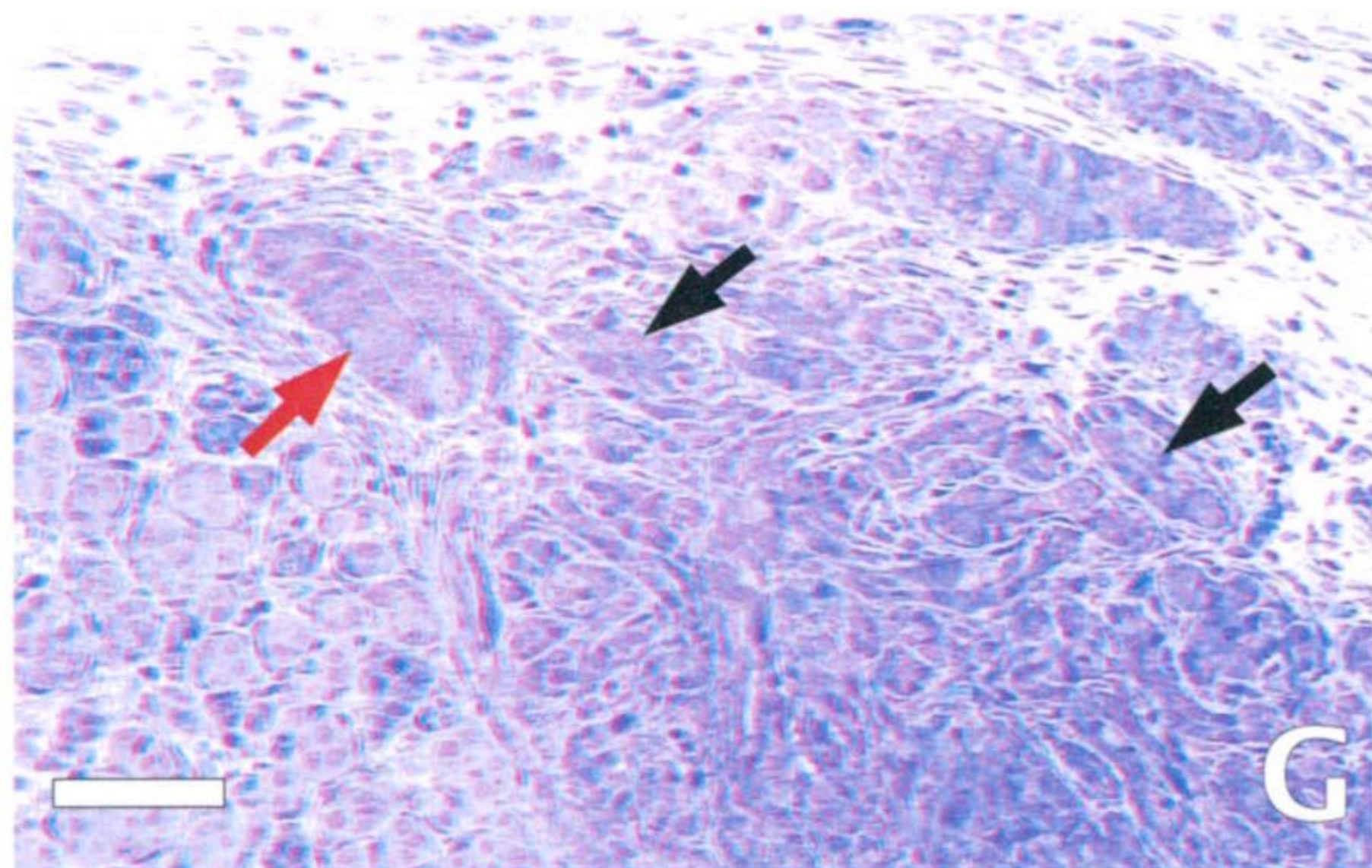
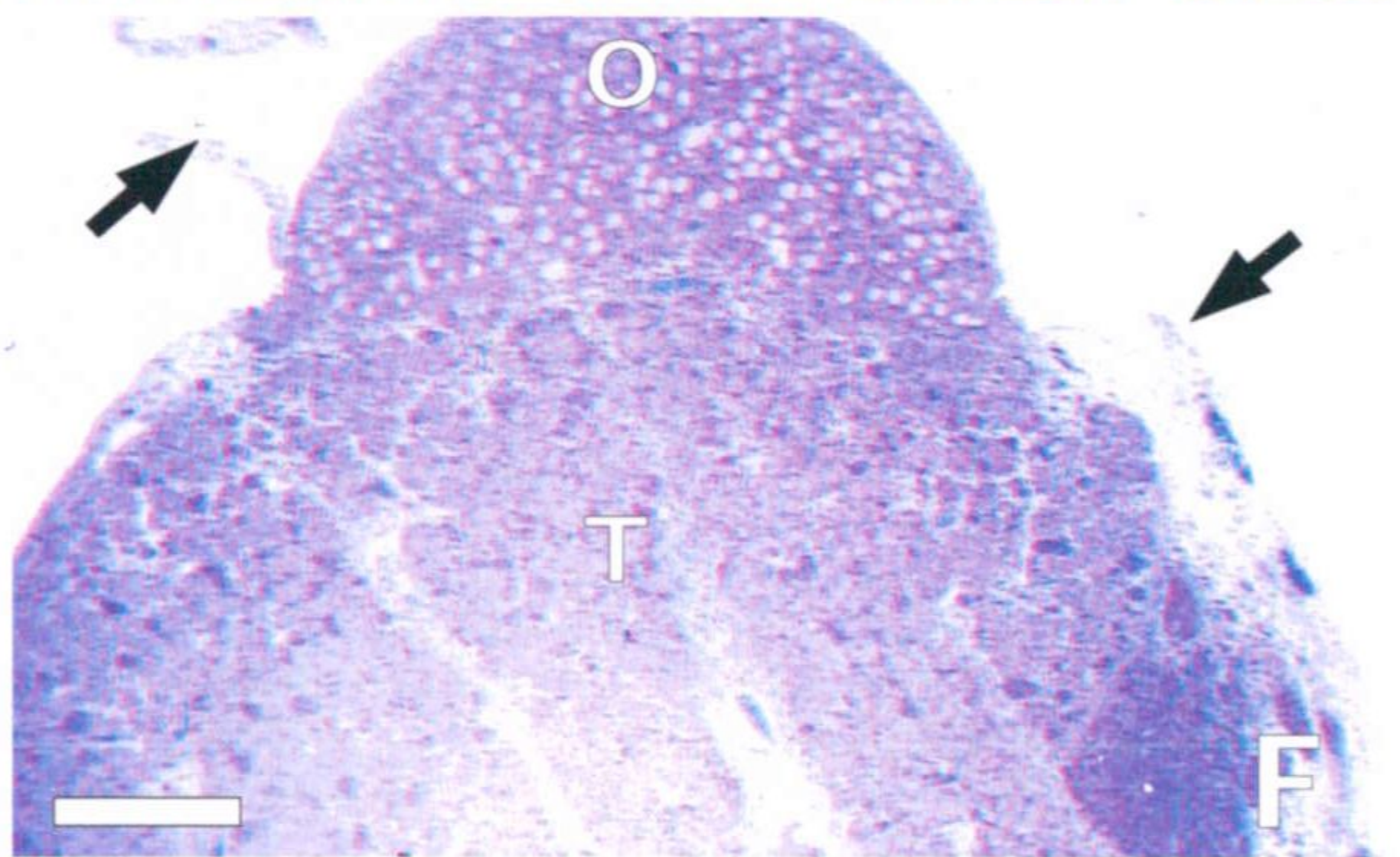
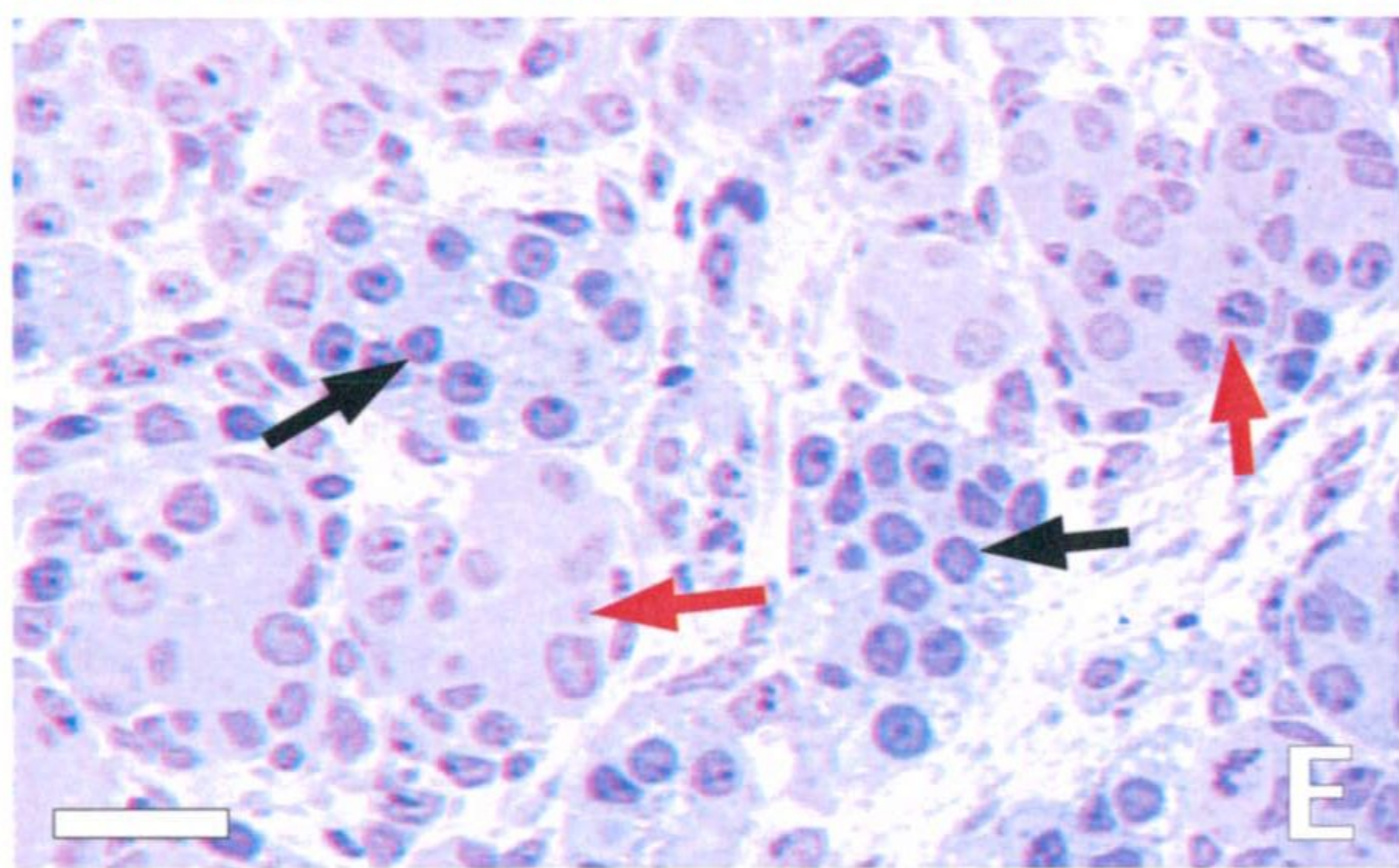
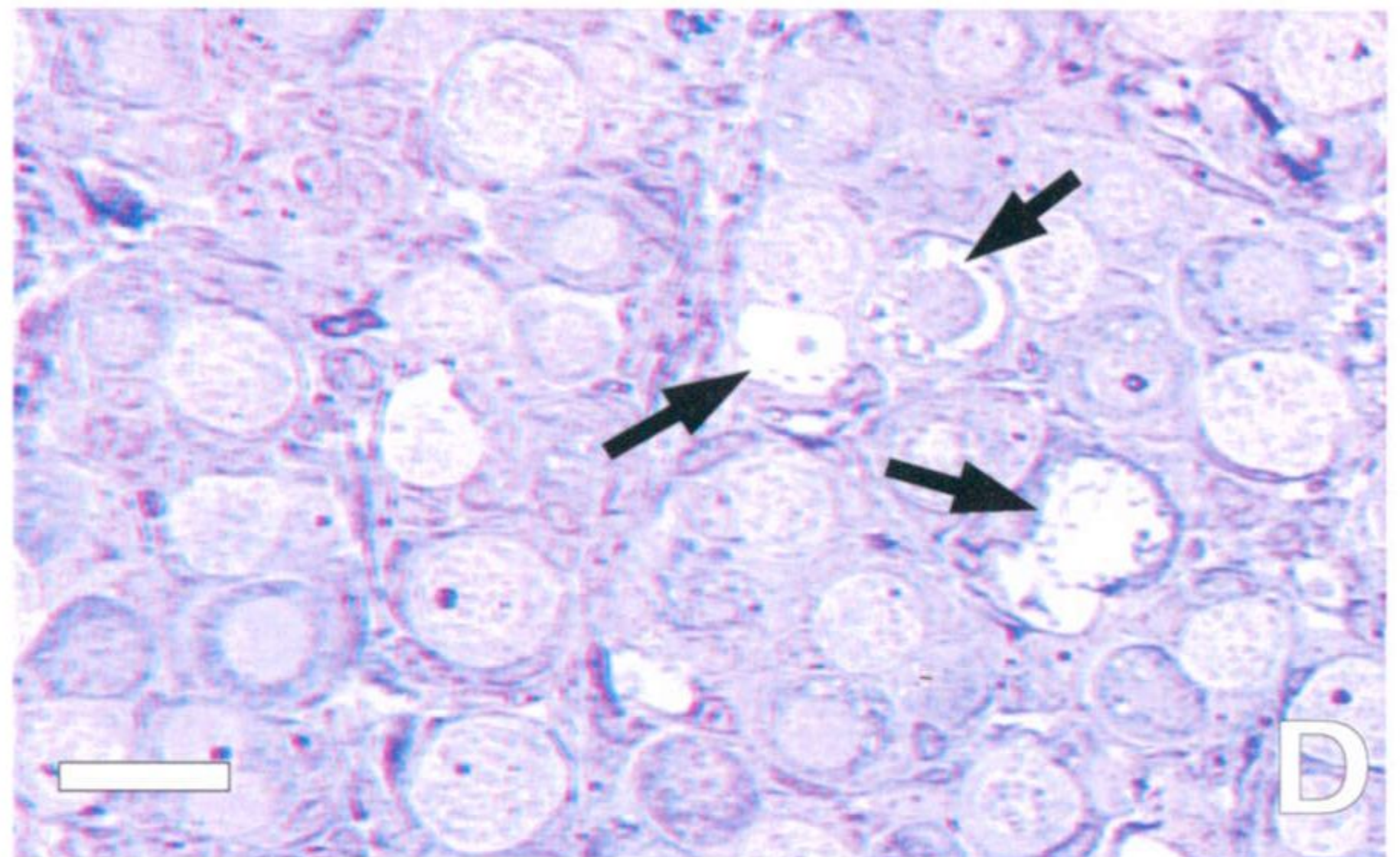
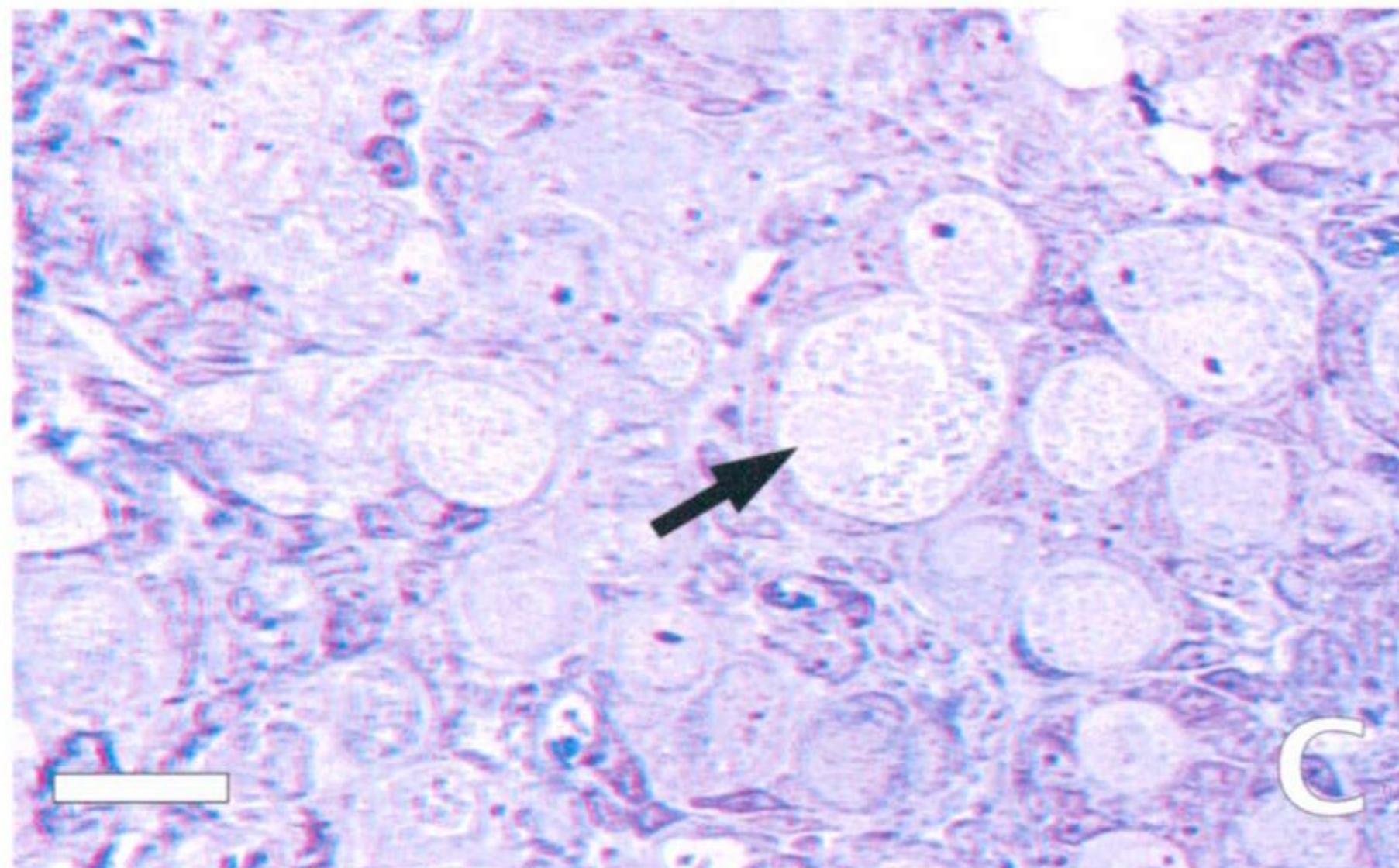
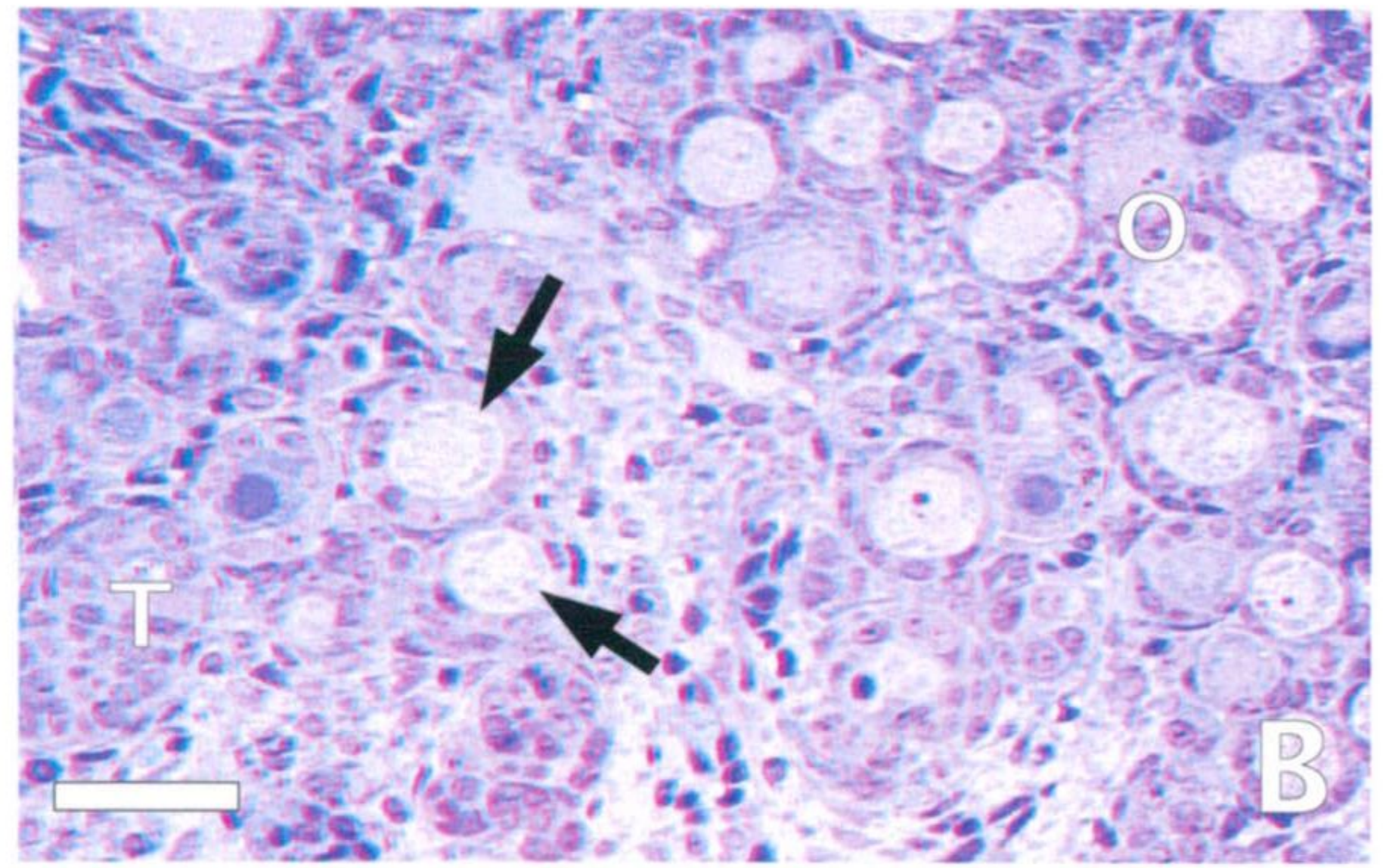
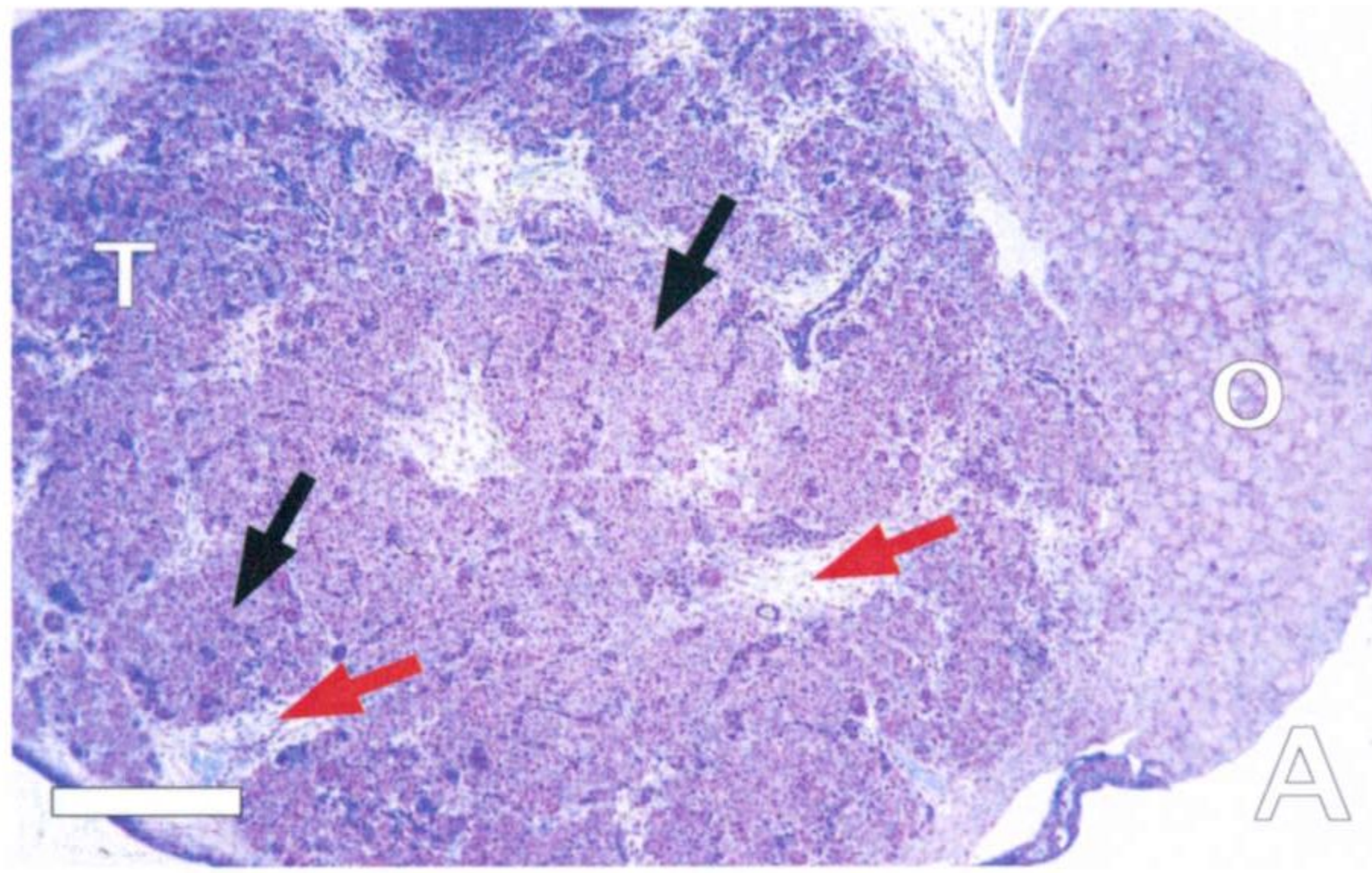
En el tejido testicular de la gónada las esférulas testiculares continúan su proceso de crecimiento de volumen y número, y destaca sobre todo el aumento del número de células de Leydig, y probablemente de su actividad, dado el gran volumen de su citoplasma y del gran número de gotas lipídicas que contiene este (Fig. 15J).

En el estadio E14 no se observan cambios significativos en relación con el aspecto general de la gónada. Tal como se observa en la figura 16A, la porción ovárica es ya un pequeño casquete adherido a una gran masa de tejido testicular, organizada en lóbulos. El tejido ovárico presenta algunos cambios significativos. En él se pueden diferenciar dos procesos que ocurren de forma simultánea. Por un lado, tiene lugar en este estadio un proceso de transformación de los folículos ováricos más profundos en esférulas testiculares. Los folículos ováricos afectados se desprenden del resto y son arrastrados hacia la porción testicular mediante la afluencia de células del estroma de la porción testicular aún no diferenciadas en células de Leydig (Fig. 16B). Este proceso sólo afecta a los folículos primordiales perfectamente formados, ya que son estos los que se encuentran en contacto directo con el tejido testicular por ser los más profundos. El proceso se ve

Fig. 16. Desarrollo juvenil (estadios **E14-E15**) de la gónada XX de *Talpa occidentalis*.

- A)** Aspecto general a bajo aumento de una gónada femenina en el estadio E14; la porción de tejido testicular (T) es ya mucho mayor que la de tejido ovárico (O) , y está organizada en lóbulos (flechas negras) separados por travéculas de tejido conectivo (flechas rojas).
- B)** Algunos folículos primordiales (flechas) procedentes de la porción ovárica (O) caen al la porción testicular (T), donde degeneran finalmente.
- C)** Todos los oocitos polinucleados de la porción ovárica degeneran en E14 (flecha).
- D)** Muchos oocitos normales también degeneran y mueren en este estadio (flechas).
- E)** Tejido testicular con grandes masas de células de Leydig (flechas negras) y numerosas esférulas testiculares (flechas rojas).
- F)** En E15a los ovotestes son muy similares a los de un adulto, excepto por su menor tamaño; la porción ovárica (O) es un pequeño casquete situado en uno de los polos de una enorme porción testicular (T). Se observa parte de la pared de la bursa ovárica (rota durante la disección; flechas).
- G)** En este estadio la rete testis no está aun formada, persistiendo el grupo de antiguos cordones medulares no fragmentados (flechas negras), adyacente al conducto de Wolf (flecha roja).
- H)** En los topos juveniles ya emancipados (estadio E15b) se inicia la maduración de algunos folículos profundos (flechas), que finalmente se convierten en folículos atrésicos precoces (O, tejido ovárico; T, tejido testicular; la flecha roja señala un seno venoso).
- I)** El tejido testicular de una hembra E15b es idéntico al de una hembra adulta y contiene numerosas células de Leydig (flechas negras) que engloban a las esférulas testiculares (flecha roja).
- J)** En estos individuos la rete testis (flechas negras) está ya formada y el conducto de Wolf ha adquirido sus características epididimarias definitivas (flechas rojas)(T, tejido testicular del ovoteste; TC, tejido conectivo anexo a la gónada).

Excepto J, las demás imágenes han sido obtenidas a partir de cortes semifinos teñidos con azul de toluidina; la imagen J es de un corte de parafina teñido con hematoxilina-eosina. Las barras representan 20 μm en C, D, E e I, 40 μm en B, 50 μm en G y H, 150 μm en J, y 250 μm en A y F.



RESULTADOS

favorecido por el hecho de que la masa de células de tipo mesenquimático que separaban ambas porciones de la gónada en estadios anteriores prácticamente ha desaparecido en E14, de tal forma que el tejido testicular es directamente adyacente al tejido ovárico. Los folículos ováricos afectados por este proceso sufren la rápida degeneración de los oocitos y la transformación y proliferación de las células foliculares en células tipo Sertoli, constituyéndose así nuevas esferulas testiculares. Esta es la primera y única vez que se observa un proceso de transdiferenciación en el desarrollo de la gónada femenina de topo. Por otra parte, también ocurre un proceso de degeneración de oocitos, en los que se observan grandes vacuolas en su citoplasma y la aparición de concreciones densas en su núcleo. Este proceso es bastante intenso en algunos animales, y no muestra polaridad alguna, observándose por cualquier zona de la porción ovárica. Afecta igualmente a folículos normales y polinucleados, los cuales desaparecen así en este estadio (Fig. 16 C y D).

Como consecuencia de estos dos procesos que acabamos de describir se produce una disminución sensible en el número de oocitos presentes en la porción ovárica y, por tanto, en el tamaño de esta. No se observa asociación directa entre la intensidad de este proceso y la edad relativa de los individuos que se encuentran en el estadio E14. El tejido testicular alcanza su aspecto, pero no su tamaño definitivo en este estadio, con grandes masas de células de Leydig que envuelven un gran número de esferulas testiculares (Fig. 16E).

En el último estadio de desarrollo, E15, La gónada suele presentar generalmente una morfología fusiforme y unas dimensiones que oscilan entre 4-6 mm. de longitud por 1.5-3 mm. de anchura. Del volumen total, la porción ovárica ocupa sólo un pequeño casquete en uno de los extremos, y suele ser entre 10 y 20 veces más pequeña que la porción testicular. Por su parte, la porción ovárica está recubierta por una *bursa ovarica* que es continuación de la túnica albugínea que recubre la porción testicular, que se despega de la gónada, encerrando así la porción ovárica (Fig. 16F). En la porción testicular de estos individuos E15a los cordones medulares adyacentes al conducto de Wolff no han terminado de organizar la *rete testis* (Fig. 16G).

RESULTADOS

El tejido ovárico de estos ovotestes también presenta diferencias entre los individuos de los estadios E15a y E15b. En E15a la porción ovárica muestra un volumen en general algo menor que en E14, y además continua el proceso de degeneración de los oocitos, proceso que sigue siendo bastante intenso. Sin embargo, no se observan folículos en proceso de transdiferenciación. Por el contrario, la pérdida de folículos primordiales se detiene en el estadio E15b, en el que el tejido ovárico en general presenta un aspecto similar al de una hembra adulta en período no fértil. A pesar de esto, algunos folículos, los más profundos, comienzan un proceso de maduración prematura, que conduce inevitablemente a la atresia, contribuyendo al proceso de pérdida folicular (Fig. 16H). Como consecuencia de estos hechos, el volumen de la porción ovárica se reduce drásticamente a lo largo del periodo juvenil E15, aunque lo hace de forma muy variable entre individuos en cuanto a su intensidad, de manera que unos individuos poseen finalmente bastante menos cantidad de tejido ovárico que otros.

Durante E15 el tejido testicular alcanza un desarrollo muy considerable en términos cuantitativos, llegando a ser en los jóvenes E15b de mayor edad (5-6 meses) casi tan grande como en las hembras adultas en período fértil, aunque no lo llega a ser tan grande como el de las hembras adultas en época no fértil. Este hecho sugiere que la porción testicular del ovoteste de topo continúa creciendo durante todo el período juvenil. Con respecto a la constitución de este tejido testicular, cabe destacar el extraordinario desarrollo que alcanza el tejido intersticial, constituido por células de Leydig. Éste ocupa una gran proporción del volumen gonadal dado su gran número y el considerable volumen de su citoplasma, cargado de abundantes gotas lipídicas (Fig. 16I). Se puede afirmar, sin ningún tipo de dudas que la gónada femenina E15b posee un número de células de Leydig muy superior al de los machos del mismo estadio. Las esférulas testiculares muestran una morfología muy similar a la descrita en estadios anteriores y aparecen completamente recubiertas por células tipo mioide. La organización en lóbulos rodeados por tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos resulta patente en este estadio.

La formación de la *rete testis* culmina durante el periodo juvenil E15b, que muestran ya una *rete testis* rudimentaria similar a la de las hembras adultas. Esta estructura ocupa un volumen más reducido que el que ocupaba el grupo de antiguos cordones

RESULTADOS

medulares a partir de los cuales se ha formado. También durante E15b tiene lugar la transformación definitiva de los restos del antiguo conducto de Wolff en un epidídimo rudimentario, que quedará inmerso en el tejido conectivo laxo que acompaña a la túnica albugínea de la porción testicular del ovoteste (Fig. 16J).

ULTRAESTRUCTURA DE LOS TIPOS CELULARES SERTOLI Y LEYDIG EN INDIVIDUOS XX y XY DE *T. occidentalis*

En las células de Sertoli XY en diferenciación de los embriones macho E5b, el núcleo es grande, frecuentemente redondeado y nunca alargado. Aparece claro, con poca densidad y con escasos grumos de heterocromatina adheridos a la membrana nuclear (Fig. 17A). El citoplasma también es claro, con mitocondrias alargadas y muy densas y todavía escaso retículo endoplásmico rugoso (Fig. 17B). Las uniones intersertolianas especializadas y los profundos repliegues de la membrana nuclear, típicas de las células de Sertoli de los machos XY adultos, no se observan aún en estas células embrionarias. Casi idénticas características citológicas pueden observarse en las células de Sertoli XX de los ovotestes de las hembras de topo en el estadio E15b y durante la vida adulta de estas hembras (Fig. 17C). Durante la formación del tejido testicular de los ovotestes de las hembras, en los estadios E9-E10 por ejemplo, las células que componen las esférulas tienen núcleos más irregulares y heterocromáticos y su citoplasma es más pequeño (Fig. 17D). Estas células son muy similares a las de los cordones medulares que contienen las gónadas de las hembras XX a partir de E5b (Fig. 18A). Esto demuestra que las células de Sertoli de los ovotestes de *T. occidentalis* adquieren su morfología definitiva de Sertoli inmaduras en el periodo E11-E15, es decir bastante tiempo después de haber inducido la diferenciación de las demás estructuras testiculares, tales como células de Leydig, células mioides, tejido vascular y túnica albugínea. También queda de manifiesto el hecho de que

RESULTADOS

esta actividad Sertoliana no afecta el desarrollo del tejido ovárico adyacente si este contiene oocitos.

Por su parte, las células de Leydig que se diferencian en los testículos de machos XY durante E5b tienen un núcleo redondeado, aunque no es aún típicamente redondo, que contiene escasa heterocromatina y uno o dos nucleolos en crecimiento (Fig. 18B). Su citoplasma no es muy grande todavía y aparece redondeado, aunque nunca llega a ser poligonal, tal como ocurre típicamente en las células de Leydig de los topes adultos de ambos sexos (Jiménez y col., 1993). Las gotas lipídicas y las cisterna de retículo endoplásmico liso están aumentando en número y tamaño, aunque son escasos todavía. Las mitocondrias son aún alargadas y no han alcanzado su morfología definitiva, con forma redondeada y crestas tubulares. Por otra parte, las células de Leydig XX que se diferencian en las gónadas de las hembras durante los estadios E9 y E10 presentan características morfológicas muy similares a las de los machos E5b, con la excepción de que muestran un núcleo más heterocromático (Fig. 18C). Finalmente, las células de Leydig XX de las hembras E15b (Fig. 18D), son idénticas a las presentes en la hembras adultas XX e idénticas a las de los machos adultos XY (Jiménez y col., 1993).

DESARROLLO DE LOS CONDUCTOS DE Wolff Y DE MÜLLER EN AMBOS SEXOS

En los topes, los conductos de Wolff ya son observables a lo largo del mesonefros en embriones del estadio E4 (Fig. 19A), mientras que los Conductos de Müller aparecen en el tubérculo urogenital durante E5a (Fig. 19B). En los machos XY, la testosterona producida por los testículos induce el rápido crecimiento de los Conductos de Wolff (Fig. 19C), que hacia E8 se han diferenciado como epidídimos y conductos deferentes claramente reconocibles (Fig. 19 D). Paralelamente a esto, los túbulos mesonéfricos se diferencian en canales eferentes y quedan conectados a la *rete testis* del testículo. La regresión de los conductos de Müller también se produce de forma rápida en los machos XY de topo. Los primeros signos de degeneración de los Conductos de Müller se observan ya en embriones E5c, dicha degeneración es casi total en E6 (Fig. 19C), en que sólo

FIG. 17. Análisis ultraestructural de diversos tipos celulares en gónadas de *Talpa occidentalis*.

A) Células de Sertoli recién diferenciadas (S) en un cordón medular (testicular) de un testículo XY en el estadio E5b. CG, célula germinal; L, célula de Leydig en proceso de diferenciación; M, célula mioide en diferenciación.

B) Detalle a mayor aumento de una de estas células de Sertoli XY recién diferenciadas (S).

C) Células de Sertoli XX (S), localizadas en una esférula testicular de uno de los ovotestes de una hembra juvenil en el estadio E15b; M, célula mioide. Su aspecto es casi idéntico al de la célula de Sertoli XY embrionaria mostrada en la micrografía B.

D) Porción de una esférula medular (flecha) durante el proceso de formación del tejido testicular en una gónada XX de una cría E9-E10. Las células que contiene no han adquirido aún la morfología de Sertoli inmaduras mostrada en B y C.

Las barras representan 5 μm en A, C y D, y 2 μm en B.

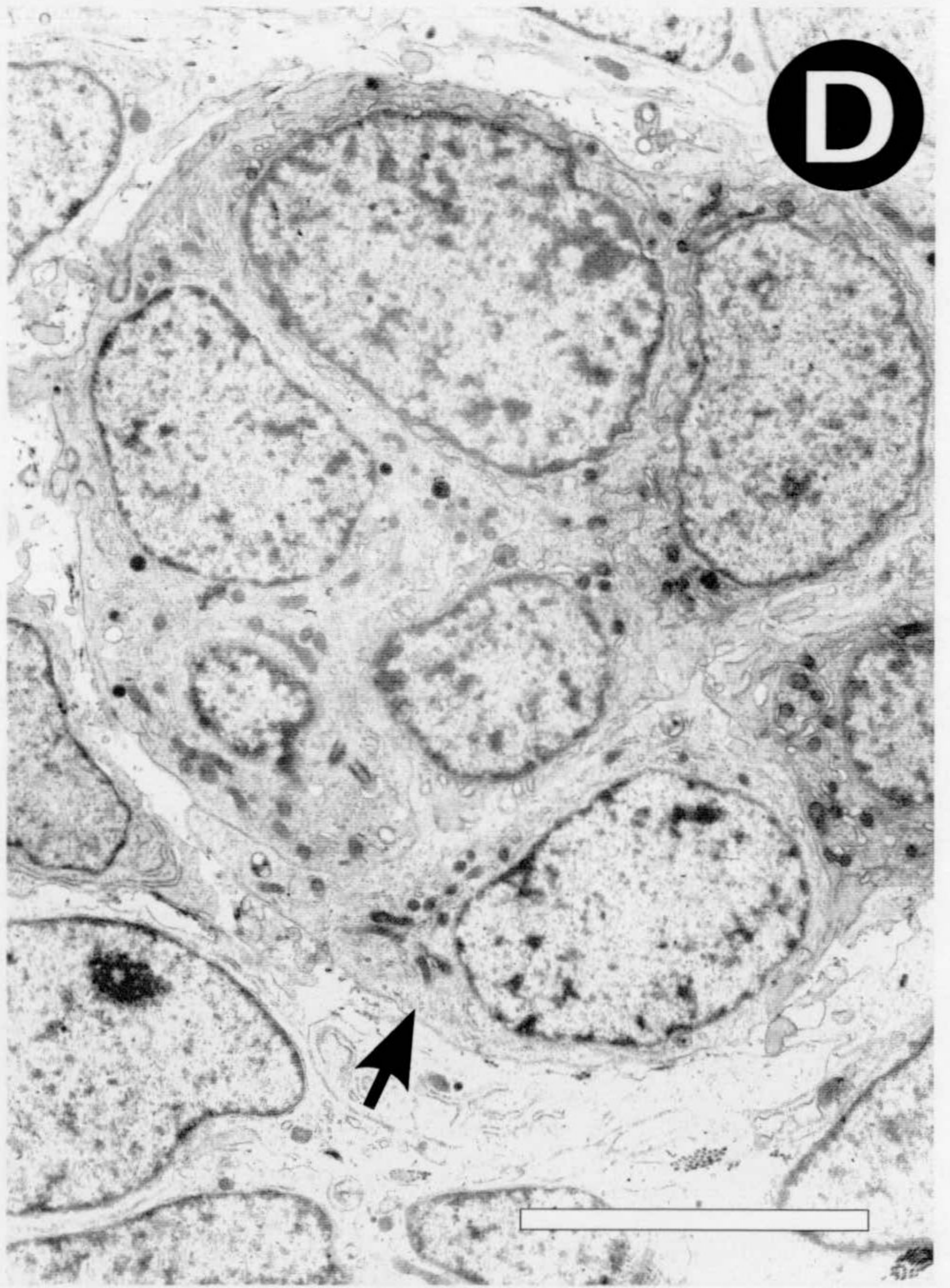
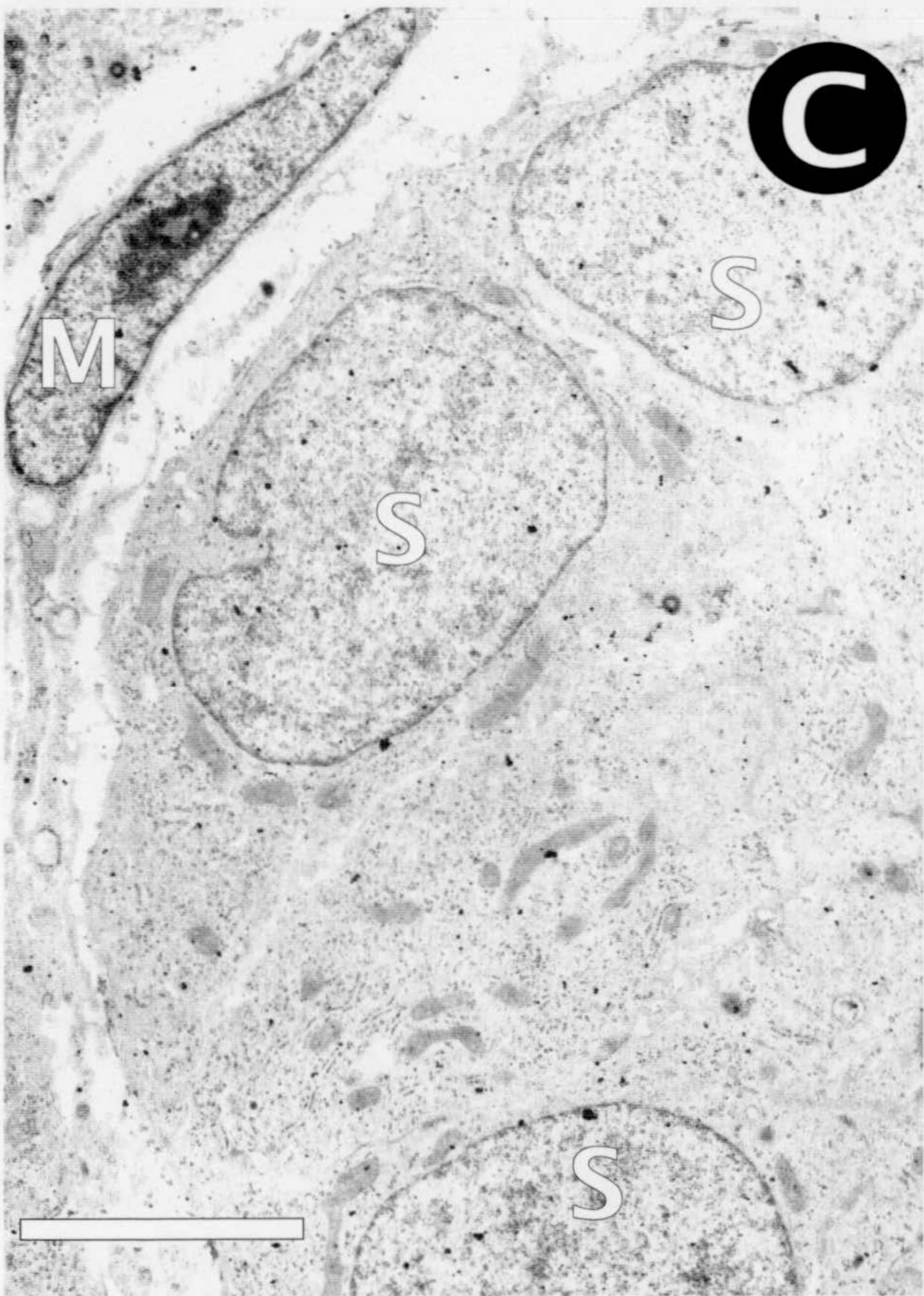
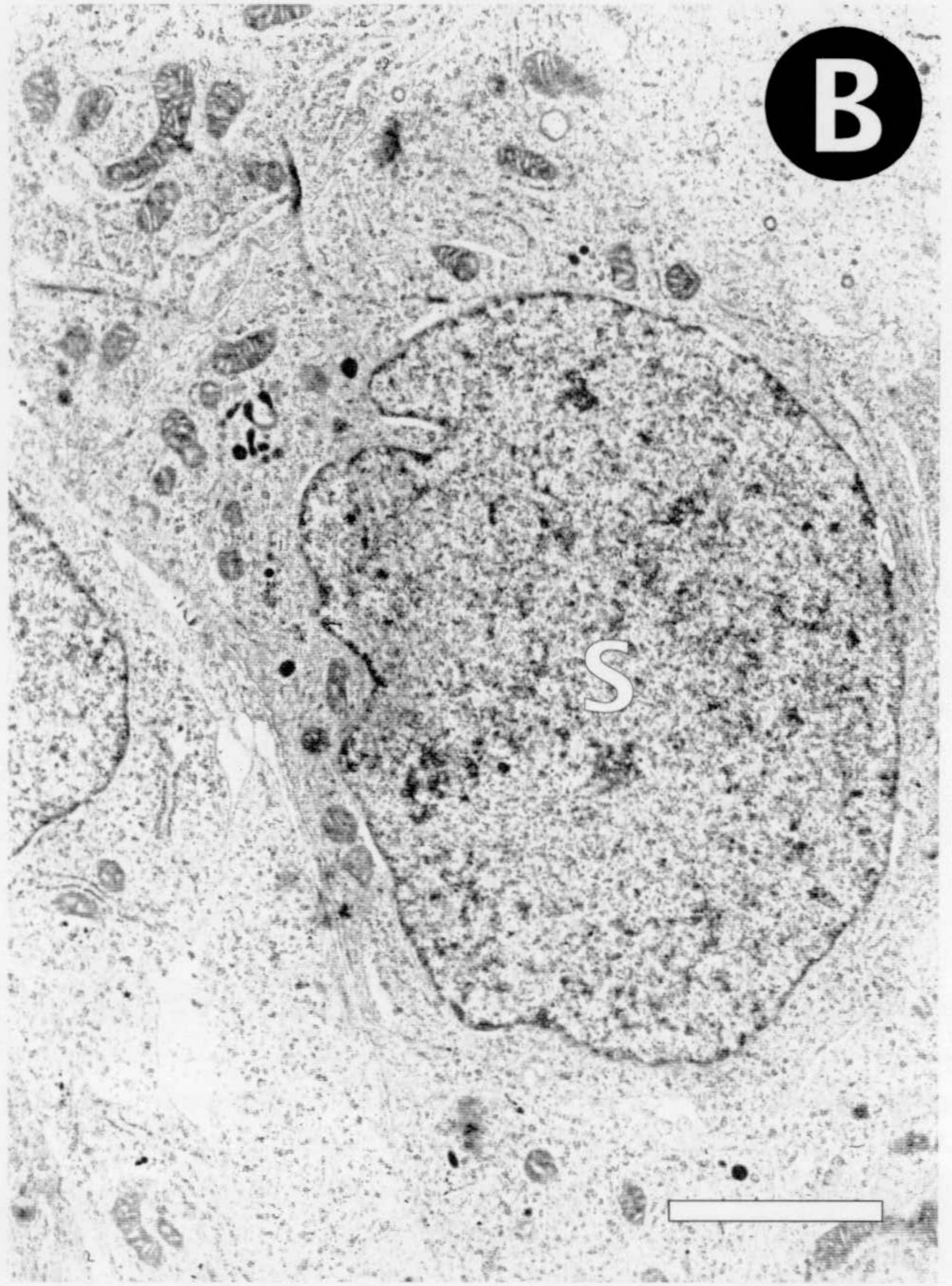
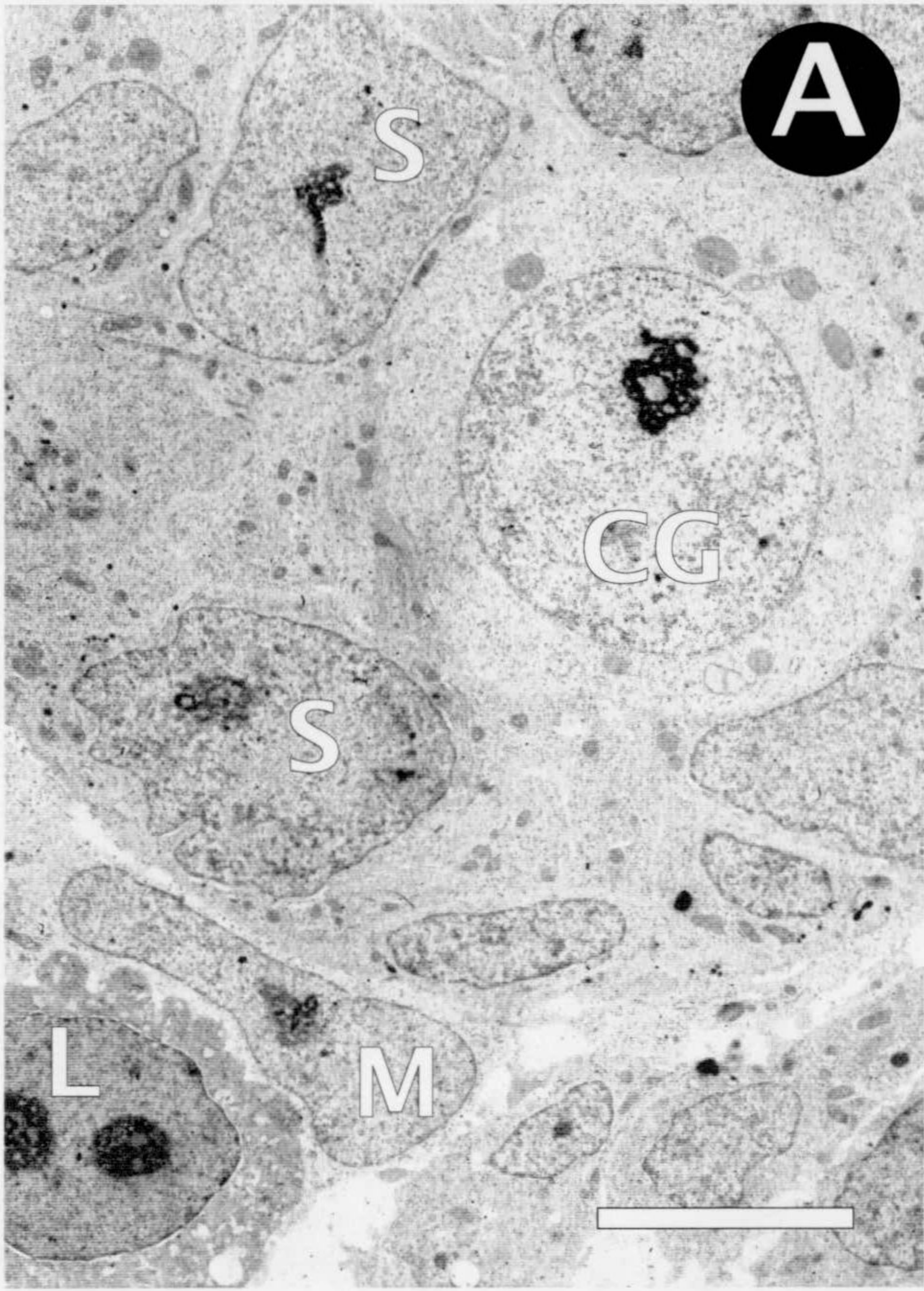


FIG. 18. Análisis ultraestructural de diversos tipos celulares en gónadas de *Talpa occidentalis*.

- A)** Cordón medular recién formado en una gónada XX durante el estadio E5b. Las células que lo componen no se asemejan a las células de Sertoli inmaduras, tal como aparecen en los testículos XY del mismo estadio E5b (ver Fig. 17 A y B) o en los ovotestes XX de hembras juveniles E15b (ver Fig. 17C), sino más bien a las células de las esferulas medulares del tejido testicular en formación en los ovotestes de crías XX en estadio E9-E10 (ver Fig. 17D).
- B)** Célula de Leydig en proceso de diferenciación en un testículo XY durante el estadio E5b.
- C)** Célula de Leydig en proceso de diferenciación en un ovoteste XX en una cría E9-E10. Su morfología es bastante similar a la de la célula mostrada en B, aunque el núcleo presenta mayor cantidad de heterocromatina.
- D)** Detalle de una célula de Leydig XX completamente diferenciada y funcional en el ovoteste de una hembra juvenil E15b. Su aspecto es idéntico a las de los machos adultos. M, mitocondria de crestas tubulares; N, núcleo. Las barras representan 5 μm en A, 2 μm en B y C, y 1 μm en D.

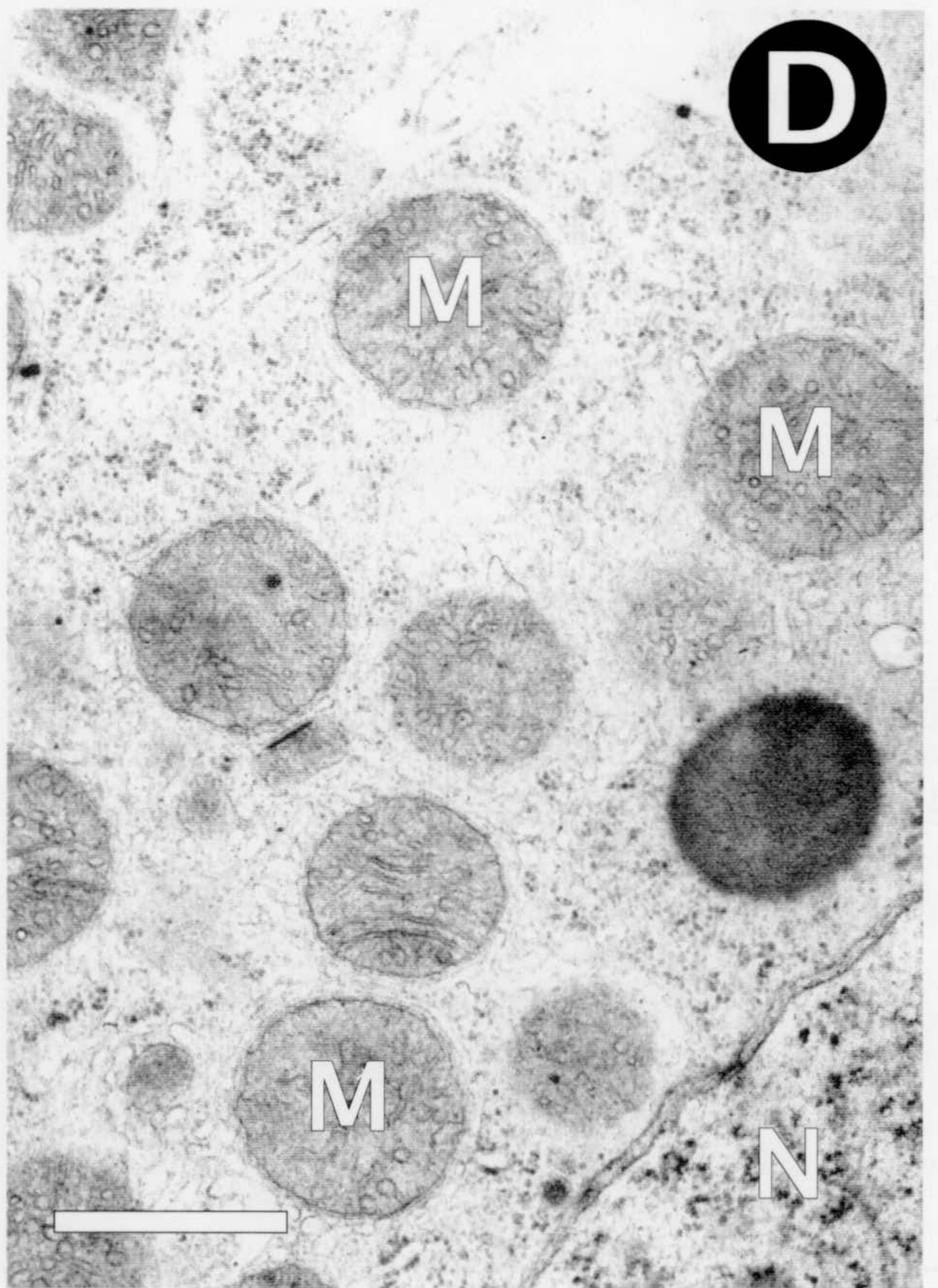
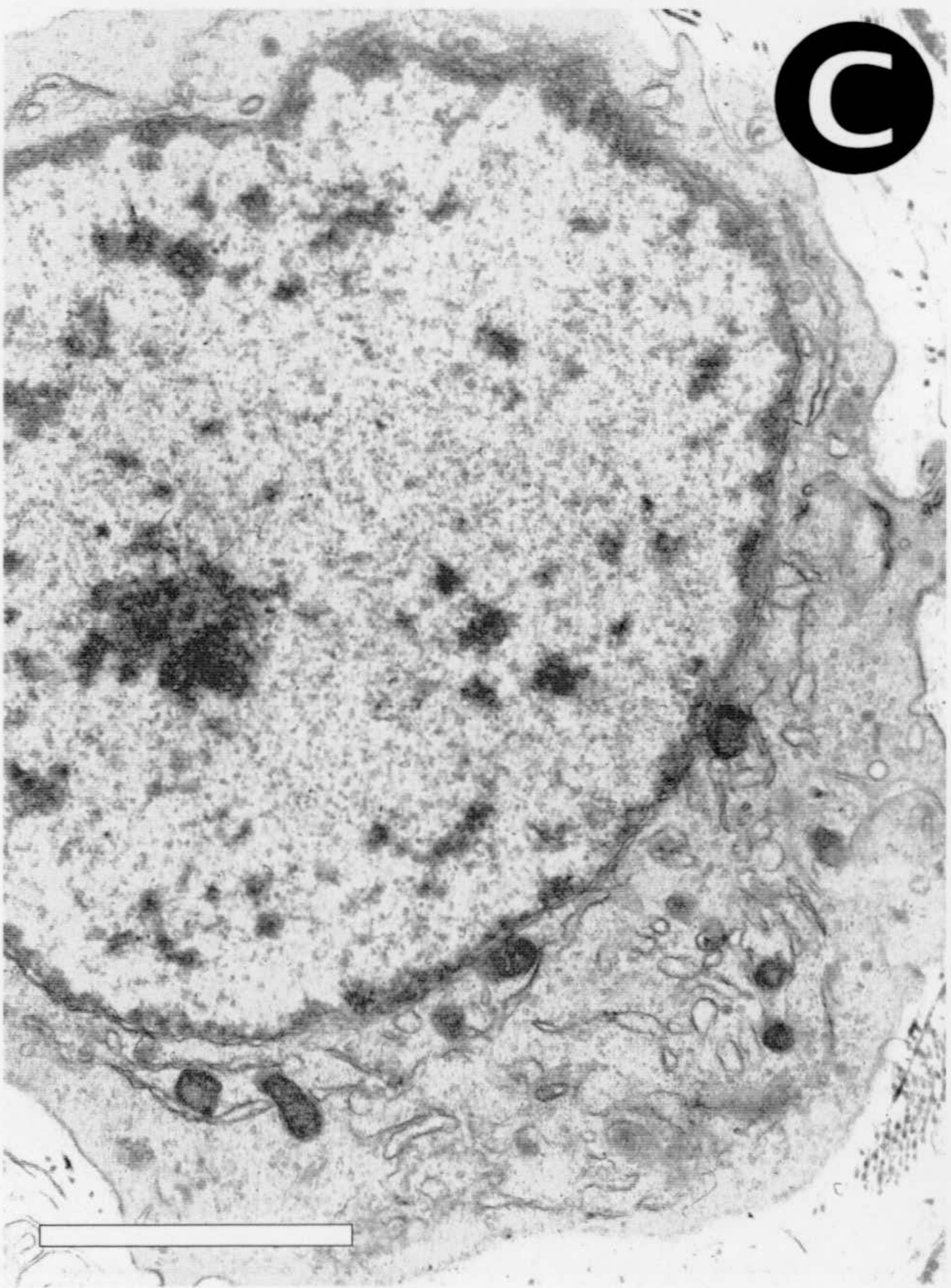
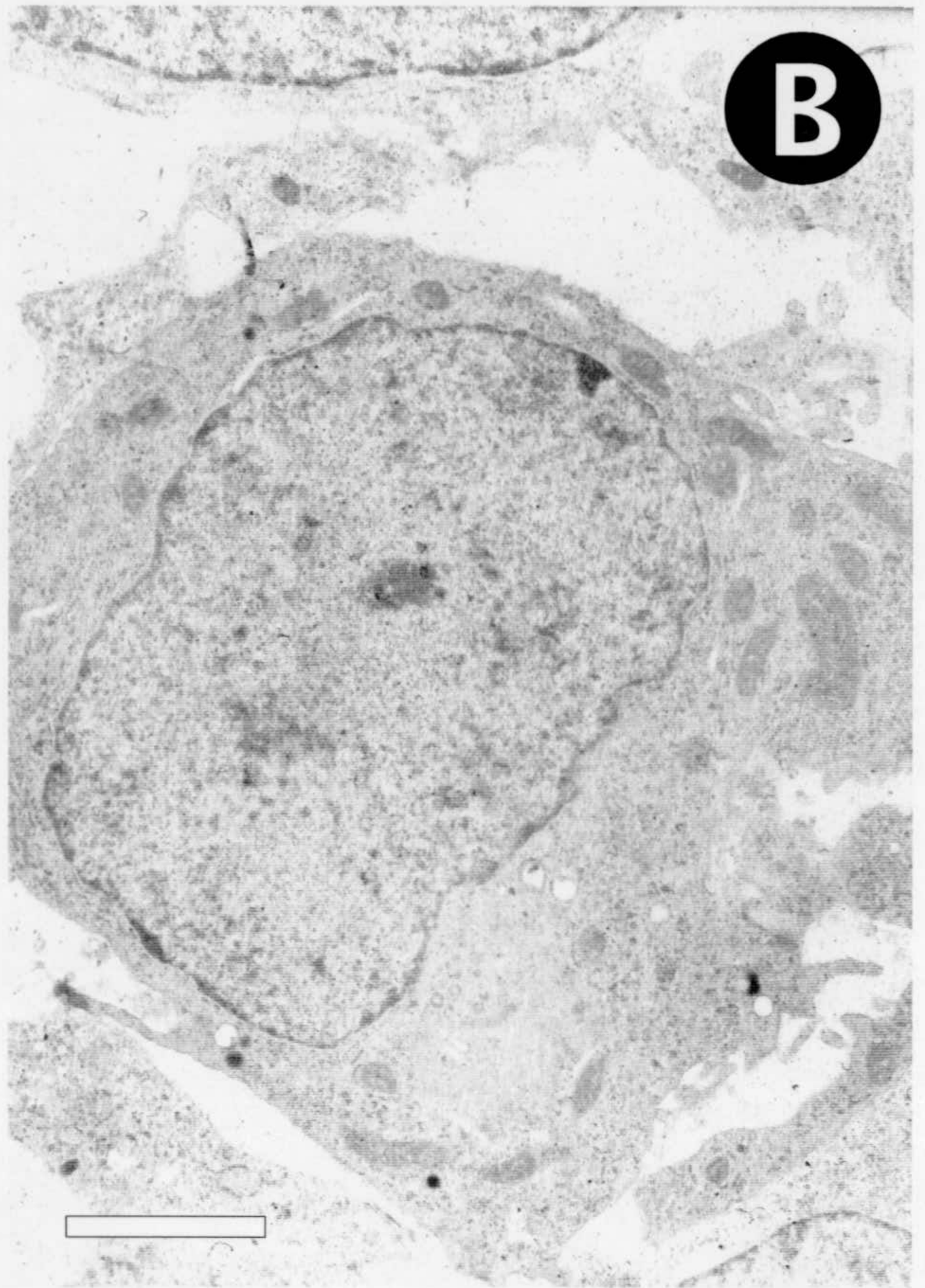
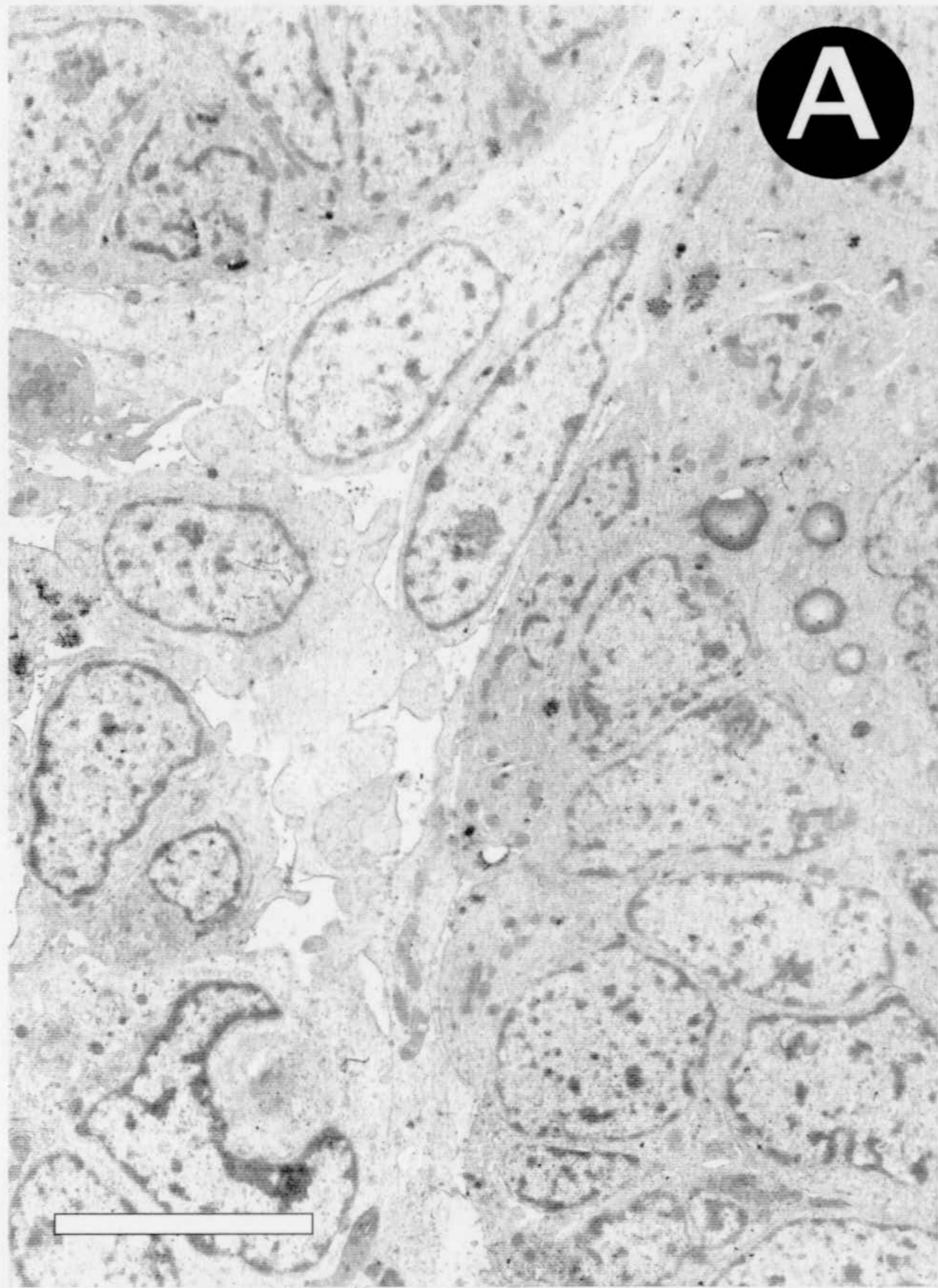
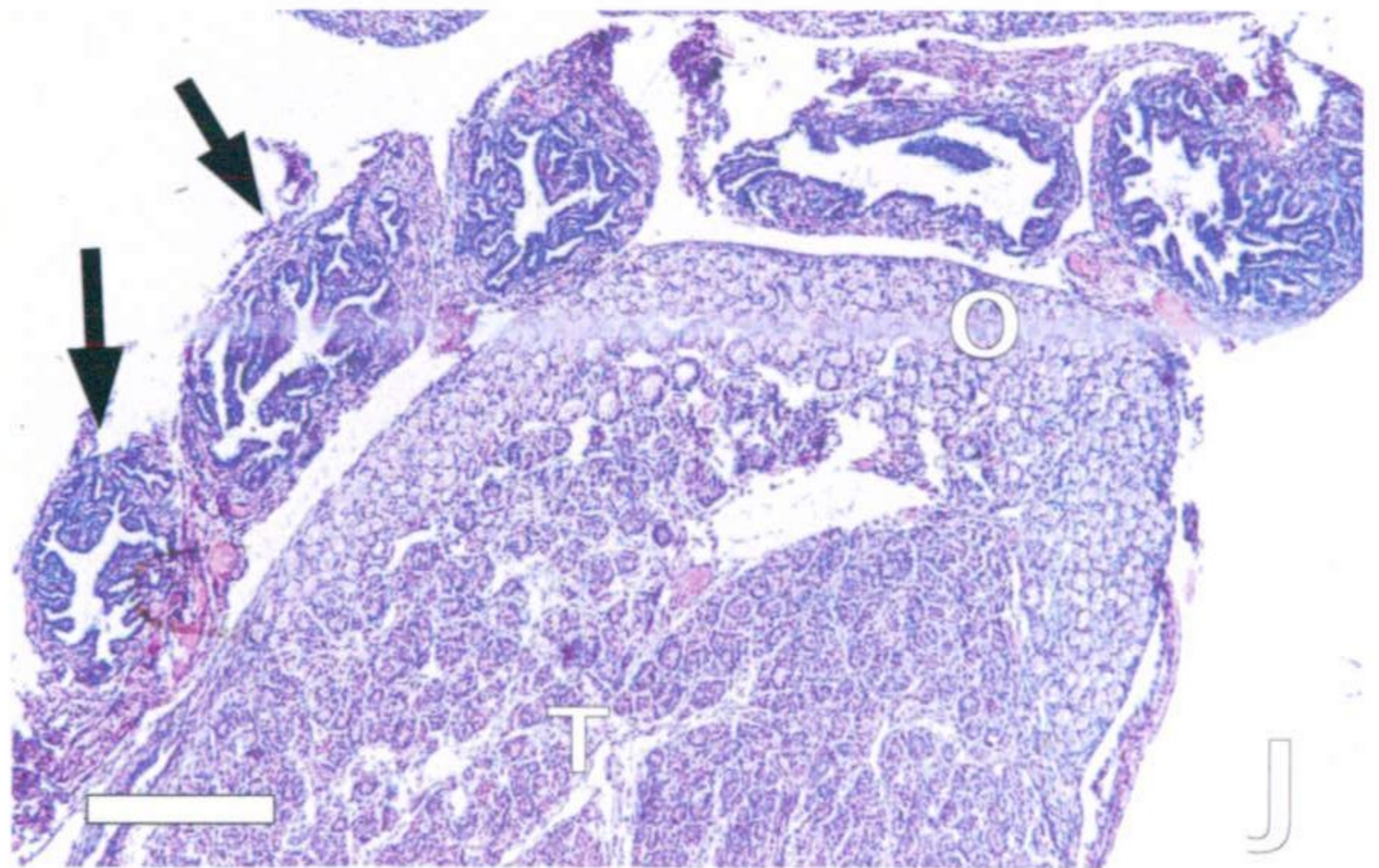
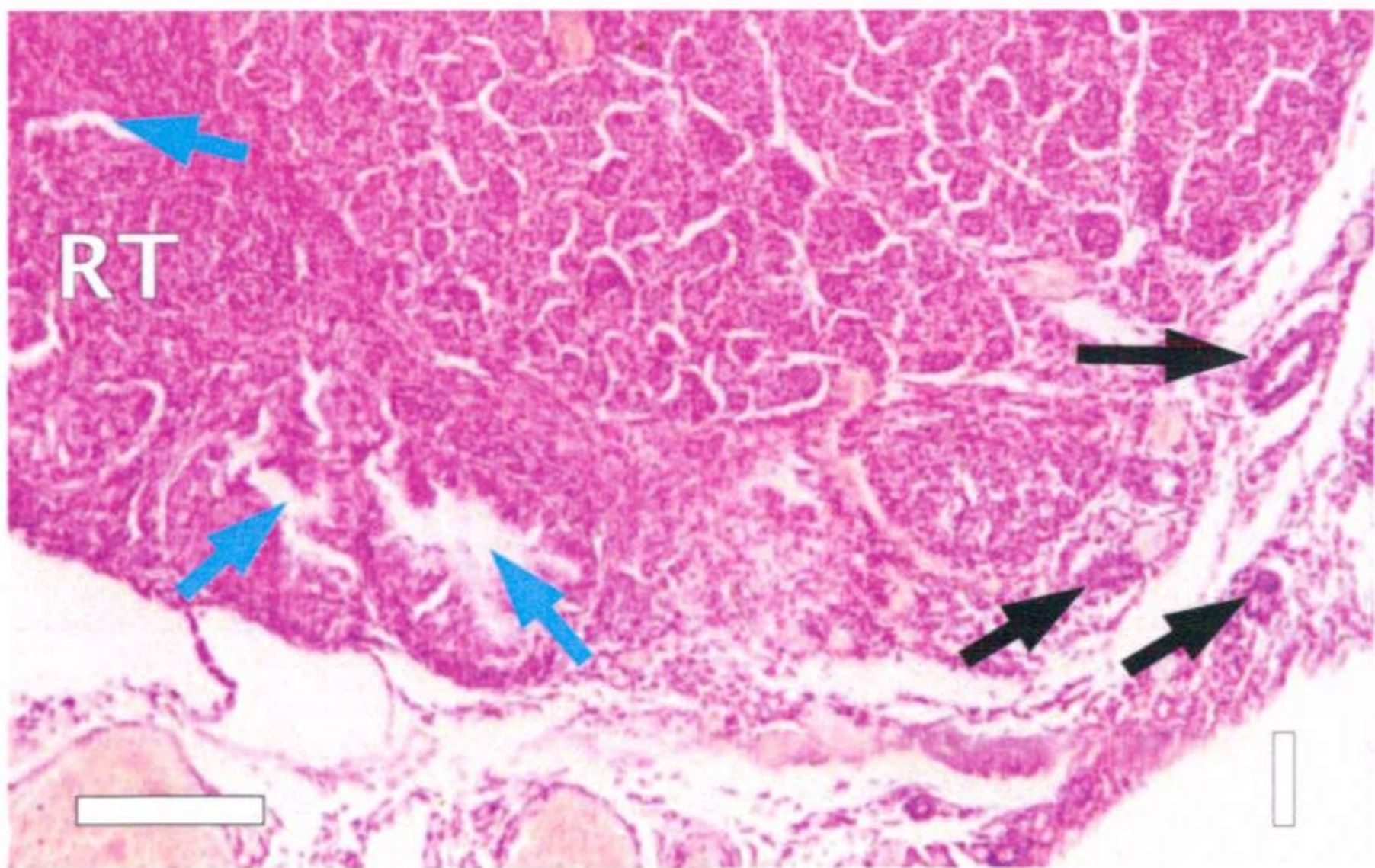
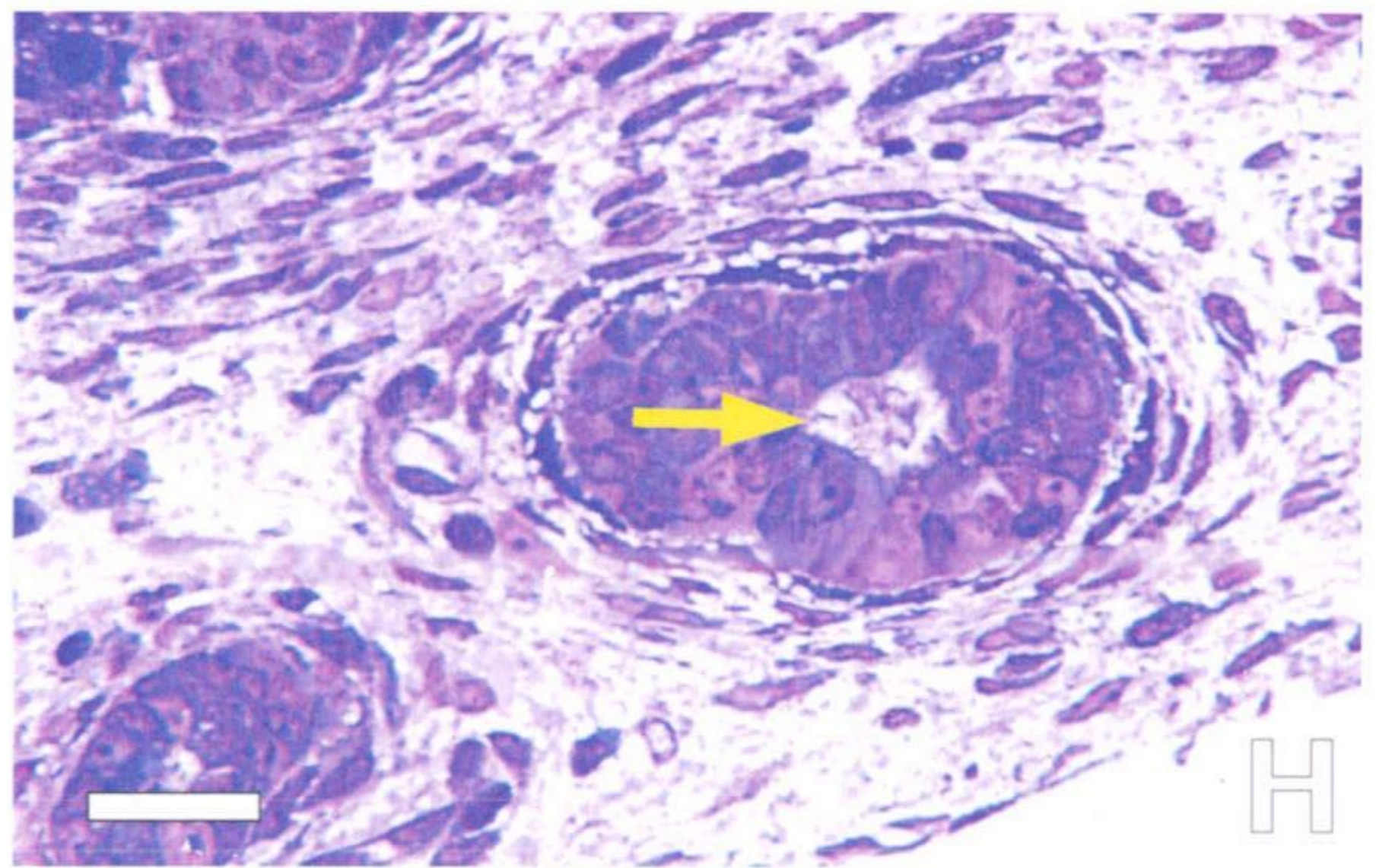
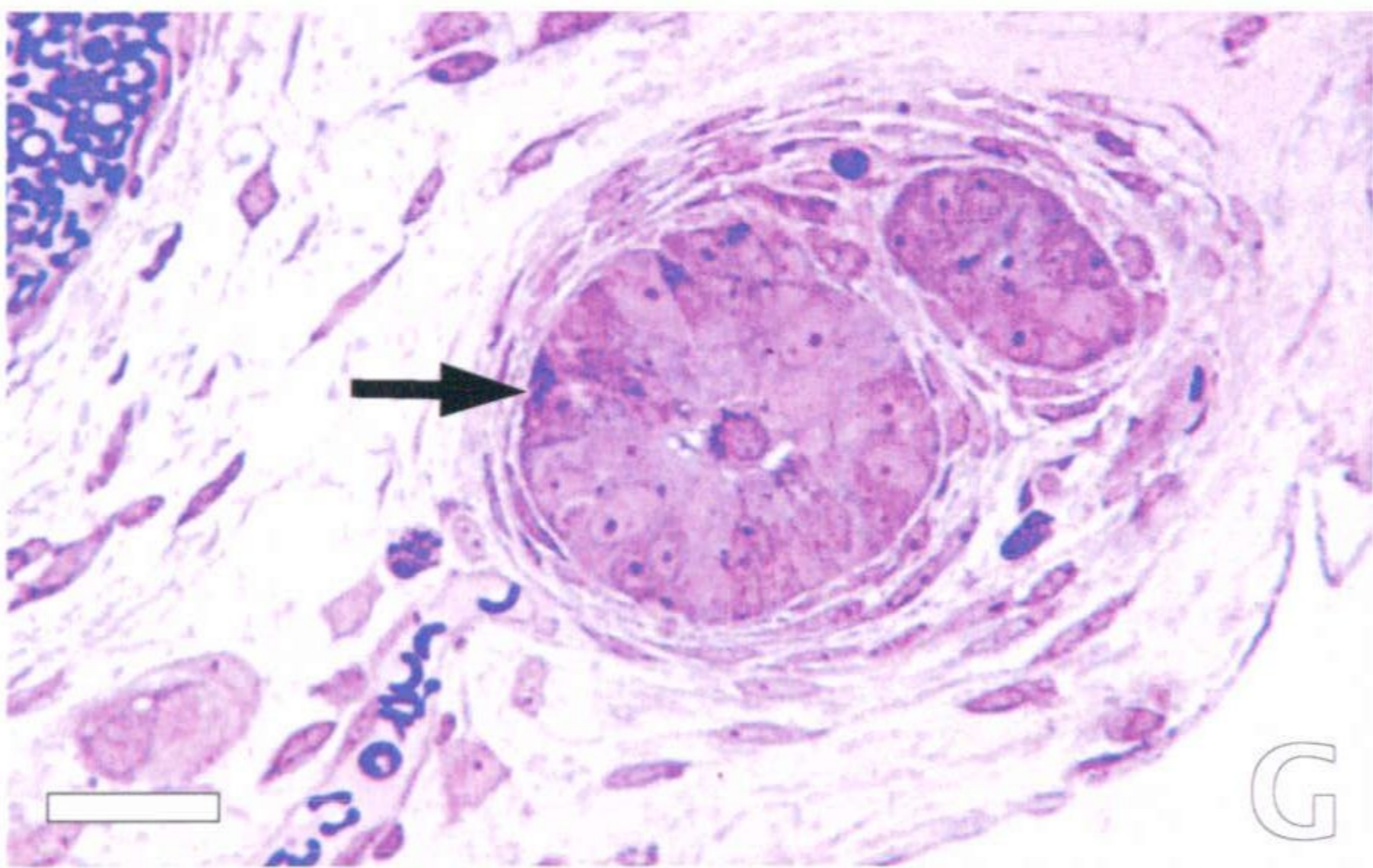
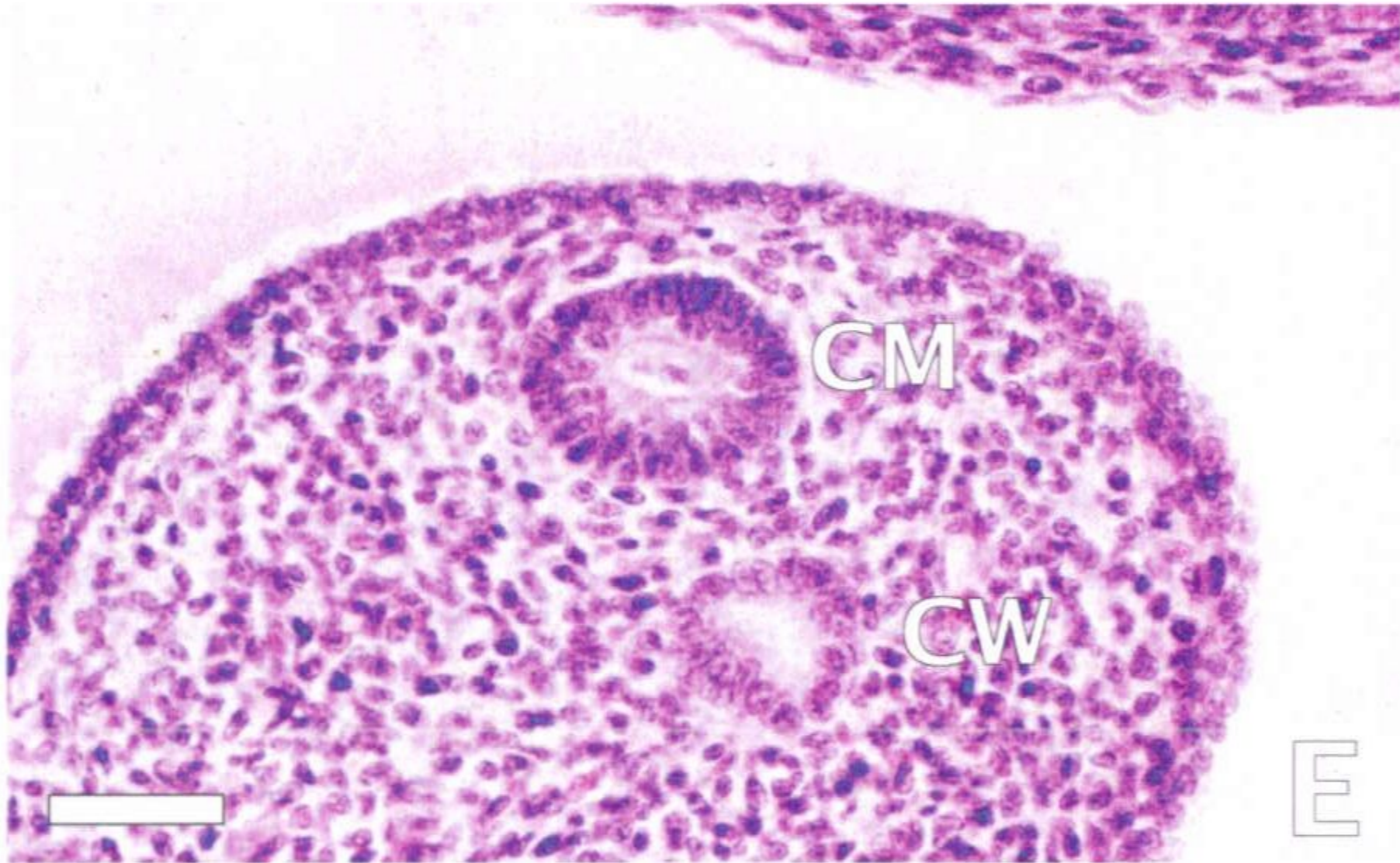
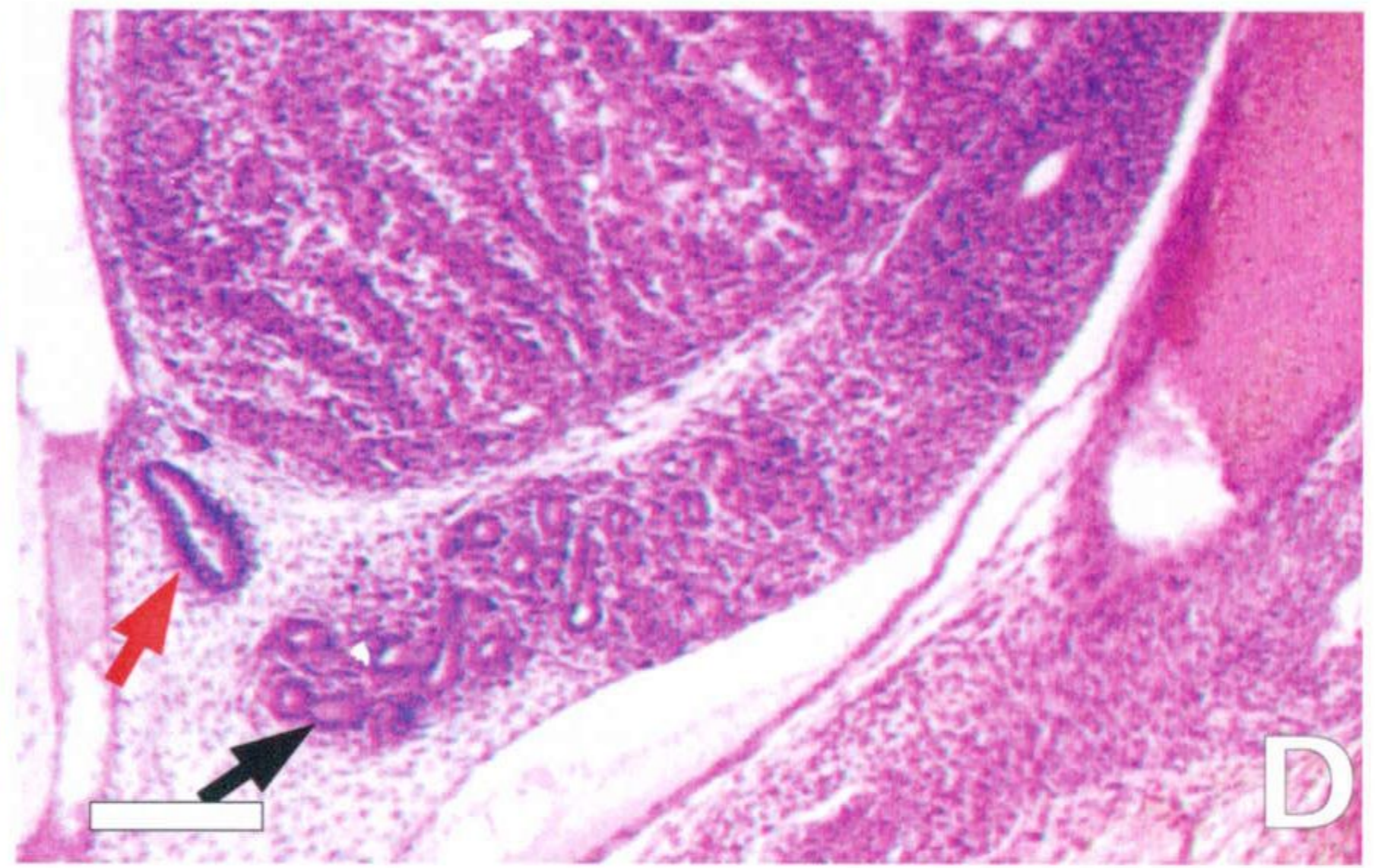
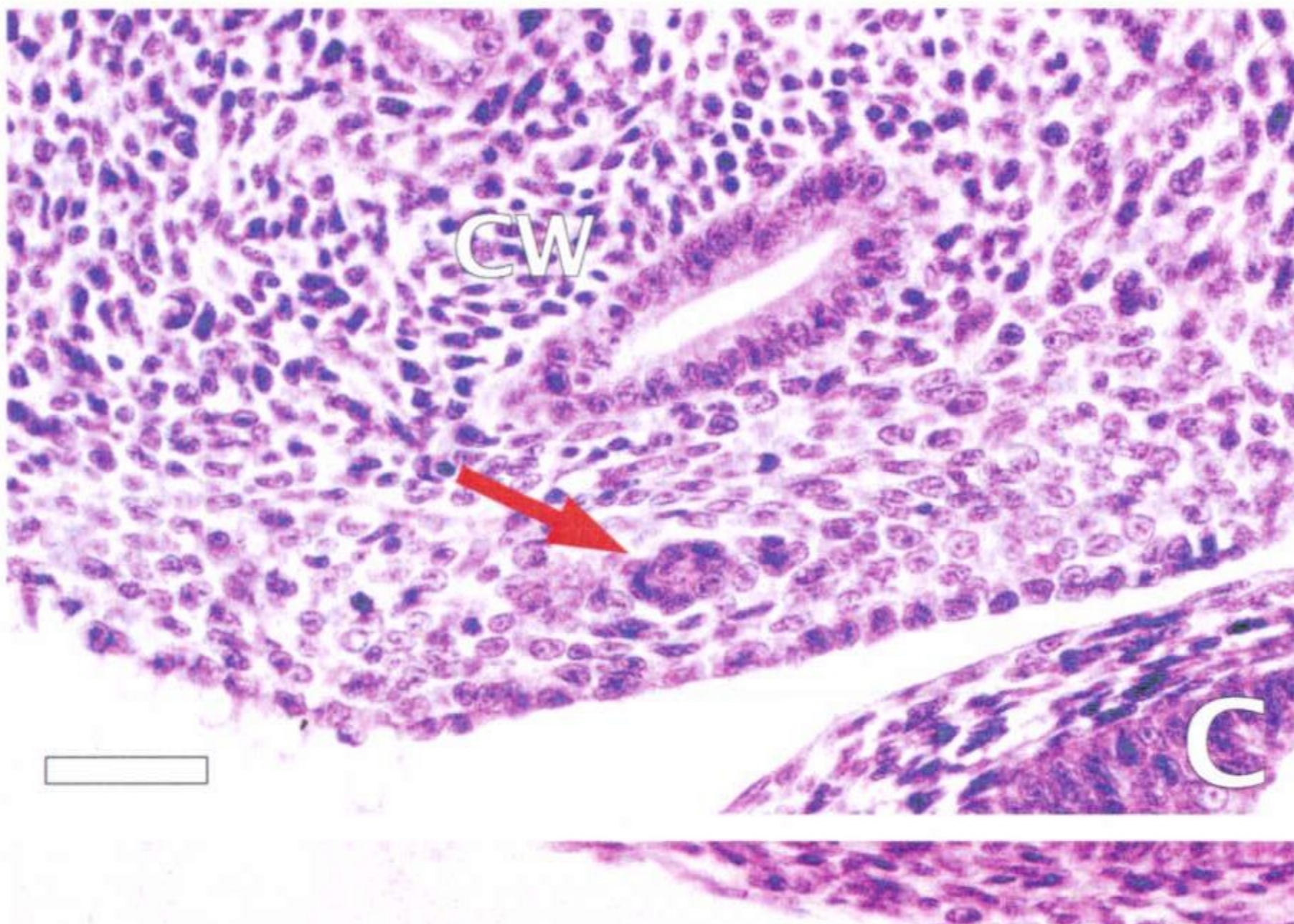
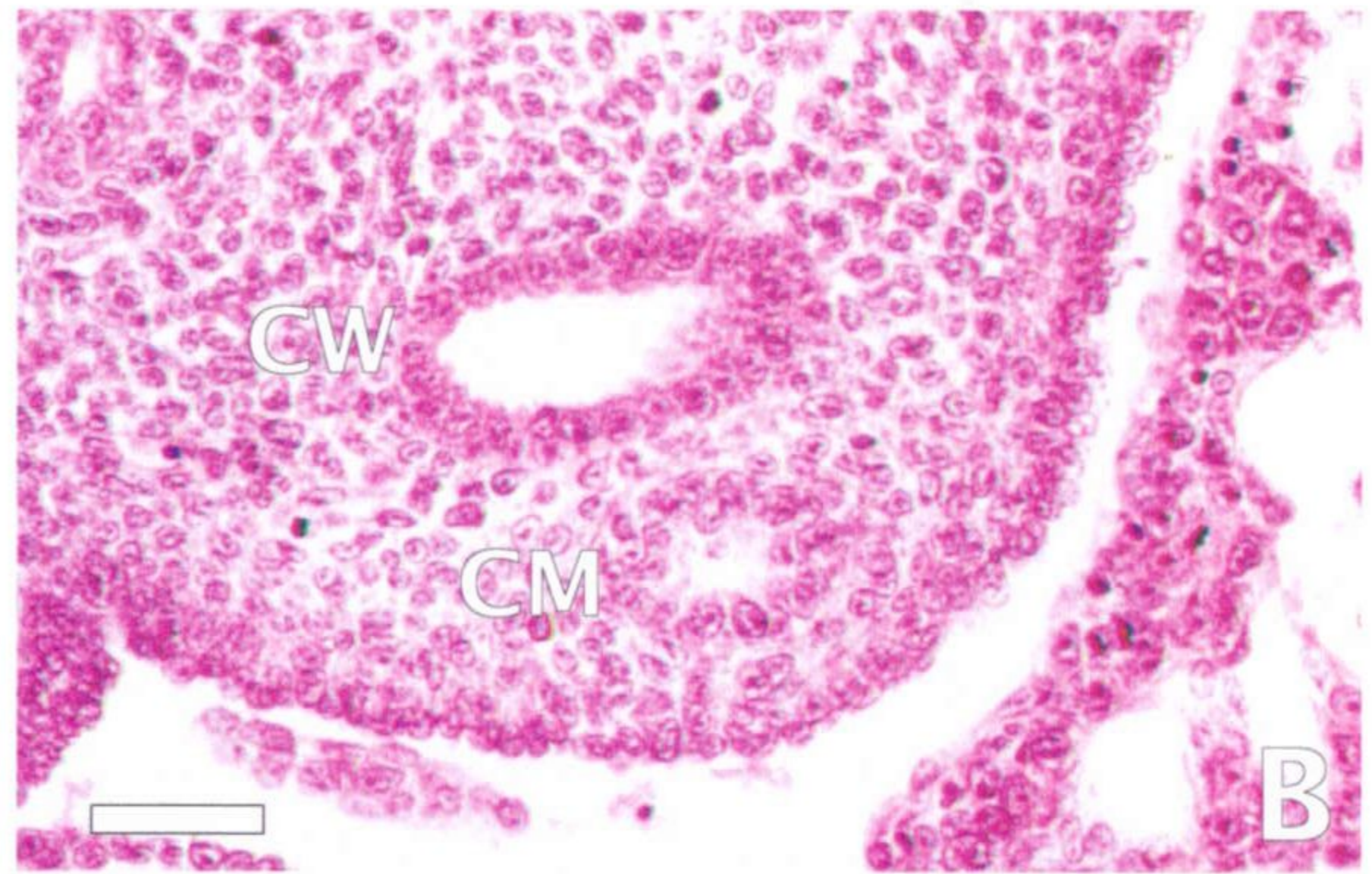
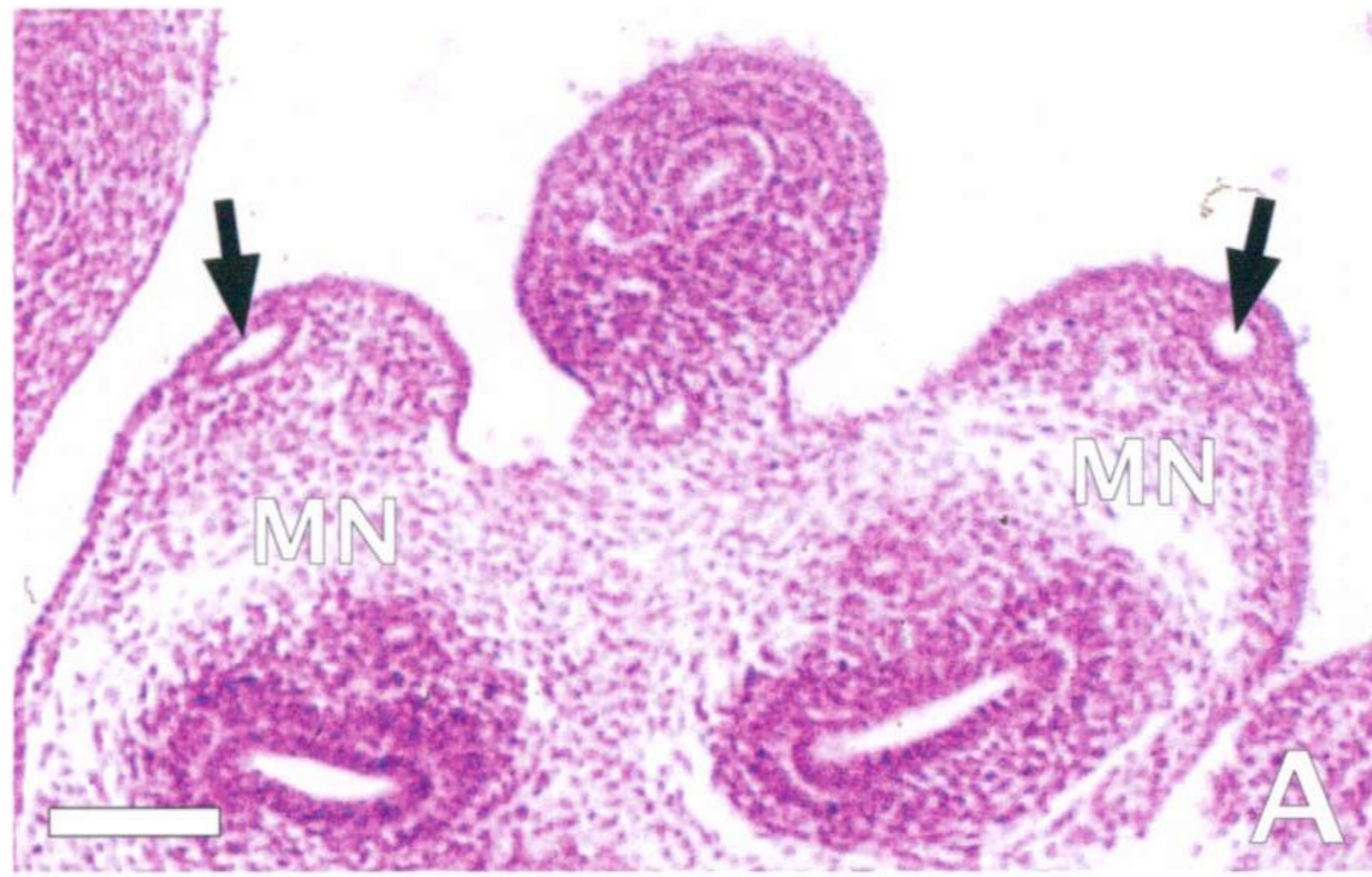


FIG. 19. Desarrollo de los conductos de Wolff y de Müller en machos y hembras de *Talpa occidentalis*.

- A)** Conductos de Wolff (flechas) en los mesonefros (MN) de un embrión XX en estadio E4.
- B)** Conducto de Müller recién formado (CM) y conducto de Wolf (CW) en un embrión en E5b.
- C)** En un embrión XY en E6, los conductos de Müller están ya casi desorganizados (flecha), mientras que los conductos de Wolf continúan creciendo (CW).
- D)** En los machos XY en E8 los conductos de Müller han desaparecido por completo, mientras que los conductos de Wolf se han diferenciado como epidídimos (flecha negra) y conductos eferentes (flecha roja) claramente reconocibles.
- E)** En los fetos XX en E8 los conductos de Müller (CM) están ya más desarrollados que los de Wolf (CW), que empiezan ahora a sufrir un proceso de regresión.
- F)** En los fetos XX en el estadio E9 los conductos de Wolf (CW) presentan claros signos de degeneración; CM conducto de Müller.
- G)** En los fetos XX en E12, los conductos de Wolf comienzan a regenerarse, incrementando su grosor (flecha).
- H)** En hembras E13 la regeneración de los conductos de Wolff se hace más acusada por la reapertura de un claro lumen tubular (flecha)
- I)** En hembras E15b los conductos de Wolf regenerados se han diferenciado ya como epidídimos rudimentarios (flechas negras), adyacentes a la *rete-testis* (RT). Las flechas azules señalan canalículos de la *rete-testis*.
- J)** En una hembra juvenil E15b los conductos de Muller se ha diferenciado como oviductos (flechas), útero y parte superior de la vagina (no mostrado) (O, tejido ovárico; T, tejido testicular).

Las barras representan 20 μm en B-H, 80 μm en A-B y 150 μm en I-J.



RESULTADOS

persisten a la altura del tubérculo urogenital, y desaparecen por completo hacia E8. Como vemos, este patrón de desarrollo no se aparta significativamente de lo normal en los machos del resto de mamíferos estudiados.

Sin embargo, en las hembras de topo el desarrollo de los Conductos de Wolff y de Müller tiene un destino que es solo parcialmente opuesto al de los machos, y resulta claramente llamativo si se compara con el de otros mamíferos. Los Conductos de Müller van creciendo gradualmente durante todo el periodo de desarrollo pre y postnatal (Fig. 19E), de manera que hacia E9 son ya bastante gruesos y presentan un claro lumen abierto en su interior (Fig. 19F), y alrededor de E15, se han diferenciado ya como oviductos, útero y canal útero-vaginal (Fig. 19J). Sin embargo, la regresión de los Conductos de Wolff nunca comienza en las hembras de topo antes del estadio E8, poco antes del nacimiento, cuando se muestran los primeros signos de degeneración (Fig. 19F), y cesa en E12, unas dos semanas después del nacimiento, cuando se comienzan a observar claros signos de recuperación estructural (Fig. 19G). El Conducto de Wolff que se había convertido en un cordón delgado y sin lumen durante el periodo E8-E11, se regenera de nuevo en E12, mostrando un diámetro incrementado y recuperando su lumen interno (Fig. 19H). Estos fenómenos ocurren poco tiempo después de la diferenciación de grandes masas de células de Leydig en el tejido testicular de los ovotestes recién formados. Estos conductos de Wolff regenerados se transforman durante E15 en un epidídimo rudimentario que, aunque escasamente plegado, presenta un lumen típicamente ciliado y se localiza cerca de la *rete testis* formada en la porción testicular (Fig. 19I).

CLONACIÓN DE UN FRAGMENTO DEL GEN *DAX1* DE *T. occidentalis*

La amplificación mediante PCR con los oligonucleótidos DAX1SP2 y DAX1SP5 utilizando como molde ADN genómico de *Talpa occidentalis* dió como resultado la obtención de una banda correspondiente a segmentos de ADN de unos 400pb de longitud, según se dedujo de su análisis mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN contenido en la banda fué aislado y clonado, y 5 clones fueron secuenciados. La longitud del

RESULTADOS

fragmento y el análisis de su secuencia indican que se han amplificado la tercera y cuarta repetición del DBD aunque los últimos 10 nucleótidos corresponden a parte de la secuencia de DAX1SP2 (Fig. 20).

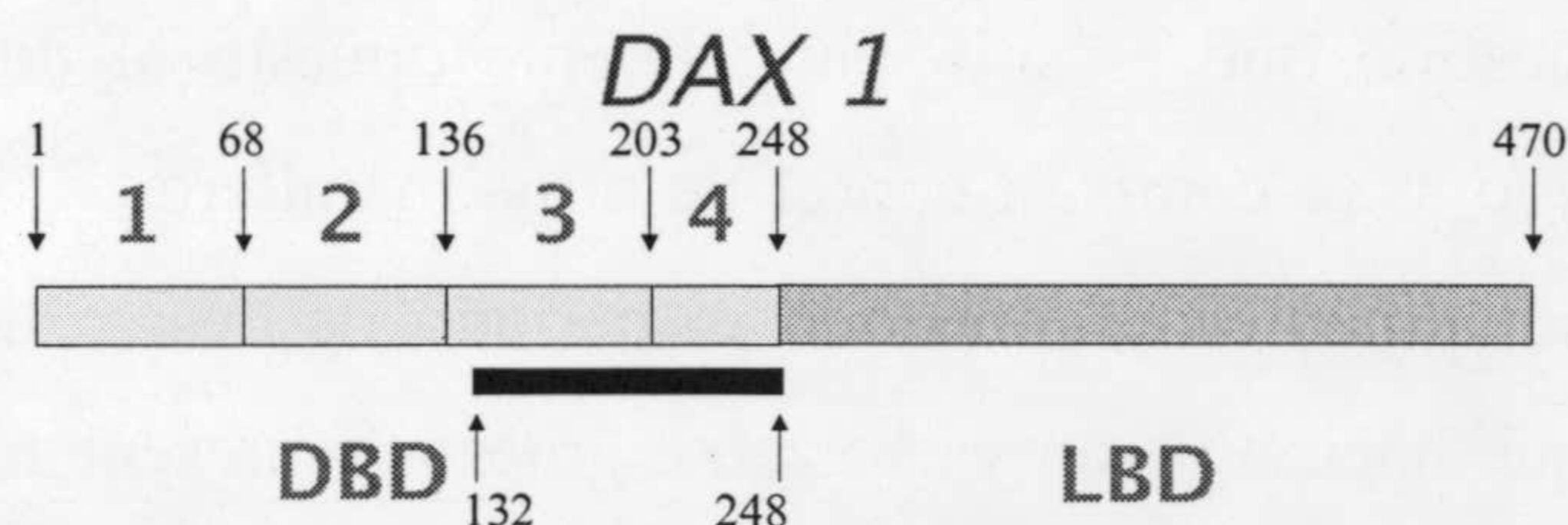


Figura 20. Esquema de la estructura de la proteína DAX1. La banda negra indica la posición de los aminoácidos codificados por el segmento clonado. DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando.

El fragmento amplificado tiene 399pb de longitud, correspondiendo 44 de ellos (22 en cada extremo) a la secuencia de los oligonucleótidos empleados para la amplificación, por lo que la secuencia correspondiente al fragmento de ADN de *T. occidentalis* amplificado es de 355pb. Una búsqueda FASTA (Pearson y Lipman, 1998; Pearson, 1990) en bases de datos de secuencias de ADN reveló una alta homología con secuencias del gen *DAX1* humano, de cerdo, de rata y de ratón tanto a nivel de ADN (Fig. 21), como de proteínas (Fig. 22).

También se compararon entre sí las secuencias de las dos repeticiones clonadas de *T. occidentalis*, lo que reveló que la homología entre ellas se restringía a la primera mitad de cada repetición, como se muestra en la Fig. 23. En esta alineación se incluyen amplios "gaps" en la segunda mitad, que podrían reflejar la presencia de deleciones que afectan a la cuarta repetición del DBD siendo por tanto más corta que las demás, y concretamente, más corta que la tercera repetición de *T. occidentalis* clonada, lo que es común a todas las especies de mamíferos en las que se conoce la secuencia de *DAX1*. Si no se permiten los "gaps" durante la alineación vemos que sólo los 80 primeros nucleótidos son los responsables de la mayor parte de la homología entre las secuencias. Concretamente, estos 80 nucleótidos muestran una homología del 77.5%.

Figura 21. Secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento clonado del gen *DAX1* de *Talpa occidentalis*, y alineaciones con el mismo segmento de otras especies

GCTGCTGCTT	TTGCGGAGAA	GACCACCCGC	GGCAGGGCAG	CATCCTCTAC	AGCTTGCTCA	60
CCAGCGCCAA	GCAAACGCAC	GTGGCTCCGG	AAGCCCCCGA	GGCGGGCTG	GGAGGCTCCT	120
GGTGGGACCG	GTCCTACTGA	GCGCAGAGGC	CGGGGGGCAG	AGAGGAGCAG	CTGGGCGGGA	180
GGGTCGTGGC	GCCCCTGTGC	CGCTGCTGCT	GCTGTGATGA	AGACCACCCG	CAGCCGGGCG	240
GCATCCTGTA	CCACAAGCCC	GGGAGCGCAA	AGCAAACGCA	CGCGGCTCCC	GAGATGCCAT	300
CGGGGGCCCC	CTGGTGGGAC	CCCCCGTGTG	GCGCGGAGCG	CCGGGTGACC	CTCAA	355

<p><i>Homo sapiens</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>GCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGCGGCAGGGCAGCATCCTCTACAGCTTGCTCA ***** GCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGCGGCAGGGCAGCATCCTCTACAGCTTGCTCA CTAGCTCAAAGCAAACGCACGTGGCTCCGGCAGCGCCGAGGCACGGCCAGGGGCGCGT * * * * * CCAGCGCCAAGCAAACGCACGTGGCTCCGGGAAGCCCCGAGGCGCGGCTGGGAGGCTCCT GGTGGGACCGCTCCTACTTCGCGCAGAGGCCAGGGGGTAAAGAGGCGCTACCAGGCGGGC ***** GGTGGGACCGCTCCTACTGAGCGCAGAGGCCGGGGGGCAGAGAGGAGCAGCTGGGCGGGA GGGCCACGGCGCTTCTGTACCGCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGAGCAGGGCA * * * * * GGTTCGTGGCGCCCTGTGCCGTGCTGCTGTGATGAAGACCACCCGAGCAGCGGGC GCACCCTCTACTGCTGCCACGAGCACAATCAAGCGCAGGCGGCTCCGAGGAGCGGC * * * * * GCATCCTGTACCACAAGCCCGGAGCGCAAAGCAAACGCACGCGGCTCCGAGATGCCAT CGAGGGCCCCCTGGTGGGACACCTCCTCTGGTGGTGGCGCGGCGGCTGGCGCTCAA * * * * * CGGGGGCCCCCTGGTGGGACCCCGTGTGGCGCGGAGCGCCGGGTGACCCTCAA</p> <p>Alineados 355 Coinciden 288 No coinciden 67 Homología 81%</p>	<p><i>Talpa occidentalis</i> <i>Sus scrofa</i></p> <p>GCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGCGGCAGGGCAGCATCCTCTACAGCTTGCTCA ***** GCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGCGGCAGGGCAGCATCCTCTACAGCTTGCTCA CCAGCGCCAAGCAAACGCACGTGGCTCCGGGAAGCCCCGAGGCGCGGCTGGGAGGCTCCT ***** CCAGCGCAAAGCAAACGCACGTGGCTCTGGAAGCTCCGGAGGCGCGCCGGGGGGCGCAT GGTGGGACCGCTCCTACTGAGCGCAGAGGCCGGGGGGCAGAGAGGAGCAGCTGGGCGGGA ***** GGTGGGACCGCTCCTACTGCGCACAGAGGCTGGGAGCCAGAGAGGAGCTGCCTGGCGGGC GGGTCGTGGCGCCCTGTGCCGTGCTGCTGTGATGAAGACCACCCGAGCAGCGGGC * * * * * GGCCGGTGACGCTCCATACCGCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGAGCAGAGTG GCATCCTGTACCACAAGCCCGGAGCGCAAAGCAAACGCACGCGGCTCCGAGATGCCAT ***** GCATCCTGTCAAACATGCCTATGAGCGCAAAGCAAACGCACGTGGCTCCAGAGGCGCAGC CGGGGGCCCCCTGGTGGGACCCCGTGTGGCGCGGAGCGCCGGGTGACCCTCAA ***** CGGGGGCCCCCTGGTGGGACCCCGTGTGGCGCGGAGCGCCGGGTGACCCTCAA</p> <p>Alineados 355 Coinciden 294 No coinciden 61 Homología 82%</p>
<p><i>Rattus norvegicus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>GCTGCTGCTTCTGCGGAAAAAACACCCGAGGCAGGGCAGCATCTTATACAGCTTGCTCA ***** GCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGCGGCAGGGCAGCATCCTCTACAGCTTGCTCA CTAATGCCAACAACGCACGTGTCTCGGGAAGTACCCGAGGCACATCGCGGAGGCGAGT * * * * * CCAGCGCCAAGCAAACGCACGTGGCTCCGGGAAGCCCCGAGGCGCGGCTGGGAGGCTCCT GGTGGCAGCTGTCTACTGTACCCACAATGTGGGTGGCCCGAAGGGCTTCAGAGCACAC ***** GGTGGGACCGCTCCTACTGAGCGCAGAGGCCGGGGGGCAGAGAGGAGCAGCTGGGCGGGA AGGCCATGGCGTTCCTGTACCGTAGCTATGTGTGCTG---TGAAGAGCAGCCCCAGCAGA * * * * * GGGTCGTGGCGCCCTGTGCCGTGCTGCG---TGCTGTGATGAAGACCACCCGAGCGCGG GCAGCGTTGCCT---CCGACACGCCGTGAGAGCAGATCAAACACCAGCAGCTCCGCAAG * * * * * GCGGCAT---CCTGTACC-ACAAGCCCGGAGCGCAAAGCAAACGCACGCGGCTCC-CGAG A-GCAGCCGAGGGCCCCCTGGTGGGACACCTCCTCTGGTGTGCGAGCGTCCGATTG-CACT * * * * * ATGCCATCGGGGGCCCCCTGGTGGGACCCCGTGTGGCGCGGAGCG-CCGGGTGACCCT CAA *** CAA</p> <p>Alineados 363 Coinciden 257 No coinciden 106 Homología 70%</p>	<p><i>Mus musculus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>GCTGCTGCTTCTGCGGAGAAGAGCACCCGAGGCAGGGCAGCATCTTATACAGCTTGCTCA ***** GCTGCTGCTTTTGTGGTGAAGACCACCCGCGGCAGGGCAGCATCCTCTACAGCTTGCTCA CTAGCGCTCAGCAAACGCACGTGTCTCGGGAAGCACCAGGCACATCGCAGAGGCGAGT * * * * * CCAGCGCCAAGCAAACGCACGTGGCTCCGGGAAGCCCCGAGGCGCGGCTGGGAGGCTCCT GGTGGCAGCTGTCTACTGTACCCAGAGTGTGGGTGGCCAGAGGGGCTGCAGAGCACAC ***** GGTGGGACCGCTCCTACTGAGCGCAGAGGCCGGGGGGCAGAGAGGAGCAGCTGGGCGGGA AGGCCATGGCGTTCCTGTACCGCAGCTATGTGTGCGGTGAAGAGCAGCCCCAGCAGATCA * * * * * GGGTCGTGGCGCCCTGTGCCGTGCTGCTGTGATGAAGACCACCCGAGCAGCGGGC CGGTTGCCTCTGGCAC--GCCCGTGGAGCGAGCAACACCAGCAGCCCCGAAGA-GC * * * * * GCAT--CCTGTACCACAAGCCCGGAGCGCAAAGCAAACGCACGCGGCTCC-CGAGATGC AGCCGAGGGCTCCCTGGTGGGACCCCGTGTGGCGCGGAGCGCCGGGTGACCCTCAA * * * * * CATCGGGGGCCCCCTGGTGGGACCCCGTGTGGCGCGGAGCGCCGGGTGACCCTCAA</p> <p>Alineados 358 Coinciden 260 No coinciden 98 Homología 72%</p>

Figura 24. Secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento clonado del primer exon del gen *SOX9* de *Talpa occidentalis*, y alineaciones con los fragmentos correspondientes de otras especies.

AGGAGAAGGG	CCTGTCCGGC	GCCCCAGCC	CCACCATGTC	CGAGGACTCG	GCCGGCTCGC	60
CCTGCCCCTC	GGGCTCCGGC	TCCGACACCG	AGAACACGCG	GCCCCAGGAG	AACACCTTCC	120
CCAAGGGCGA	GCCGGACCTG	AAGAAGGAGA	GCGAGGAGGA	CAAGTTCCCC	GTGTGCATCC	180
GCGAGGCGGT	CAGCCAGGTG	CTCAAGGGCT	ACGACTGGAC	GCTGGTGCC	ATGCCGGTGC	240
GCGTC						245

<p><i>Homo sapiens</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCGC ***** AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCGC</p> <p>CCTGCCCCTCAGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACGCGGGCCCCAGGAGAACACGTTCC ***** CCTGCCCCTCAGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACGCGGGCCCCAGGAGAACACCTTCC</p> <p>CCAAGGGCGAGCCCGATCTGAAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCGTGTGCATCC ***** CCAAGGGCGAGCCCGACCTGAAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCGTGTGCATCC</p> <p>GCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGC ***** GCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGC</p> <p>GCGTC ***** GCGTC</p> <p>Alineados 245 Coinciden 238 No coinciden 7 Homología 97%</p>	<p><i>Sus scrofa</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCGC ***** AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCGC</p> <p>CCTGCCCCTCAGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACGCGGGCCCCAGGAGAACACGTTCC ***** CCTGCCCCTCAGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACGCGGGCCCCAGGAGAACACCTTCC</p> <p>CCAAGGGCGAGCCCGACCTGAAGAAGGAGAGCGAAGAGGACAAGTTCCCGTGTGCATCC ***** CCAAGGGCGAGCCCGACCTGAAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCGTGTGCATCC</p> <p>GCGAAGCGGTGAGCCAGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGC ***** GCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGC</p> <p>GCGTC ***** GCGTC</p> <p>Alineados 245 Coinciden 231 No coinciden 14 Homología 94%</p>
<p><i>Mus musculus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>AGGAGAAGGGCCTGTCTGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGTTCGC ***** AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCGC</p> <p>CCTGTCCCTCGGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACCGGGCCCCAGGAGAACACCTTCC ***** CCTGCCCCTCAGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACGCGGGCCCCAGGAGAACACCTTCC</p> <p>CCAAGGGCGAGCCCGATCTGAAGAAGGAGAGCGAGGAGGATAAGTTCCCGTGTGCATCC ***** CCAAGGGCGAGCCCGACCTGAAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCGTGTGCATCC</p> <p>GCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTGAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGC ***** GCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTGAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGC</p> <p>GCGTC ***** GCGTC</p> <p>Alineados 245 Coinciden 231 No coinciden 14 Homología 94%</p>	<p><i>Gallus gallus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>AGGATAAAGGCCTCTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGATGACTCCGCGGGTTCGC ***** AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACCATGTCCGAGGACTCCGCGGGCTCGC</p> <p>CCTGCCCCTCCGGATCCGGCTCCGACACCGAGAACACCGGTCTCTCTCAAGAGAACACCT ***** CCTGCCCCTCAGGCTCCGGCTCCGACACCGAGAACACGCG--GCCCCAGGAGAACACCT</p> <p>TCCCAAAGGGCAGCCCGACCTGAAGAAGGAAAGCGAGGAGGACAAGTTCCCGTGTGCA ***** TCCCAAGGGCGAGCCCGACCTGAAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCGTGTGCA</p> <p>TCCGCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACCTGGTGCCCATGCCGG ***** TCCGCGAGGCGGTGAGCCAGGTGCTCAAGGGCTACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGG</p> <p>TGCGGGTG ***** TGCGCGTC</p> <p>Alineados 248 Coinciden 216 No coinciden 32 Homología 87%</p>

Figura 25. Secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento clonado del segundo exón del gen *SOX-9* de *Talpa occidentalis* y alineación con las secuencias correspondientes de otras especies.

```

CAGCCGCGCC GGAGGAAGTC GGTCAAGAAC GGCCAGGCCG AGGCCGAGGA GGCCACCGAG      60
CAGACGCACA TCTCCCCGAA CGCCATCTTC AAGGCGCTGC AGGCCGACTC CCCGCACTCC      120
TCCTCGGGCT TGCAGGGG                                     138
    
```

<p><i>Homo sapiens</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <pre> CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCAGAGGAGGCCACCGAG ***** CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCGAGGCCAGGCCACCGAG CAGACGCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCGCCCACTCC ***** CAGACGCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCCCCGCACTCC TCCTCCGGCATGAGCGAG ***** TCCTCGGGCTTGCAGGGG </pre> <p>Alineados 138 Coinciden 123 No coinciden 16 Homología 89%</p>	<p><i>Talpa occidentalis</i> <i>Sus scrofa</i></p> <pre> CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCGAGGCCACCGAG ***** CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCGAGGCCAGGCCACCGAG CAGACGCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCCCCGCACTCC ***** CAGACGCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCGCCGCACTCC TCCTCGGGCTTGCAGGGG ***** TCCTCGGGCATGAGCGAG </pre> <p>Alineados 138 Coinciden 126 No coinciden 13 Homología 91%</p>
<p><i>Talpa occidentalis</i> <i>Mus musculus</i></p> <pre> CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCGAGGCCACCGAG ***** CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCGAGGCCAGGCCACCGAA CAGACGCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCCCCGCACTCC ***** CAGACTCACATCTCTTAATGCTATCTTCAAGGCGCTGCAAGCCGACTCCCCACATTC TCCTCGGGCTTGCAGGGG ***** TCCTCCGGCATGAGTGAG </pre> <p>Alineados 138 Coinciden 115 No coinciden 24 Homología 83%</p>	<p><i>Gallus gallus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <pre> CAACCACGCAGGAGGAAGACGGTGAAGAACGGCCAGTCCGAGCAGGAGGAGGGCTCCGAG ** CAGCCGCGCCGGAGGAAGTCGGTGAAGAACGGCCAGGCCGAGGCCGAGGCCAGGCCACCGAG CAGACCCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCCCCGCACTCA ***** CAGACGCACATCTCCCCAACGCCATCTTCAAGGCGCTGCAGGCCGACTCCCCGCACTCC TCCTCCAGCAT-CAGCGAG ***** TCCTCGGGCTTGCAGGGG </pre> <p>Alineados 138 Coinciden 114 No coinciden 25 Homología 83%</p>

Figura 26. Alineación de las secuencias de aminoácidos codificadas por los fragmentos clonados del gen *SOX9* de *T. occidentalis* con las correspondientes de otras especies. A) Fragmento del primer exón; B) Fragmento del segundo exón.

<p><i>Homo sapiens</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>EKGLSGAPSPMTSEDSAGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCIR EKGLSGAPSPMTSEDSAGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCIR</p> <p>EAVSQVLKGYDWTLPMPVVR EAVSQVLKGYDWTLPMPVVR</p> <p>Alineados 80 Coinciden 80 No coinciden 0 Homología 100%</p>	<p><i>Sus scrofa</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>EKGLSGAPSPMTSEGRGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCIR EKGLSGAPSPMTSEDSAGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCIR</p> <p>EAVSQVLKGYDWTLPMPVVR EAVSQVLKGYDWTLPMPVVR</p> <p>Alineados 80 Coinciden 78 No coinciden 2 Homología 97%</p>
<p><i>Mus musculus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>EKGLSGAPSPMTSEDSAGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCIR EKGLSGAPSPMTSEDSAGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCIR</p> <p>EAVSQVLKGYDWTLPMPVVR EAVSQVLKGYDWTLPMPVVR</p> <p>Alineados 80 Coinciden 80 No coinciden 0 Homología 100%</p>	<p><i>Gallus gallus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>DKGLSGAPSPMTSDDSDAGSPCPSPSGSGSDTENTRPQENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCI EKGLSGAPSPMTSEDSAGSPCPSPSGSGSDTENTRP-QENTFPKGEPLKKESEEDKFPVCI</p> <p>REAVSQVLKGYDWTLPMPVVR REAVSQVLKGYDWTLPMPVVR</p> <p>Alineados 81 Coinciden 76 No coinciden 5 Homología 93%</p>

A

<p><i>Homo sapiens</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGMS QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGLQ</p> <p>Alineados 45 Coinciden 43 No coinciden 9 Homología 96%</p>	<p><i>Sus scrofa</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGMS QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGLQ</p> <p>Alineados 45 Coinciden 43 No coinciden 9 Homología 96%</p>
<p><i>Mus musculus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGMS QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGLQ</p> <p>Alineados 45 Coinciden 43 No coinciden 9 Homología 96%</p>	<p><i>Gallus gallus</i> <i>Talpa occidentalis</i></p> <p>QPRRRKTVKNGQSEQEEGSEQTHISPNAI FKALQADSPQSSSSIS QPRRRKSVKNGQAEAEAEATEQTHISPNAI FKALQADSPHSSSGLQ</p> <p>Alineados 45 Coinciden 36 No coinciden 13 Homología 80%</p>

B

RESULTADOS

CLONACIÓN DE DOS FRAGMENTOS DEL GEN *SOX9* DE *T. occidentalis*

La amplificación mediante PCR con los oligonucleótidos SOX9S y SOX9AS utilizando como molde ADN genómico de *Talpa occidentalis* dio como resultado la obtención de una banda correspondiente a segmentos de ADN de la longitud esperada (287 pb). El ADN contenido en la banda fué aislado y clonado, y 5 clones fueron secuenciados, obteniéndose en todos ellos la misma secuencia, que se refleja en la figura 24.

Con los oligonucleótidos SOX9SP1 y SOX9SP5 se amplificó una banda de 182 pb, que también fué clonada, y cinco de los clones fueron secuenciados, obteniéndose la secuencia que se refleja en la figura 25.

Una búsqueda FASTA con ambas secuencias (Pearson y Lipman, 1998; Pearson, 1990) en bases de datos de secuencias de ADN reveló una alta homología con secuencias del gen *SOX9* humano, cerdo, ratón y gallo (Figs. 24 y 25) y, por lo tanto, una alta homología entre los fragmentos proteícos codificados por estas secuencias (Fig. 26).

la posición de los fragmentos clonados en el gen *SOX9* se indica en la figura 27.

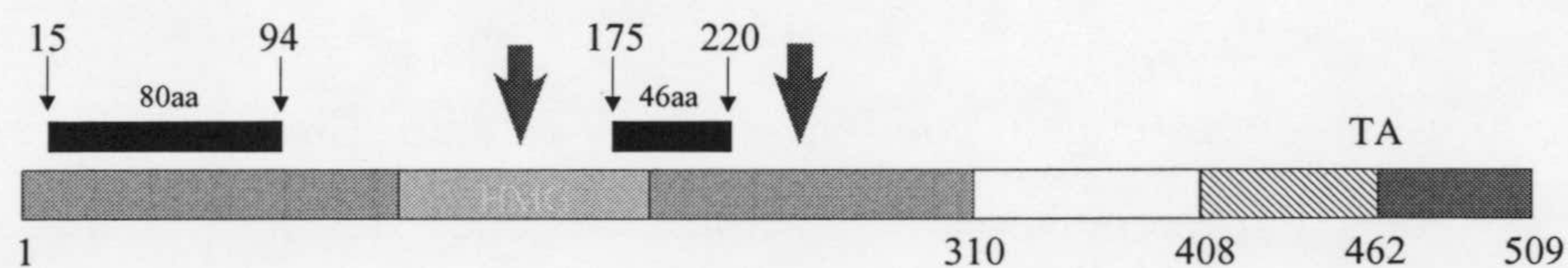


Figura 27. Esquema de la estructura de la proteína SOX9. Las bandas negras indican la posición de los aminoácidos codificados por los dos fragmentos clonados. HMG: caja Homeótica; TA: dominio de transactivación. Las flechas rojas señalan las posiciones que ocupaban los intrones.

PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS TESTÍCULOS EN MACHOS DE *T. occidentalis*

Los resultados del estudio de expresión, en machos, de los genes *SRY*, *DAX1* y *SOX9* en estadios desde E4 hasta E15, que cubren el desarrollo prenatal desde la formación del primordio gonadal, hasta el nacimiento, y el desarrollo postnatal, hasta la pubertad, se

RESULTADOS

muestran en la figura 28A. Los resultados obtenidos para cada uno de los genes son los siguientes:

SRY

El análisis de la expresión del gen *SRY* revela la presencia de transcritos en los primordios gonadales indiferenciados de los embriones XY durante el estadio E4, 3-4 días antes de que se produzca la diferenciación testicular de tales órganos. Tal expresión continúa desde entonces durante todo el periodo de desarrollo prenatal y postnatal de los machos y se alarga incluso a la vida juvenil de estos animales, hasta 4-6 meses tras el nacimiento. Teniendo en cuenta las diferencias de longevidad entre especies, se trata por tanto del periodo de expresión del gen *SRY* más prolongado que se ha descrito hasta el momento.

DAX1

La expresión de este gen comienza en el estadio E-4, cuando aparecen los primordios gonadales indiferenciados, y termina alrededor del nacimiento, cuando los testículos están completamente formados.

SOX9

En los machos de topo, el gen *SOX9* comienza a expresarse al inicio de la formación del primordio gonadal, en el estadio E4 del desarrollo, y continúa haciéndolo durante todo el desarrollo, acompañando a la formación de los testículos.

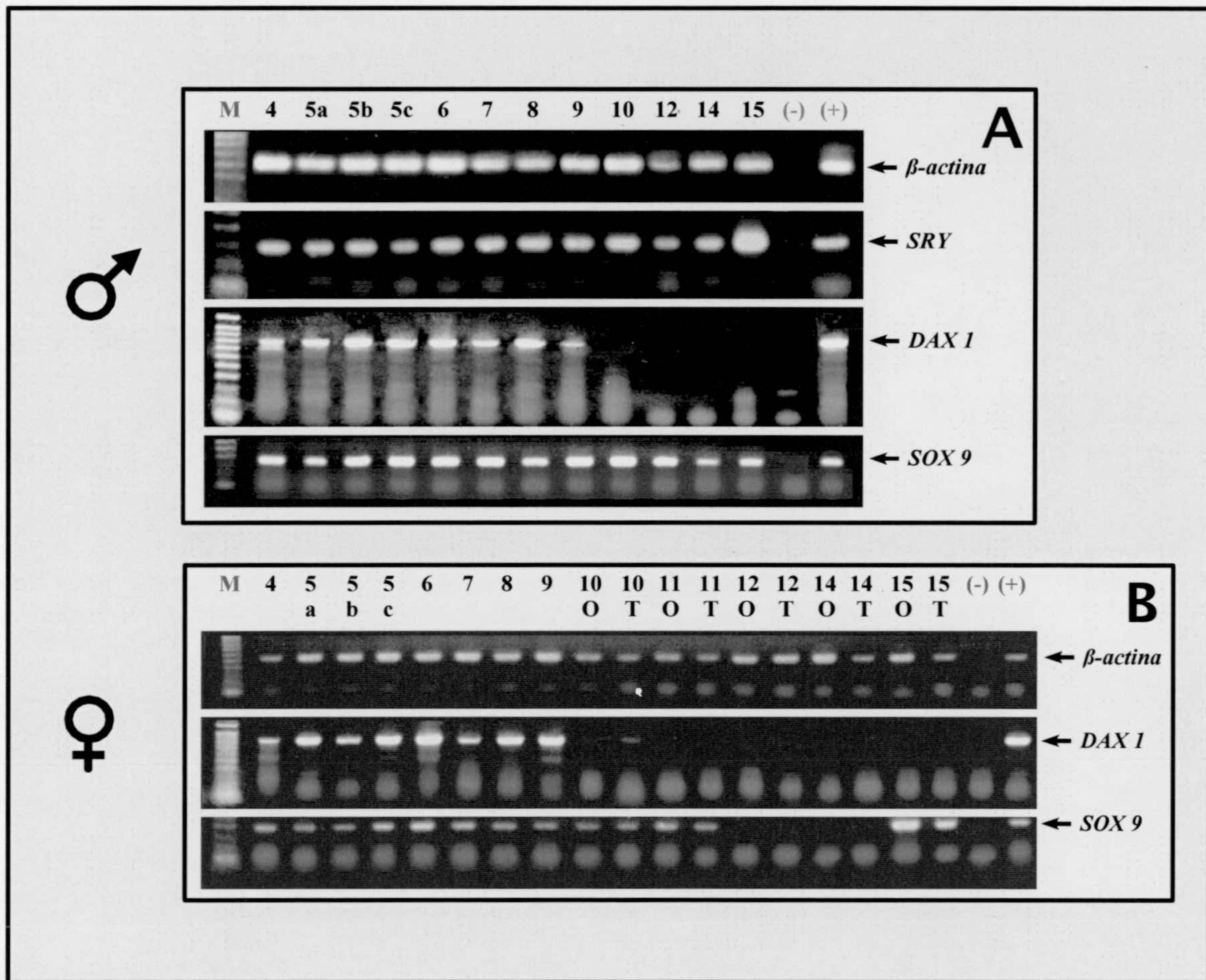


Figura 20. Patrón de expresión de los genes *SRY*, *DAX1* y *SOX9* a lo largo del desarrollo masculino (**A**), y *DAX1* y *SOX9* en el femenino (**B**) en *T. occidentalis*. En ambos casos, la expresión de la β -actina se usó como control de calidad del ARNm. En **B**) **O** indica la parte ovárica y **T** la testicular del ovoteste. (-): control negativo; (+): control positivo.

PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE EL DESARROLLO DE LOS OVOTESTES EN HEMBRAS DE *T. occidentalis*

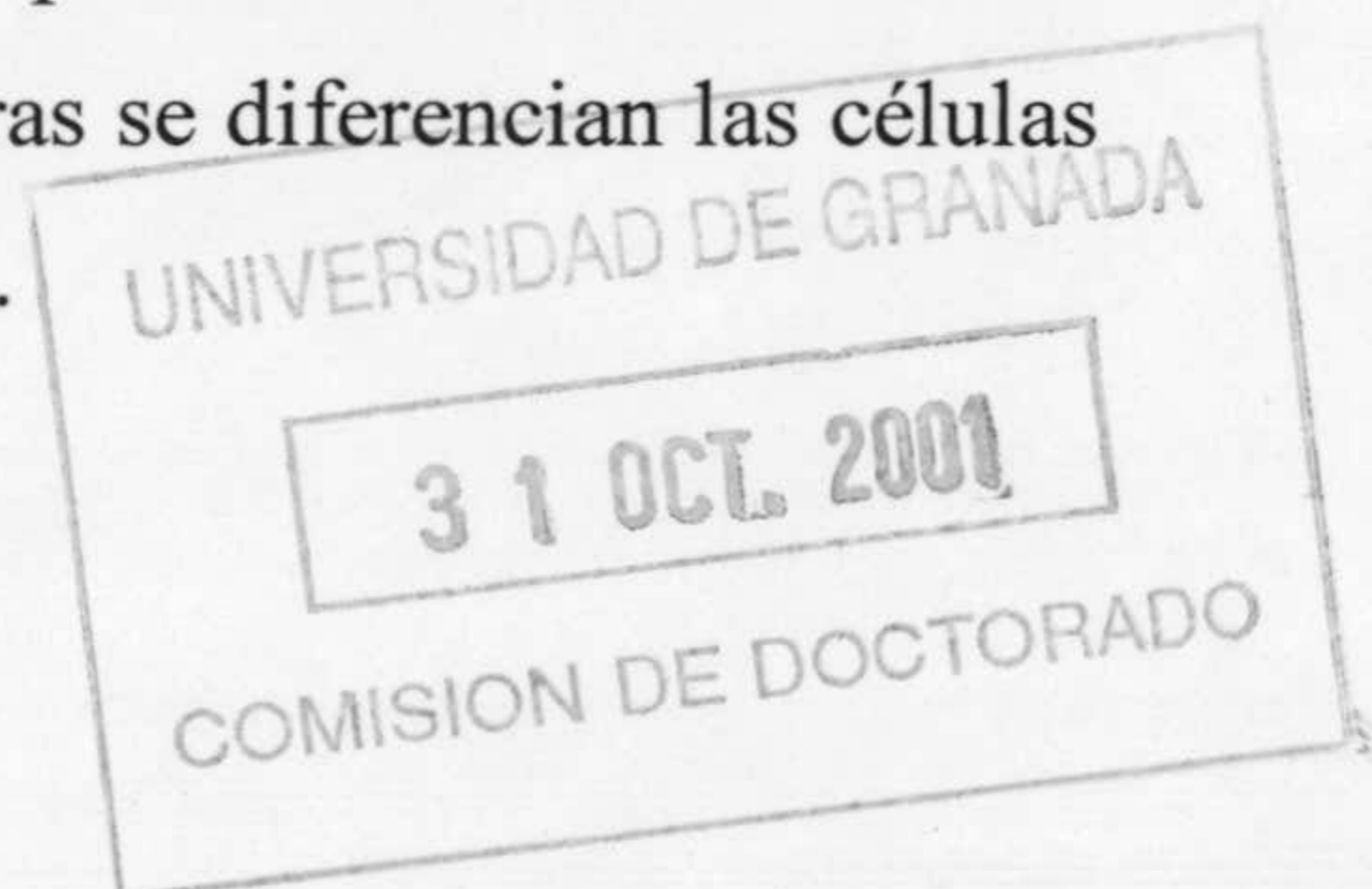
Los resultados del estudio de expresión, en hembras, de los genes *DAX1* y *SOX9* en estadios desde E4 hasta E15, que cubren el desarrollo prenatal desde la formación del primordio gonadal, hasta el nacimiento, y el desarrollo postnatal, hasta la pubertad, se muestran en la figura 28B. A partir del estadio E10 se analizó por separado la expresión en la parte testicular y en la parte ovárica del ovoteste. Los resultados obtenidos para cada uno de los genes son los siguientes:

DAX1

En las hembras, la expresión de *DAX1* comienza también en E4, y se prolonga también hasta el nacimiento. A partir de entonces, el gen *DAX1* permanece inactivo durante toda la vida infantil y juvenil y, por tanto, está inactivo mientras se diferencian las células de Leydig y la porción testicular adopta su estructura definitiva.

SOX9

Aunque *SOX9* es un gen claramente implicado en la diferenciación del testículo, también se expresa en un amplio periodo durante el desarrollo femenino de *T. occidentalis*. Su expresión comienza en E4 y se mantiene hasta el estadio E11, unos 10 días post-parto (dpp), y sufre una reactivación a partir de E15, después de, al menos, unos 20-25 días de inactividad.





DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

LAS GÓNADAS DE LAS HEMBRAS DE TOPO SON VERDADEROS OVOTESTES

El presente trabajo proporciona por primera vez una descripción detallada del proceso completo de desarrollo de los ovotestes presentes en las hembras de topo. Las particularidades de las gónadas de las hembras de esta especie han centrado la atención de varios investigadores ya desde finales del siglo XIX. MacLeod (1880), Adams (1909), Wood-Jones (1914), Harrison-Matthews (1935), Godet (1950) etc, investigaron las gónadas del topo europeo (*Talpa europaea*) aunque ninguno de ellos utilizó el término ovoteste para referirse a ellas. No obstante, Harrison-Matthews (1935) estableció una detallada comparación entre los "masculinizados ovarios" del topo y los ovotestes presentes en los intersexos descritos en especies como el cerdo, marcando claras similitudes entre ellos. Sin embargo, la interpretación de la naturaleza de los distintos componentes de estas gónadas estaba siempre limitada por el desconocimiento de su origen ontogenético, dada la inexistencia de un estudio de su desarrollo que abarque el proceso completo. Los estudios previos siempre dieron una visión parcial del desarrollo gonadal en *Talpa europaea* (Popov, 1911), pero nunca fueron abordados en *T. occidentalis*.

Antes incluso de conocer de la existencia de estos antiguos trabajos sobre el topo europeo, nuestro grupo de investigación redescubrió, aunque en otra especie (*Talpa occidentalis*), las peculiaridades exclusivas de las gónadas de los topos (Jiménez y col. 1988, 1993, 1996b), y demostró que este rasgo está probablemente generalizado a todas las demás especies del género *Talpa* en Europa (Sánchez y col., 1996). Interesados por la singularidad de este caso, otros autores han contribuido también posteriormente a la investigación sobre el mismo, aportando datos acerca de la función endocrina de los ovotestes de topo (Whitworth y col., 1999), o ideas sobre su posible origen y evolución (Whitworth, 1998; McVean y Hurst, 1996; Jiménez y col., 1997). En todos estos casos se afirmaba o se asumía que las gónadas de los topos son ovotestes en los que, tal como se sugirió inicialmente (Jiménez y col., 1988; 1993), el tejido testicular que contienen presenta características disgenésicas. Contrariamente,

DISCUSIÓN

en un estudio llevado a cabo por Beolchini y colaboradores (1999) en *T. europaea* y *T. romana*, estos autores concluyen que no hay razón alguna para hablar de hermafroditismo en *Talpa*, puesto que consideran que las gónadas de las hembras de estas especies no son ovotestes sino simplemente ovarios con cierto grado de masculinización. En consecuencia, este primer apartado de la discusión se dedicará a analizar la naturaleza las gónadas de topo a la luz de los nuevos datos aportados aquí, con el fin de aclarar esta controversia.

Puesto que los resultados obtenidos por Beolchini y col. (1999) en las dos especies analizadas (que ya habían sido estudiadas previamente por nuestro grupo; ver Sánchez y col., 1996), coinciden básicamente con los nuestros, no detectando diferencias significativas, es evidente que dicha controversia se centra en dilucidar qué entendemos por conceptos tales como ovoteste, hermafroditismo verdadero o reversión sexual, porque es aquí donde nuestra opinión difiere netamente de la de estos autores. Beolchini y col., argumentan que las gónadas de las hembras de topo no se ajustan a la definición de ovotestes porque no poseen las dos líneas germinales activas (la masculina y la femenina), tal como ocurre en muchos invertebrados y en algunos teleosteos, que pueden producir óvulos y espermatozoides en las mismas gónadas, algo que, efectivamente, es muy raro en tetrápodos, incluidos los mamíferos (Lau y col., 1992; Wilker y col., 1994). Es evidente que este concepto de ovoteste, definido exclusivamente en términos de funcionalidad gametogénica, no se corresponde con el habitualmente empleado por la gran mayoría de los investigadores especializados (si no todos ellos), según el cual un ovoteste es un órgano que contiene simultáneamente ambos tipos de tejido gonadal (ovárico y testicular), independientemente de su funcionalidad, que puede ser doble, simple o nula, y de su constitución genética, que puede ser XX, XY o ambos en el caso de los mosaicos o quimeras (ver Taketo y col., 1985; Hashimoto y col., 1990; Mechant-Larios y Taketo, 1991; Burgoyne y Palmer, 1993; Hunter 1996; Whitworth y col., 1996, y muchas de las referencias citadas en estos artículos, como ejemplos de uso de este concepto de ovoteste). Además, Beolchini y col., argumentan que el caso de las hembras de topo tampoco se ajusta al término "hermafroditismo verdadero", usado en mamíferos y entendido como la existencia de ambos tipos la tejido gonadal en un mismo individuo, ya que éste se trata de una anomalía que, consecuentemente, conduce siempre a la esterilidad. Con esta afirmación los autores niegan la posibilidad de que los tálpidos puedan representar una (quizás la única) excepción a esta regla, tal como nuestro grupo sostiene.

DISCUSIÓN

Si asumimos pues, que un ovoteste es un órgano con tejido testicular y ovárico, entonces la discusión se centraría ahora en considerar si las gónadas de las hembras de topo poseen tejido testicular o no, ya que es evidente que sí poseen tejido ovárico. Antes de la realización del presente estudio, sólo disponíamos de los datos observables en las gónadas de hembras adultas para deducir la presencia de tejido testicular. Muchos de estos datos eran de carácter morfológico, tales como la presencia de 1) estructuras similares a cordones testiculares, compuestas por células con características de Sertoli inmaduras, 2) células intersticiales idénticas a las células de Leydig de los testículos de los machos, 3) una profusa red vascular que permite exportar las hormonas gonadales, 4) una envuelta conectiva idéntica a la túnica albugínea de los testículos de los machos, 5) una rete-testis, y 6) un epidídimo rudimentario adherido a la túnica albugínea. Todos estos datos morfológicos definen un tejido testicular en mamíferos. También contábamos con datos endocrinológicos, realizados tanto en *T. occidentalis* (Jiménez y col., 1993), como en *T. europaea* (Whitworth y col., 1999), que demuestran que la porción no ovárica de las gónadas de las hembras de topo produce testosterona en cantidades muy superiores a las habituales en hembras de mamíferos y similares a las de los machos. A pesar del carácter disgenésico del tejido testicular presente en las gónadas de las hembras de topo, el conjunto de características que acabamos de describir fue suficiente para que fuese identificado como tal por numerosos autores (Jiménez y col. 1988, 1993, 1996b, 1997; Sánchez y col., 1996; McVean y Hurst, 1996; Whitworth, 1998; Whitworth y col., 1999).

No obstante, el presente estudio proporciona además varias pruebas irrefutables acerca de la naturaleza testicular de dicho tejido. Estas pruebas derivan tanto del análisis del desarrollo de las gónadas femeninas de topo, como del análisis de la expresión en estos animales de genes involucrados en la determinación genética del sexo de los mamíferos.

En relación con el desarrollo, Beolchini y col. (1999) se basan en el estudio morfológico de tres fetos de topo obtenidos de una única hembra preñada, solo uno de los cuales era hembra, para afirmar que "en ambos sexos el aparato reproductivo toma su configuración definitiva antes del nacimiento", y utilizan este dato como argumento de que las diferencias existentes entre las gónadas adultas y fetales en las hembras de topo aparecen tras el desarrollo de ovarios normales. Según estos autores el tejido medular de las gónadas adultas derivaría de las tecas internas de los folículos ováricos. Los resultados del presente estudio,

DISCUSIÓN

basados en el análisis de 188 gónadas de topo en desarrollo, demuestran que tales afirmaciones se basan en datos erróneos. Hemos demostrado aquí que el tejido testicular de los ovotestes de topo, no sólo no deriva secundariamente de un tejido ovárico preexistente (hipótesis de la transdiferenciación de células foliculares en células de Sertoli; ver más adelante), sino que comienza a formarse en E5b, al mismo tiempo que en los machos, y antes de que exista signo alguno de diferenciación ovárica. Téngase en cuenta que el inicio de la meiosis, primer evento de la organogénesis ovárica, no aparece en el topo hasta E10, unos 4-5 días tras el nacimiento, mientras que la foluculogénesis comienza en E13 (unos 20 dpp) y los folículos no empiezan a madurar hasta E15b, como mínimo un mes tras el nacimiento. Por tanto, en las gónadas femeninas de topo no existen células tecaes antes de 30 dpp, por lo que éstas no pueden ser el origen del tejido testicular.

Nuestros datos sobre el desarrollo de las gónadas femeninas de topo proporciona otras pruebas adicionales de la naturaleza testicular de su tejido medular. Diversos estudios sobre el desarrollo testicular en mamíferos, llevados a cabo en ratones y ratas, han demostrado que el primer cambio morfológico detectable durante la diferenciación gonadal, es la migración y proliferación de células mesenquimáticas procedentes del mesonefros, que invaden el primordio gonadal indiferenciado de los machos (XY), lo cual no ocurre en las hembras (XX) hasta mucho más tarde, cuando se inicia la foliculogénesis (Merchant-Larios y Taketo, 1991; Burgoyne y Palmer, 1993; Merchant-Larios y col., 1993; Capel y col., 1999; Tilmann y Capel, 1999; Colvin y col., 2001). En consecuencia, la existencia de un proceso de migración de células mesenquimáticas tanto en la gónada masculina como en la femenina en el momento de la diferenciación gonadal de los topos, permite afirmar que la región medular de la gónada femenina inicia su desarrollo según un patrón típicamente testicular. Dicho desarrollo también continúa con características testiculares puesto que el tejido intersticial que engloba a los cordones medulares de la gónada femenina (que se forman en el topo a la vez que los cordones testiculares de los machos), es invadido rápidamente por una densa red de vasos y capilares sanguíneos, una característica específica del desarrollo testicular (Burgoyne y Palmer 1993). De hecho, esta vascularización no ocurre en la región cortical de la gónada femenina de topo, que finalmente da lugar al tejido ovárico.

Uno de los datos embriológicos que más fuertemente apoyan la naturaleza testicular de la porción medular de las gónadas de las hembras de topo es el hecho de que la misma es

DISCUSIÓN

ontogenéticamente homóloga del tejido testicular de los machos. Efectivamente, es la porción medular del primordio gonadal masculino la que finalmente se desarrolla como tejido testicular, mientras que la región cortical involuciona y es rápidamente sustituida por una túnica albugínea de carácter conectivo. Paralelamente, la porción medular de la gónada femenina sufre un desarrollo que, como acabamos de analizar, sigue un patrón típicamente testicular (invasión mesenquimática, vascularización, diferenciación de las células de Leydig, etc...). En cambio, la región cortical de la gónada femenina prolifera y da lugar a un tejido ovárico funcional.

Ya hemos indicado en varias ocasiones previamente, que el proceso de organogénesis testicular probablemente pivota alrededor de la diferenciación funcional de las células de Sertoli, que se encargarían de dirigir la diferenciación de todo el resto de estructuras testiculares. Los ovotestes de las hembras de topo contienen estructuras y células típicamente testiculares (células mioides, células de Leydig, vascularización, túnica albugínea), cuya existencia podría interpretarse como una prueba indirecta de la presencia de células de Sertoli. De otra forma, tendríamos que admitir que estas estructuras testiculares pueden diferenciarse en ausencia de estas células. Los resultados del presente trabajo proporcionan pruebas adicionales que apoyan esta hipótesis. Como hemos visto, las células que componen las esférulas testiculares de los ovotestes adultos son prácticamente idénticas a las células de Sertoli embrionarias presentes en los testículos de los machos de topo. Este hecho apoya nuestra hipótesis (Jiménez y col., 1993) de que los ovotestes de hembras adultas de topo poseen un tejido testicular disgenésico en el que las células de Sertoli siguen conservando sus características embrionarias. Esto no ocurre con la células de Leydig de los ovotestes, que son idénticas a las de los machos adultos, tanto en aspecto como en capacidad funcional. Además, nuestro estudio también ha proporcionado una prueba molecular prácticamente definitiva. Se trata de la expresión del gen *SOX9* durante el desarrollo gonadal de las hembras de topo. Tal como revisamos en la introducción de esta memoria, la expresión del gen *SOX9* es exclusiva de las células de Sertoli, no solo de los mamíferos sino también de otros taxones de vertebrados tales como aves y reptiles (esta afirmación es cierta en relación con el desarrollo gonadal, dado que el gen *SOX9* también está involucrado en el desarrollo de otros órganos). Consecuentemente, la expresión mantenida del gen *SOX9* es considerada como un marcador molecular definitorio del fenotipo celular Sertoli (Kent y col., 1996; Morais da Silva y col., 1996; Swain y Lovell-Badge, 1999; Koopman, 1999; Hanley y col., 2000). Nuestros

DISCUSIÓN

estudios de RT-PCR han demostrado que las gónadas de las hembras de topo expresan este gen durante todo su desarrollo y, aunque no disponemos aún de los análisis de hibridación *in situ* que demuestren que son las células de los cordones medulares las que expresan el gen *SOX9*, es muy probable que sean ellas, dado que son éstas las únicas células XX ontogenéticamente homólogas de las células de Sertoli de los testículos XY de los machos.

A la vista de los argumentos que acabamos de exponer, en nuestra opinión quedan ya pocas dudas acerca de la naturaleza testicular de la porción medular de las gónadas XX de las hembras de topo y, por tanto, dichas gónadas son ovotestes dado que están compuestas por una porción de tejido ovárico y otra de tejido testicular. En consecuencia, los topos XX son hermafroditas verdaderos desde un punto de vista fenotípico, ya que poseen ambos tipos de tejido gonadal, a pesar de que, a diferencia del resto de casos estudiados, uno de ellos (el tejido ovárico) tenga actividad gametogénica. De hecho, el concepto de hermafroditismo verdadero en mamíferos no implica la esterilidad obligatoria de los individuos que lo padecen, si bien es cierto que, hasta ahora, ésta había sido la norma en todos los casos descritos. El de *Talpa* representa pues el único caso descrito de hermafroditismo verdadero que afecta a todas los individuos XX, no sólo de una sino de varias especies (si no todas) de un mismo género (*Talpa*). En estas circunstancias no es de extrañar que dichos individuos sean hembras funcionales con tejido ovárico activo dado que, de lo contrario, tal situación no se podría haber mantenido.

Finalmente, para terminar este apartado, debemos abordar la cuestión de si *Talpa* representa un caso de reversión sexual o, por el contrario, simplemente sufre masculinización fenotípica de origen endocrino (Beochini y col., 1999). Desde el descubrimiento a mediados del siglo XX de la existencia de cromosomas sexuales en los mamíferos, el término "reversión sexual" se ha empleado clásicamente para definir los casos de machos XX y hembras XY. Sin embargo, nuestro nivel actual de conocimientos sobre los procesos genéticos y embriológicos que conducen a la diferenciación sexual de los mamíferos, nos permite proponer una definición más precisa de este concepto. Así, la existencia de casos de intersexualidad en los que el fenotipo sexual no se corresponde con el sexo gonadal del individuo debido a errores de tipo endocrino, sugiere modificar el concepto en el sentido de considerar reversión sexual solamente aquellos casos en los que se altera la correspondencia normal entre el sexo genético y el sexo gonadal, es decir, cuando existe tejido testicular XX o tejido ovárico XY. Esta es la

acepción más comúnmente empleada actualmente para el concepto de reversión sexual. Sin embargo, puesto que hoy día sabemos que la diferenciación gonadal (sexual) depende básicamente de la diferenciación o no de células de Sertoli en el primordio gonadal, la definición de reversión sexual se puede refinar aún más considerando que ocurre cuando existen células de Sertoli XX o células foliculares XY (Burgoyne y Palmer, 1991). De acuerdo con estas consideraciones, el caso de los topos representa un claro ejemplo de reversión sexual por cuanto sus hembras (XX) poseen tejido testicular con células de Sertoli en sus gónadas.

PECULIARIDADES DEL DESARROLLO GONADAL EN TOPOS

Según las consideraciones anteriores, los topos son los únicos mamíferos que desarrollan de forma constitutiva dos tipos de tejido testicular, uno de los cuales (XY, normal y funcional) se encuentra en los testículos de los machos, mientras que el otro (XX, disgénésico y estéril) está en los ovotestes de las hembras. Además, el tejido ovárico de estos ovotestes también presenta ciertas características exclusivas en su patrón de desarrollo que lo diferencian claramente del de otras especies de mamíferos. Es evidente, por tanto, que las excepcionales características del desarrollo gonadal en machos y hembras de topo se ponen de manifiesto cuando se consideran en comparación con otros mamíferos. La tabla III recoge los datos cronológicos normalizados de los principales eventos del desarrollo gonadal de varias especies de mamíferos, incluido el topo, que son mostrados gráficamente en la figura 29.

Estos datos nos indican que la formación de la cresta genital y el proceso de diferenciación sexual (testicular) parecen estar relativamente sincronizados en las distintas especies, independientemente de su tamaño y velocidad de desarrollo (presentan similares porcentajes de progreso en el desarrollo).

En relación con el patrón de expresión de los genes *SRY*, *DAX1* y *SOX9* en embriones XY de topo, éste puede parecer sorprendente si lo comparamos con el que se produce en embriones XY de ratón. En esta especie, el gen *SRY* se expresa en células somáticas (pre-Sertoli) de la cresta genital, a los 10.5 días *post coito* (dpc), alcanza un pico de expresión alrededor de los 11.5 dpc. y se mantiene hasta que aparecen los primeros signos morfológicos

DISCUSIÓN

de diferenciación testicular, sobre los 12.5 dpc (Koopman *y col.*, 1990). Sin embargo, la expresión espacio-temporal de *SRY* en otras especies es muy diferente. Así, en humanos comienza a los 41 dpo, alcanza un pico a los 44 dpo, momento en el que se observan por primera vez los cordones testiculares, y se mantiene, aunque en niveles más bajos, a lo largo de todo el periodo fetal y en el neonato (Hanley *y col.*, 2000). En oveja y en ciertos marsupiales la expresión de *SRY* ocupa una amplia ventana que comienza varios días antes y termina varios días después de que se produzca la diferenciación testicular (Harry *y col.*, 1995., Payen *y col.*, 1996). En el topo la expresión de este gen comienza en el estadio E4, y se mantiene a lo largo de todo el desarrollo testicular, encontrándose expresión incluso en E15b.

La expresión de *DAX1* en gónadas de ratón comienza a los 10.5 dpc, en células de tipo somático, tanto en machos como en hembras. En machos esta expresión se mantiene hasta los 12.5 dpc, mientras en hembras continúa durante todo el desarrollo ovárico. Igual que ocurre con *SRY*, su patrón de expresión es diferente en otras especies (Ikeda *y col.*, 1996). En gónadas humanas y de cerdo la expresión comienza en células somáticas de la cresta genital cuando se forma ésta, y se prolonga durante todo el desarrollo sexual (Hanley *y col.*, 2000; Parma *y col.*, 1997). No obstante, tras el comienzo de la expresión de *SRY*, los niveles de expresión de *DAX1* en testículos de cerdo son tres veces menores que los encontrados en ovarios (Parma *y col.*, 1997). En el topo, la expresión de *DAX1* también comienza en el primordio gonadal indiferenciado, y se mantiene durante el desarrollo gonadal de ambos sexos hasta el estadio E9, alrededor del nacimiento.

Respecto a *SOX9*, su patrón de expresión en el desarrollo testicular de topo es igual que el de otras especies como ratón y humano, (Morais da Silva *y col.*, 1996; Kent *y col.*, 1996; Hanley *y col.*, 2000). Comienza en el primordio gonadal indiferenciado y se mantiene durante todo el desarrollo testicular, lo que sugiere que en topo también funciona como promotor del desarrollo testicular.

De todos estos datos podemos deducir que en los machos de topo (XY), el desarrollo testicular se produce de acuerdo con un patrón que no se aparta significativamente del normal en otras especies de mamíferos.

Desarrollo de la porción ovárica del ovoteste.

Tal como ocurre en especies de mayor tamaño (humanos y cerdo), y a diferencia de otras especies que, como el topo, son de pequeño tamaño (rata y ratón), en las hembras de topo el inicio del desarrollo ovárico aparece extraordinariamente retrasado en el tiempo. La diferencia entre el porcentaje de progreso de desarrollo correspondiente a la diferenciación testicular en los machos y el correspondiente a la diferenciación ovárica en las hembras es 9% en el ratón, 23% en la rata, 52% en el cerdo, 67% en el topo y 204% en humanos (calculado a partir de la Tabla III; ver barras rojas en Fig. 29). Desde un punto de vista morfológico, el desarrollo de la porción ovárica de los ovotestes de topo es muy similar al del ovario de otras especies, como la humana, que también retrasan considerablemente el inicio de la diferenciación ovárica (tabla III, Fig. 29). Antes del inicio de la meiosis, en el ovario humano también se produce un crecimiento significativo del cortex gonadal, principalmente debido a la intensa proliferación de las células germinales. Esta proliferación tiene lugar en dos fases, localizadas a las 10 y a las 15 semanas de desarrollo (Pinkerton y col., 1961). En la hembra de topo también existen dos fases de proliferación de las células germinales, que tienen lugar en E6 y en E9. Otra similitud destacable entre las dos especies es la existencia de un cortex externo primitivo y un segundo cortex interno de formación más tardía, compuesto por grandes cordones cargados de células germinales primordiales. A este cortex interno Pinkerton y col. (1961) lo denominaron "médula", dada su localización entre el hilus ovárico y el cortex externo. Sin embargo, en el ovario humano no se forma ninguna región medular homóloga de la que hemos descrito aquí en la gónada de las hembras de topo. Como en esta especie, el cortex interno del ovario humano aumenta su contenido en tejido mesenquimático y vasos sanguíneos procedentes del hilus ovárico, algunos de los cuales pasan hasta el cortex, separando así los cordones antes mencionados. Una vez iniciada la meiosis en el ovario humano, el proceso de foliculogénesis comienza también enseguida. En estadios posteriores se acentúa el proceso de degeneración de un número importante de oocitos, principalmente por encontrarse en folículos atrésicos que inician la maduración prematuramente (Pinkerton y col., 1961). Excepto por el mayor retraso en el inicio de la foliculogénesis una vez establecida la meiosis, el patrón de desarrollo ovárico humano, y el descrito por nosotros para la región

DISCUSIÓN

cortical de las gónadas femeninas de topo es, como vemos, muy similar. Contrariamente, como analizaremos más adelante, el desarrollo de la región medular presenta características exclusivas, que se pueden calificar de extraordinarias en el contexto de los mamíferos.

Existe, no obstante, una peculiaridad en el desarrollo del tejido ovárico del topo. Se trata del número relativamente elevado de células polinucleadas que se observan entre la población de células germinales. Aunque pueden llegar a formar folículos primordiales, éstas indefectiblemente conducen a la atresia folicular. En otras muchas ocasiones los oocitos polinucleados degeneran poco antes de la foliculogénesis. Es interesante destacar el hecho de que no hemos observado células polinucleadas no meióticas, lo que nos permite especular que es el carácter meiótico (o quizás premeiótico; ver más adelante) y no su condición de células germinales lo que les confiere a estas células la capacidad o la predisposición para convertirse en células polinucleadas.

Este fenómeno no es exclusivo de las hembras de topo, puesto que también se ha descrito en machos de la misma especie (Jiménez y col., 1984). Tampoco es exclusivo de los topos, puesto que también ocurre en machos de *Crocidura russula* y *Neomys anomalus*, otras dos especies de insectívoros pertenecientes a la familia Soricidae (Jiménez y col., 1984). En estos casos el proceso también afectaba exclusivamente a la línea germinal de los testículos y, como en los ovotestes de topo, las células polinucleadas tenían entre dos y cuatro núcleos en su interior. En aquella ocasión, los autores propusieron que estas células polinucleadas probablemente eran el resultado de errores en la citocinesis durante las últimas mitosis premeióticas. Esta hipótesis se basaba en dos hechos: 1) se observaron células polinucleadas en división mitótica, y 2) los núcleos del interior de estas células seguían la meiosis sincrónicamente, lo que parecía descartar un origen basado en la fusión celular. Tratándose por tanto de un fenómeno muy similar, que afecta al mismo tipo de células en machos y hembras de la misma especie, estos datos nos inducen a pensar que su origen probablemente sea el mismo en ambos casos. Si esto es así, las células polinucleadas de los ovotestes de las hembras se formarían durante las últimas rondas de división mitótica previas al inicio de la meiosis, aunque esto no se ve corroborado por la observación de células polinucleadas no meióticas. La fugacidad de las mitosis premeióticas frente al carácter definitivo del estado meiótico en el que permanecen indefinidamente estas células, minimiza la probabilidad de observar células mitóticas polinucleadas en preparaciones de cortes histológicos y maximiza

Tabla III. Progreso del desarrollo gonadal en varias especies de mamíferos

	Eventos del desarrollo							
	<i>Primordio gonadal</i>		<i>Primeros signos del desarrollo testicular</i>		<i>Comienzo de la meiosis</i>		<i>Foliculogénesis</i>	
Especie	días ¹	% ²	días ¹	% ²	días ¹	% ²	días ¹	% ²
Humano	32	55	44	75	133	229	140	241
Cerdo	21	64	25	77	42	129	44	135
Rata	12	68	15	85	19	108	23	131
Topo	14	66	18	85	32	152	42	200
Ratón	9,5	59	12	75	13,5	84	21	131

1: En humano días post ovulación. En el resto días post coito.

2: Porcentaje de progreso en el desarrollo. Puesto que el ritmo de desarrollo varía de unas especies a otras, en función ,principalmente, de su tamaño, siendo más rápido en especies más pequeñas, y más lento en las de mayor porte, es necesario representar el progreso del desarrollo de distintas especies usando un parámetro normalizado (homogéneo entre ellas), con el fin de poder establecer comparaciones. Con este motivo, hemos calculado estos porcentajes, que representan, en términos relativos, la proporción de un periodo concreto de desarrollo que se ha alcanzado en cada momento. Estos valores normalizados, que hemos denominado "porcentajes de progreso en el desarrollo" se han calculado dividiendo el número real de días de gestación en cada caso por el número de días que tarda un embrión o feto de la especie en cuestión en alcanzar el estadio de desarrollo "Carnegie nº 23 (datos tomados de: O'Rahilly, 1979; Theiler, 1972; Witschi, 1962; Marrable, 1971; y presente trabajo). Se ha escogido el estadio Carnegie nº 23 porque éste era el más avanzado de la serie del que se conocían todos los datos en estas cinco especies. Muchos de estos porcentajes alcanzan valores superiores al 100% porque corresponden a eventos que tienen lugar con posterioridad al citado estadio 23.

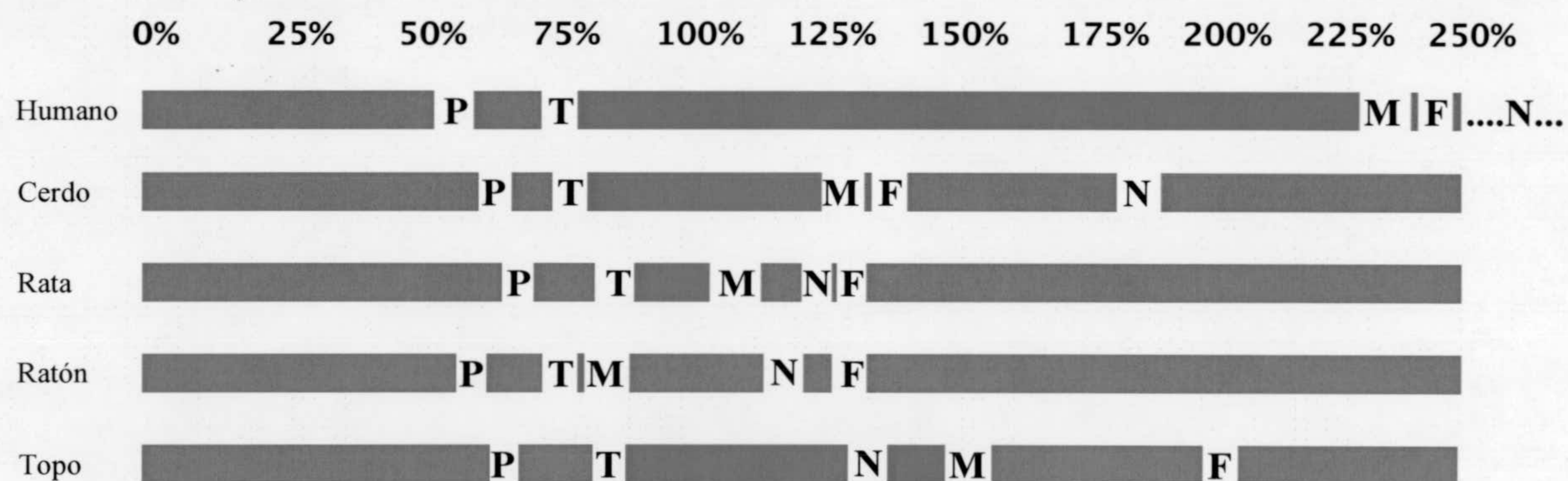


Figura 29. cronología de los principales eventos en el desarrollo de la gónada, tanto masculina como femenina, en distintas especies de mamíferos.

P: Formación del primordio gonadal. T: Formación de cordones testiculares.

M: inicio de la meiosis. F: foliculogénesis. N: nacimiento. Las barras rojas señalan el intervalo entre la formación de cordones testiculares, en machos, y en ovotestes de topo, y el inicio de la meiosis en hembras.

Los porcentajes indican el progreso de desarrollo calculado como se explica en la Tabla III.

la de observarlas una vez iniciada la meiosis. En su artículo de 1984 Jiménez y col. pudieron observar algunas células polinucleadas en mitosis, probablemente debido a que estudiaron preparaciones meióticas realizadas por extensión celular. En cualquier caso, nuestros datos actuales no son concluyentes respecto al origen de los oocitos polinucleados de las hembras de topo.

Desarrollo del tejido testicular del ovoteste

Tal como hemos tratado extensamente en un apartado anterior de este capítulo, existe un buen número de argumentos para poder afirmar que la región medular de las gónadas XX de topo se desarrolla como un tejido testicular disgenésico y estéril. Las peculiaridades de este desarrollo se ponen claramente de manifiesto si lo comparamos con el desarrollo normal que siguen los testículos en los machos XY. La figura 30 representa el cronograma de todos los eventos que son clave en el desarrollo testicular de machos y hembras de topo. Se observa claramente que existen varios acontecimientos que ocurren al mismo tiempo en los dos tipos de tejido testicular (XY y XX). Estos son el establecimiento del primordio gonadal indiferenciado, la migración mesenquimática, la formación de cordones, la vascularización y la formación de la túnica albugínea. Excepto esta última, todos los demás eventos son propios de los primeros estadios del proceso de organogénesis testicular (E4-E5c). No obstante, aunque la túnica albugínea se puede identificar como tal a partir de E8, tanto en machos como en hembras, su formación se inicia mucho antes en ambos casos (E5b en los machos y E5c en las hembras). Por otra parte, en el desarrollo testicular de las gónadas XX podemos contemplar otro grupo de acontecimientos que aparecen claramente retrasados. Estos son la diferenciación de los tipos celulares de Sertoli, de Leydig y mioides, y la formación del epidídimo y la *rete testis*. En relación con las células de Sertoli, aquí nos referimos exclusivamente a su diferenciación morfológica, puesto que desde un punto de vista funcional probablemente se diferencian mucho antes (ver más adelante).

A la vista de estos datos, podemos considerar que en la región medular de las gónadas XX de topo se inicia un proceso de desarrollo testicular que se ve abortado transitoriamente en E5c y que se reanuda alrededor del nacimiento (E8-E9), cuando las células

DISCUSIÓN

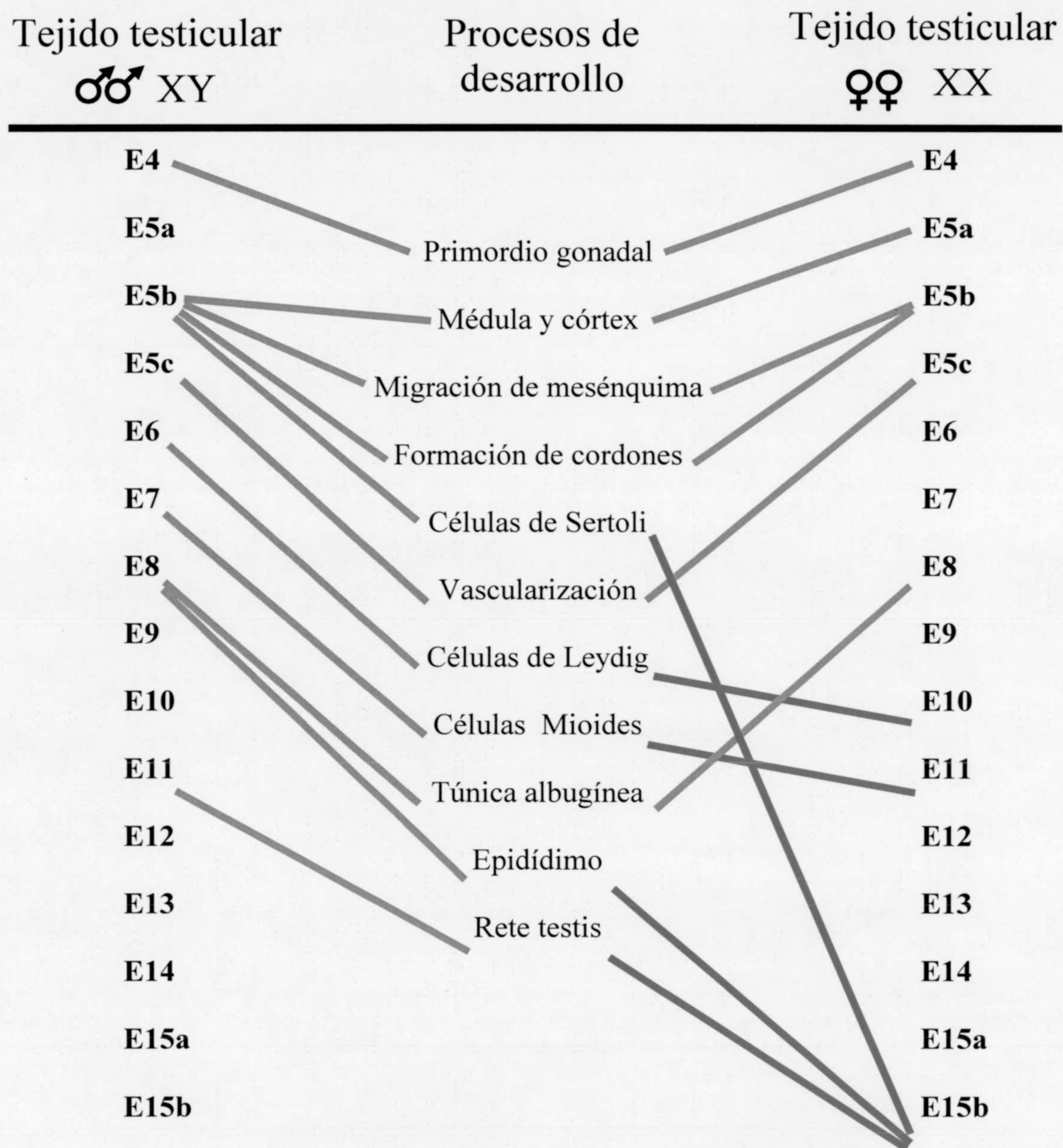
de las esférulas testiculares recién formadas (¿pre-Sertoli?, ver más adelante) probablemente inducen la diferenciación de las células de Leydig, que aparecen en E10.

Una primera diferencia entre el desarrollo gonadal de los individuos XY y los XX se observa ya en el estadio E5a, con la aparición en estos últimos de un septo de tejido mesenquimático que define precozmente las dos regiones gonadales (cortical y medular). En principio, este fenómeno es extraordinariamente singular dado que en otras especies estudiadas como la rata o el ratón, el primer signo de diferenciación sexual es el inicio del desarrollo testicular en las gónadas de los machos, iniciándose más tarde el desarrollo ovárico en las hembras. En el topo, por el contrario, el primer signo de diferenciación gonadal es la formación del citado septo mesenquimático, que sólo hemos observado en hembras. Estas características hacen difícil sugerir una explicación razonable sobre su significado y origen, que se tratarán más adelante en términos genéticos.

Durante E5b se produce la invasión mesenquimática y la formación de los cordones medulares tanto en las gónadas XX como en las XY. Sin embargo, el resultado no es idéntico en ambos casos. Aparte de las dos diferencias evidentes entre ellos, su dotación cromosómica (XY o XX, lo que significa con o sin *SRY*, respectivamente) y su contenido en células germinales (casi completamente ausentes en la región medular de las gónadas XX), existen también otras diferencias. Así, las células que componen los cordones testiculares XY son células de Sertoli inmaduras de tipo embrionario, mientras que sus homólogos de la gónada XX no adquieren el mismo fenotipo morfológico. Quizás como consecuencia de ello, los cordones medulares XX aparecen peor organizados que los cordones testiculares XY. Su trayectoria suele ser zigzagueante y su diámetro no es constante. En contraste, el proceso de vascularización y la formación de la túnica albugínea parecen seguir patrones muy similares en ambos sexos, dado que no hemos encontrado diferencias dignas de mención entre ellos.

Otro aspecto interesante es el origen de los cordones testiculares en las gónadas XX. Existe un grupo de cordones que se provienen del blastema gonadal originado por la primera proliferación del epitelio celómico. Estos cordones se forman al iniciarse el proceso de migración mesenquimática desde el mesonefros y son en todo homólogos a los cordones testiculares de los machos XY. El resto de los cordones medulares provienen de la segunda gran proliferación de células corticales, que provoca proyecciones de células somáticas desde los cordones corticales.

Figura 30. Esquema que representa los estadios en los que ocurren los diferentes procesos implicados en el desarrollo del tejido testicular, tanto en machos como en hembras. Las líneas rojas señalan aquellos procesos que ocurren con retraso en el tejido testicular del ovoteste, respecto al momento en que ocurren en el testículo de macho.



DISCUSIÓN

Como vemos, el desarrollo testicular parece permanecer temporalmente detenido en las hembras durante unos 8 días, en el periodo comprendido entre E5c y E8-E9. Sin embargo, la región medular de la gónada no permanece invariable en este tiempo puesto que experimenta un crecimiento considerable durante el mismo. Este crecimiento parece sustentarse en una acentuación de los procesos ocurridos durante E5b y E5c. Así, continúa la formación de nuevos cordones medulares estériles, a partir de células somáticas procedentes de los cordones corticales más profundos, y la invasión de tejido mesenquimático procedente del mesonefros, que penetra en la gónada principalmente a través de la cápsula conectiva que se forma entre ambas regiones gonadales. Esto va acompañado a su vez de la proliferación de vasos sanguíneos que vascularizan toda la región medular y también, aunque en mucha menor medida, la región cortical. Vemos, por tanto, que durante este prolongado periodo entre E5c y E8-E9, parecen prorrogarse los procesos propios del inicio del desarrollo testicular, que tienen lugar principalmente en E5b. Esto es, la invasión de estroma mesenquimático y la formación de cordones medulares.

A partir del nacimiento se reanuda el proceso de diferenciación testicular, que comienza a hacerse patente en E10 con la aparición de las primeras células de Leydig, uno de los tipos celulares más característicos del tejido testicular. No obstante, desde poco antes del nacimiento (E8-E9) comienzan a producirse cambios morfológicos claros que afectan a las células epiteliales que constituyen los cordones testiculares. Estos cordones se fragmentan y transforman en esférulas, que más adelante (en E11) comenzarán a rodearse de células mioides. Excepto por la forma esférica y no cordonal de estas estructuras, el resto de la descripción que acabamos de hacer podría ajustarse perfectamente a la del tejido testicular en desarrollo entre los estadios E5b y E7.

Existen varias razones para pensar que los eventos que acontecen en los últimos estadios del desarrollo gonadal (E12-E15b) están estrechamente relacionados con la producción hormonal de las células de Leydig formadas. De hecho, aunque comienzan a aparecer en E10, el número de células de Leydig experimenta un aumento extraordinario durante el periodo E12-E14. No sólo aumenta el número de células de Leydig, sino que también se acentúan sus características de células esteroideogénicas funcionalmente activas. En E12 su citoplasma es ya muy grande e idéntico al de las células de Leydig de los machos adultos. Además, existen indicios indirectos de que estas células de Leydig producen

DISCUSIÓN

testosterona. El más claro de ellos es el proceso de regeneración de los conductos de Wolf, que comienza a apreciarse a partir de E12, coincidiendo precisamente con el aumento del número y volumen de las células de Leydig. Es sobradamente conocido que el desarrollo de los órganos sexuales secundarios masculinos, derivados de los conductos de Wolf, depende de la testosterona producida por las células de Leydig de los testículos (Jost, 1947). Por tanto, en el desarrollo sexual de las hembras de topo, la aparición tardía de estructuras tales como los epidídimos o la *rete testis*, que en los testículos normales XY aparecen siempre tras el inicio de la producción de testosterona, es coherente con la diferenciación tardía de las células de Leydig que producen dicha hormona.

De acuerdo con las consideraciones anteriores, en las gónadas XX de topo, probablemente comience a producirse testosterona a partir de E10 y dicha producción sea muy intensa a partir de E12. Esto resulta curioso si tenemos en cuenta que es precisamente en E10 cuando se inicia la meiosis femenina, y en E12 cuando comienza la foliculogénesis. Aunque la existencia real de testosterona en estas gónadas deberán ser constatada experimentalmente en el futuro, de ser cierta supondría que los eventos clave del desarrollo ovárico de las hembras de topo tienen lugar en un ambiente hormonal masculino, que sin embargo no afecta negativamente dicho desarrollo (ver Glickman y col., 1993). Esto no sería consecuencia de una falta de acceso de la testosterona al tejido ovárico, puesto que la cápsula conectiva que rodea la porción testicular del ovoteste se interrumpe precisamente por el centro de la zona de contacto entre ambos tejidos. De hecho, en los ovotestes adultos tampoco existe estructura de separación alguna entre la porción ovárica y la testicular, y en estas gónadas sí se ha demostrado experimentalmente la producción de testosterona (Jiménez y col., 1993; Whitworth y col., 1999). Es evidente que los aspectos hormonales del desarrollo y funcionamiento de las gónadas de las hembras de topo son de gran interés científico y merecen investigaciones futuras, pero escapan claramente del propósito del presente trabajo, por lo que no serán abordadas en mayor profundidad.

IMPLICACIONES GENÉTICAS Y MORFOGENÉTICAS EN RELACIÓN CON EL DESARROLLO GONADAL EN MAMÍFEROS

El proceso de diferenciación sexual de la hembra de topo que describimos aquí, resulta interesante no solo por su singularidad sino también porque permite replantear algunos de los conceptos vigentes sobre los procesos de determinación y diferenciación sexual en mamíferos, y proporciona datos que permiten plantear otros nuevos.

Establecimiento de dos regiones en la gónada XX de topo

Si seguimos un orden cronológico, el primer fenómeno digno de ser tratado es la formación en E5a de un septo mesenquimático que separa el cortex de la médula, sólo en el primordio gonadal XX. Este hecho denota que el carácter bipartito de la gónada femenina se pone de manifiesto antes incluso de que se produzca la diferenciación testicular en la gónada masculina. Por tanto, los topos son los únicos mamíferos conocidos en los que el primer signo de diferenciación sexual no aparece en los machos sino en las hembras. Como en el resto de los mamíferos, el gen *SRY* de los topos está ligado al cromosoma Y, por lo que las hembras carecen de él. Puesto que se expresa en los machos y éstos desarrollan testículos normales, no hay razones para pensar que este gen no sea el responsable de la determinación genética del sexo, también en el topo. En consecuencia, como en las demás especies, la única diferencia que existe entre los embriones XX y XY de topo antes de la diferenciación sexual deriva de esta hemicigosis para el gen *SRY*. Este hecho implica que la primera consecuencia morfológica de la expresión de *SRY* de los topos sería evitar la formación de ese septo mesenquimático. Esta hipótesis es coherente con el patrón de expresión del gen *SRY* en los embriones XY de topo, dado que se encuentra activo ya en E4, al menos un día antes de que se forme el septo en E5a y dos días antes de que se inicie el desarrollo testicular en E5b.

Esta situación sugiere que la expresión del gen *SRY* podría tener otras consecuencias adicionales, distintas a las actualmente reconocidas (inducción de la migración y formación de los cordones testiculares; ver Capel y col., 1999; Tilmann y Capel, 1999; Colvin y col., 2001) que, por el momento, habrían pasado desapercibidas en las demás especies analizadas. Alternativamente, la genética particular del topo podría ser la causa de la aparición de esta nueva consecuencia morfogenética de la expresión de *SRY*.

Migración mesenquimática y desarrollo testicular

Es bien conocido desde hace bastante tiempo, que células de origen mesonéfrico contribuyen muy significativamente a la organogénesis testicular (Wartenberg, 1978, 1982; Upadhyay y col., 1979; Zamboni y Upadhyay, 1982; Satoh, 1985; Biskov, 1986; Merchant-Larios y col., 1993; Moreno-Mendoza y col., 1995; Merchant-Larios y Moreno-Mendoza, 1998), y que el contacto directo entre gónada y mesonefros es necesario para que se produzca la diferenciación testicular (Buehr y col., 1993). El primer signo morfológico de la diferenciación testicular es la invasión del blastema gonadal indiferenciado por células mesenquimáticas procedentes del mesonefros (Merchant-Larios y Taketo, 1991), lo que rápidamente se acompaña del desarrollo de un completo sistema vascular, necesario para exportar la testosterona (Burgoyne y Palmer, 1993). Recientemente se ha demostrado en ratón que la migración de células mesonéfricas induce la formación de cordones testiculares y la diferenciación de las células de Sertoli, que empiezan entonces a expresar *Sox9* (Tilman y Capel, 1999), y que dicha migración depende de la expresión del gen *Sry*. Puesto que la migración depende directamente de la expresión de gen *Fgf9* (fibroblast growth factor 9), éste podría ser uno de los primeros genes de la cascada de activación génica que pone en marcha a *SRY* (Colvin y col., 2001).

Ya hemos argumentado antes que la invasión del primordio gonadal del topo XX por células mesenquimáticas es un rasgo de claro carácter testicular en el desarrollo de estas gónadas. La cuestión ahora es: ¿qué induce dicha migración en una gónada XX, carente de *SRY*? Nuestros resultados nos proporcionan un candidato evidente: la activación del gen *SOX9*, cuyo patrón de expresión en el topo no presenta dimorfismo sexual durante todo el desarrollo prenatal. En este sentido, la situación de las hembras de topo es excepcional por cuanto la expresión del gen *SOX9* es el marcador molecular que más claramente define a las células de Sertoli, alrededor de cuya diferenciación pivota el desarrollo testicular (ver revisiones de: Swain y Lovell-Badge, 1999; Veitia y col., 2001). Muy recientemente se ha demostrado que la expresión del gen *Sox9*, por si sola, es suficiente para inducir la reversión sexual XX en ratones transgénicos para este gen (Vidal y col., 2001). Por tanto, la expresión de *SOX9* en la gónada femenina de topo es coherente con el desarrollo testicular que se produce en una parte de la misma. Sin embargo, a la vista de los datos que acabamos de

DISCUSIÓN

exponer, no es posible establecer una relación simple de causa-efecto entre la expresión de *SOX9* y el desarrollo testicular en los ovotestes de topo. De hecho, los datos disponibles parecen contradictorios en determinados aspectos. Por un lado, la migración desde el mesonefros puede inducir el desarrollo testicular, incluida la diferenciación de las células de Sertoli y la consiguiente expresión del gen *SOX9* (Tilmann y Capel, 1999), y por otro lado la expresión de *Sox9* en ratones XX transgénicos para este gen, induce el desarrollo testicular, incluida la migración mesenquimática desde el mesonefros necesaria al principio (Vidal y col., 2001). Puesto que se trata de dos hechos constatados, la aparente contradicción se solventa si en las células precursoras de las células de Sertoli (pre-Sertoli), se establece un bucle de retroalimentación positiva según el cual, la expresión de *SOX9* induciría la migración y, viceversa, esta podría a su vez poner en marcha la expresión de *SOX9*. Puesto que la migración es inducida por *FGF9*, dicho bucle se traduciría en una relación molecular entre *FGF9* y *SOX9*. Aunque no existen datos concluyentes al respecto, se ha sugerido que *FGF9* podría ser un regulador indirecto de *SOX9*, aunque no es imprescindible para que se produzca su expresión (Colvin y col., 2001). Además, se ha sugerido que la expresión de *SOX9* podría inducirse también por su propio producto génico (ver Veitia y col., 2001), y que *SOX9* y *SF1* podrían ser mutuamente dependientes el uno del otro para mantenerse en niveles de expresión suficientemente altos (ver Swain y Lovel-Badge, 1999). Dado que *SRY*, *SF1*, *FGF9* y *SOX9* forman parte del grupo de genes implicados en la determinación sexual, el bucle de retroalimentación que proponemos entre *SOX9* y *FGF9* podría establecerse con *SF1* actuando como intermediario.

Según las consideraciones anteriores, y volviendo al caso del topo, además del gen *SOX9*, el inicio del proceso de diferenciación testicular en la gónada XX podría ser consecuencia de la expresión de cualquiera de los genes de la ruta de determinación sexual situados después de *SRY* y antes de *SOX9*. Por tanto, también podrían incluirse *WNT4* y *WT1* entre los genes responsables de la reversión sexual, pero probablemente no *DAX1*, ya que su patrón de expresión en la gónada femenina de topo no parece ser contradictorio con el observado en otras especies de mamíferos. Como veremos más adelante, el gen *DAX1* sí podría estar implicado en acontecimientos posteriores del desarrollo de los ovotestes de topo, pero no en el inicio del proceso. Evidentemente, son necesarios futuros estudios de expresión de todos estos genes para dilucidar esta cuestión.

DISCUSIÓN

Otro aspecto interesante en relación con el papel de la migración de células mesenquimáticas en el desarrollo testicular, es el momento oportuno en que debe tener lugar dicha migración para que produzca una inducción efectiva de la formación de cordones testiculares. Esta cuestión se ha investigado cultivando conjuntamente gónadas XY, gónadas XX y mesonefros de embriones de ratón justo antes de la diferenciación testicular, de tal manera que la gónada XX queda emparedada entre la gónada XY y el mesonefros (XX o XY). Es la técnica de cultivo en "sandwich" desarrollada por Martineau, y col. (1997). Con esta técnica, estos autores demostraron que la gónada XY emite una señal quimiotáctica capaz de atravesar la gónada XX y llegar hasta el mesonefros, desde donde induce la migración de células mesenquimáticas, que penetran en la gónada XX promoviendo a su vez en ella la formación de cordones testiculares. Aplicando esta misma técnica con gónadas y mesonefros heterocrónicos (extraídos de embriones en distintos estadios de desarrollo), Tilmann y Capel (1999) han comprobado que la capacidad para inducir la formación de cordones testiculares debe efectuarse en un momento concreto del desarrollo del embrión, que en el ratón está en los 11,5-12,5 dpc. Después de este periodo, las gónadas XY fueron incapaces de inducir la migración. Además, la inducción de la formación de cordones testiculares como consecuencia de la migración mesenquimática también debe producirse en este periodo para ser efectiva. Finalmente, estos experimentos demostraron que es necesario el contacto físico entre las células migradas desde el mesonefros y las células epiteliales del primordio gonadal. Si se coloca un filtro entre la gónada XX y el mesonefros (que no impide el paso de la señal quimiotáctica, pero sí el de las células mesenquimáticas), los cordones no se forman.

La invasión mesenquimática que se produce en la región medular de las gónadas XX de topo en E5b, se produce en el momento correcto para inducir la formación de cordones. De hecho, efectivamente se forman los cordones y lo hacen al mismo tiempo que los legítimos cordones testiculares de la gónada XY de los machos. Sin embargo, tal como ya discutimos anteriormente, los cordones formados durante E5b en la gónada XX no son idénticos a los de la gónada XY. Tilmann y Capel (1999) demostraron que la migración induce la formación de cordones XX en gónadas de ratón cultivadas en sandwich durante 30-44 horas, pero su estudio no permite observar si estos cordones son idénticos a los formados en los controles XY. Si la migración mesenquimática produce cordones distintos en las gónadas XX y en las XY, entonces esto implica que la inducción de cordones testiculares a través de la migración mesenquimática no es la única consecuencia inmediata de la expresión del gen *SRY* en los

primeros pasos de la determinación sexual. Una explicación alternativa podría implicar una distinta capacidad de respuesta de las células XX y las células XY en el primordio gonadal a la hora de formar los cordones tras la migración mesenquimática, o una influencia de las células germinales, que se encuentran mayoritariamente en el cortex.

Un último aspecto a tratar en relación con la migración mesenquimática es el lugar en que ésta debe producirse. Se trata de un asunto que no ha sido abordado previamente, dado que en todos los estudios anteriores se ha observado la gónada en su conjunto, como el espacio natural en que ocurre la migración celular. Sin embargo, nuestras observaciones sobre el desarrollo de la gónada femenina de topo sugieren tenerlo en cuenta. En estas gónadas, la migración mesenquimática no se produce en toda su extensión, sino que afecta sólo a la región medular. Esto demuestra claramente, que la señal quimiotáctica que conduce la migración, sólo parte de las células epiteliales medulares, y no lo hace desde las células corticales. En otras palabras, sólo las células epiteliales medulares se comportan como células pre-Sertoli. Esto pone de manifiesto otra vez que el cortex y la médula definidos en E5a, ya son genéticamente diferentes antes de que tenga lugar el inicio de la diferenciación testicular, y define una tendencia natural de la médula gonadal a diferenciarse como tejido testicular, mientras que el cortex tendería a hacerlo como tejido ovárico (más adelante volveremos a discutir sobre este tema).

El papel de las células germinales.

En los topos, sólo la región medular de la gónada, que está desprovista de células germinales, sufre reversión sexual, mientras que la porción cortical, que conserva sus células germinales, sigue un desarrollo acorde con su sexo genético (Jiménez y col., 1993, 1996b; Sánchez y col., 1996). De igual manera, existen numerosos ejemplos en la bibliografía en los cuales la reversión sexual XX está asociada a la ausencia de células germinales (Short y col., 1969; Jost y col., 1972; Crummeyrolle-Arias y col., 1976; Taketo y col., 1985; Vigier y col., 1987; Prépin y Hida, 1989; Behringer y col., 1990; Charpentier y Magre, 1990; Lyet y col., 1995; Meyers-Wallen y col., 1995; Hunter 1996; Whitworth y col., 1996). Basándose en este hecho, Jiménez y col. (1996a) propusieron que los oocitos (células germinales meióticas XX) podrían contribuir al mantenimiento de la estructura ovárica inhibiendo en las células

DISCUSIÓN

somáticas vecinas (foliculares), la expresión de los genes propios del desarrollo testicular (MPGs, de Male Pathway Genes). De lo contrario, la activación de uno o más de estos genes determinantes testiculares, podría iniciar la diferenciación testicular, provocando así la reversión sexual de la gónada XX. En esta situación, la pérdida de los oocitos en cualquier momento de la vida de una hembra de mamífero tendría las consecuencias mencionadas, fenómeno conocido como "transdiferenciación" de células foliculares en células de Sertoli (Taketo y col., 1985; Taketo y Merchant-Larios, 1986; McLaren 1991; Burgoyne y Palmer, 1993).

Por otra parte, induciendo artificialmente un proceso de reversión sexual similar en gónadas indiferenciadas de una especie de canguro australiano, Whitworth y col. (1996) encontraron que dicha reversión del sexo gonadal podía originarse también por la pérdida de células germinales no meióticas (en fase de división mitótica). De acuerdo con esto, Whitworth (1998) propuso que las células germinales XX, ya sean mitóticas o meióticas, inhibirían la diferenciación de las células de Sertoli en las gónadas femeninas.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, la asimétrica distribución de las células germinales en el primordio gonadal de la hembra de topo podría estar implicada en el destino que finalmente alcanza cada una de las dos regiones gonadales en el desarrollo gonadal. La región cortical contiene la casi totalidad de las células germinales, que aún son bastante escasas, en la gónada XX en E5a, cuando se forma el septo mesenquimático que separa esta región de la medular. Teniendo en cuenta éstas y las consideraciones del apartado anterior sobre el carácter Sertoliano de las células somáticas de la médula pero no del cortex, proponemos que la ausencia de células germinales XX en la región medular del primordio gonadal en los embriones de topo E5a, permite que sus células epiteliales adquieran la capacidad sertoliana de inducir la migración mesenquimática desde el vecino mesonefros. Como ya sabemos, la consecuencia de esto es el inicio del desarrollo testicular sólo en la región medular de la gónada.

El caso de reversión sexual gonadal en una especie marsupial (*Tammar wallaby*) mencionado anteriormente (Whitworth y col., 1996) es el único descrito que se asemeja al de *Talpa*. Sólo en estos dos casos se produce una diferenciación testicular primaria, a partir de primordios gonadales indiferenciados XX. No se trata por tanto de procesos de transdiferenciación que transforman tejido ovárico en tejido testicular, como ocurre en los

demás casos de reversión sexual XX. Sin embargo, el caso del topo tiene una singularidad: es el único caso que se produce de forma natural, no inducida artificialmente y, además, no lo hace de forma esporádica sino que afecta a todas las hembras de varias especies.

Diferenciación de las células de Sertoli y otras células testiculares.

Como sabemos, varias líneas de evidencia ponen de manifiesto que las células de Sertoli son las responsables de dirigir la organogénesis testicular. No sólo son las primeras células en diferenciarse al principio del desarrollo testicular normal (Merchant-Larios, 1975; Merchant-Larios y Taketo, 1991), sino que es en ellas, o en sus precursores (células pre-Sertoli), donde muy probablemente se expresan todos los genes que actualmente se saben implicados en la determinación genética del sexo (ver la revisión de Capel, 1999).

La definición del fenotipo celular Sertoli ha ido evolucionando de acuerdo con nuestro conocimiento sobre sus características y funciones. Como es sabido, las células de Sertoli se caracterizan por su gran citoplasma con abundante retículo endoplásmico rugoso, núcleo claro con profundas indentaciones y localización periférica dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Además, un rasgo morfológico típico de las células de Sertoli es su capacidad para establecer uniones intersertolianas especializadas, en las que uniones apretadas (tight junctions) se asocian con cisternas del retículo endoplásmico rugoso dispuestas paralelamente a la membrana citoplásmica (ver Merchant-Larios y Taketo, 1991). Estas uniones especializadas permiten a las células de Sertoli establecer la llamada barrera hemato-testicular, que aísla a las células germinales XY del ambiente exterior a los túbulos seminíferos.

Sin embargo, esta definición de las células de Sertoli sólo se ajusta a aquellas que se encuentran en testículos adultos funcionales. Se ha demostrado que las células de Sertoli no pueden madurar completamente en ausencia de células germinales y, una vez desaparecidas estas, adquieren características de células de Sertoli inmaduras (Chung, 1974; McLaren,

DISCUSIÓN

1991). Nuestras observaciones en testículos embrionarios de topo demuestran que las células de Sertoli XY inmaduras del estadio E5b, no han formado aún las uniones especializadas. Por tanto, la ausencia de estas uniones en los ovotestes de las hembras no supone óbice alguno para que puedan ser consideradas como verdaderas células de Sertoli. Vemos pues, que los criterios morfológicos no son suficientes para determinar inequívocamente si una célula concreta es Sertoli o no.

Disponemos también de criterios de otra índole para caracterizar el fenotipo Sertoli. Existe un marcador bioquímico, la producción de hormona antimülleriana [AMH (de anti-Müllerian hormone) o MIS (de Müllerian inhibiting substance)], producida exclusivamente por las células de Sertoli durante el desarrollo gonadal, que permite identificar inequívocamente las células de Sertoli inmaduras. Por el contrario, el testículo adulto no expresa el gen *AMH* (ver Behringer y col., 1994; Mishina y col., 1996). Finalmente, *SOX9* se ha convertido en el marcador molecular por excelencia para las células de Sertoli, ya que su expresión en la gónada está invariablemente ligada a la diferenciación de este tipo celular (ver Koopman, 2001). En nuestra opinión, las características más definitorias de las células de Sertoli no derivan de su aspecto morfológico o de si expresan determinados genes, sino de su capacidad para llevar a cabo su función. Una célula de Sertoli no tiene necesariamente que parecerlo. De hecho, son las células pre-Sertoli las que expresan el gen *SRY*, e inducen en consecuencia la migración de células mesenquimáticas, antes de mostrar los primeros signos de diferenciación morfológica que, desde luego, no incluye el establecimiento de uniones intersertolianas especializadas.

La diferenciación funcional de las células de Sertoli implica el establecimiento de las siguientes estructuras o procesos: 1) migración mesenquimática y formación de cordones testiculares, 2) vascularización, 3) túnica albugínea, 4) células mioides y 5) células de Leydig. Como vemos, todas estos requisitos se dan en la porción testicular de los ovotestes de topo, lo que implica la presencia células de Sertoli. Asumimos que las células de Sertoli de estos ovotestes son las que componen los cordones medulares, dado que esta es la localización normal para las células de Sertoli en todo tejido testicular y que son éstas células las que adquieren la morfología de Sertoli inmaduras en E15b. Las hembras de topo nos proporcionan pues un escenario muy interesante para el estudio de la función y la diferenciación de las

DISCUSIÓN

células de Sertoli. Durante su desarrollo, los ovotestes de topo contienen células que funcionan como Sertoli, pero que no lo parecen hasta el final del proceso.

Aún más interesante es la diferencia de velocidad con que ocurre la diferenciación testicular en los ovotestes XX y en los testículos XY. En machos de ratón, rata y topo, la mayoría de los pasos del desarrollo testicular antes mencionados ocurren, o al menos se inician, de forma muy rápida, en un lapso de tiempo no superior a un día tras el inicio del proceso. Así, el desarrollo testicular de ratón se inicia a los 11,5 dpc, y a los 12,5 dpc ya es perfectamente reconocible la estructura testicular de la gónada. De manera similar, en embriones XY de topo E5a no se observa diferenciación alguna, y en E5b (un día más tarde, ver tabla II) el inicio del desarrollo testicular es evidente (ver figura 10A y B).

Esta situación contrasta claramente con la del desarrollo testicular en los ovotestes de las hembras de topo. Aquí, se inicia en E5b y culmina en E12, alrededor de 25 días después. Como veíamos en la figura 30, a lo largo de este tiempo van teniendo lugar, de manera secuencial y predecible, los distintos acontecimientos propios del desarrollo testicular. Este hecho permite hacer una disección fina de las potenciales funciones de las células de Sertoli, que resulta muy difícil, si no imposible, si se analizan testículos normales XY, dada la mayor celeridad, cuando no sincronía, con que ocurren esos mismos procesos.

Como ya vimos en un apartado anterior, existe un grupo de procesos que ocurren al mismo tiempo en machos y hembras de topo. Entre ellos, la migración mesenquimática y la formación de cordones tienen lugar en E5b (ver figura 10A y B). Las células de Sertoli de las hembras de topo pueden inducir esos procesos sin sufrir cambios morfológicos que permitan identificarlas como tales, aunque para ello parece necesaria la expresión de *SOX9*. Es lo mismo que ocurre en los machos XY de topo y de otras especies (ver Merchant-Larios y Taketo, 1991). Podemos deducir por tanto, que inducir la migración y la formación de cordones son funciones propias de las células pre-Sertoli. La vascularización y la formación de la túnica albugínea se inician en los ovotestes de topo antes de que ocurra la citodiferenciación de las células de Sertoli y de Leydig, y antes de que cese la expresión de *DAX1*, pero bajo la expresión de *SOX9*. De estos hechos podemos deducir que la diferenciación morfológica de las células de Sertoli en los testículos normales es una consecuencia adicional, pero no un requisito para que se induzca la vascularización y la formación de la túnica albugínea. Además, nuestros resultados indican que estos procesos

DISCUSIÓN

requieren la expresión del gen *SOX9* en las células de Sertoli, y que el gen *DAX1* no tiene capacidad para inhibirlos (ver más adelante).

En los ovotestes de topo, las células de Leydig aparecen en E10 y su número se incrementa espectacularmente entre E12 y E14. La situación es distinta en los machos XY, en cuyos testículos las células de Leydig aparecen en E5c y proliferan considerablemente en E6. A diferencia de lo que ocurre con las células de Sertoli, las células de Leydig XX de topo alcanzan rápidamente su morfotipo característico, necesario para conseguir una funcionalidad normal. El caso de las células mioides (peritubulares) es menos claro, ya que se pueden observar a partir de E6 en distintos estadios del desarrollo prenatal de topos XX, Sin embargo su presencia no se hace realmente patente hasta E11, acompañando el inicio de la gran transformación del estroma de la región medular, que implica la diferenciación masiva de células de Leydig.

Resulta especialmente interesante el hecho de que la aparición de células de Leydig en la gónada XX de topo (E10), se produce poco tiempo después del cese en la expresión del gen *DAX1* (E9), y cuando aún está expresándose *SOX9*. En los machos XY de topo, las células de Leydig aparecen en E6 (2 ó 3 días después de la diferenciación de las células de Sertoli en E5b) y lo hacen en presencia de *SRY*, *SOX9* y *DAX1* (los productos de los respectivos genes). En otras palabras, las células de Sertoli pueden inducir la diferenciación de las células de Leydig en presencia de *SRY* y *DAX1*, pero no en presencia de *DAX1* solo. Estos resultados son coherentes con la hipótesis según la cual *DAX1* actuaría como un inhibidor de genes que actúan en la ruta masculina de diferenciación gonadal (*SOX9* por ejemplo), y su efecto antitesticular sería anulado en los machos por el producto del gen *SRY* (Jiménez y col., 1996a; Jiménez y Burgos, 1998; ver el capítulo de introducción). Sin embargo, las hembras de topo nos enseñan ahora que no todas las funciones de las células de Sertoli podrían ser inhibidas por *DAX1*, sino sólo la inducción de la diferenciación de las células de Leydig (y posiblemente las células mioides), mientras que otras capacidades de estas células, tales como la inducción de la migración mesenquimática, con las consecuencias que esto desencadena (formación de cordones, vascularización, formación de la túnica albugínea), se producen a pesar de estar expresándose *DAX1*. Aunque no existen evidencias irrefutables todavía, los datos disponibles sugieren que todos estos genes se expresan en las células de Sertoli (o pre-Sertoli), y nos permiten imaginar el escenario molecular en que se

produce la regulación de estos procesos. El resultado de estas consideraciones es el siguiente modelo teórico sobre el origen de la reversión sexual en *T. occidentalis*.

UNA HIPÓTESIS SOBRE EL ORIGEN DE LA REVERSIÓN SEXUAL EN *Talpa*.

El primer factor importante a considerar en el inicio del desarrollo gonadal de las hembras de topo es la ausencia del gen *SRY*. Como consecuencia de ello, la gónada XX toma la ruta de desarrollo femenino, que se inicia con una colonización asimétrica del primordio gonadal indiferenciado por parte de las células germinales primordiales. Este hecho define dos regiones gonadales en E5a, un cortex que contiene células germinales y una médula que carece de ellas casi por completo (Fig. 9D y E). Nuestras observaciones indican que, a partir de aquí, las células somáticas de la región medular comienzan a funcionar como células pre-Sertoli, mientras que las de la región cortical no lo hacen, y continúan funcionando como en una gónada indiferenciada.

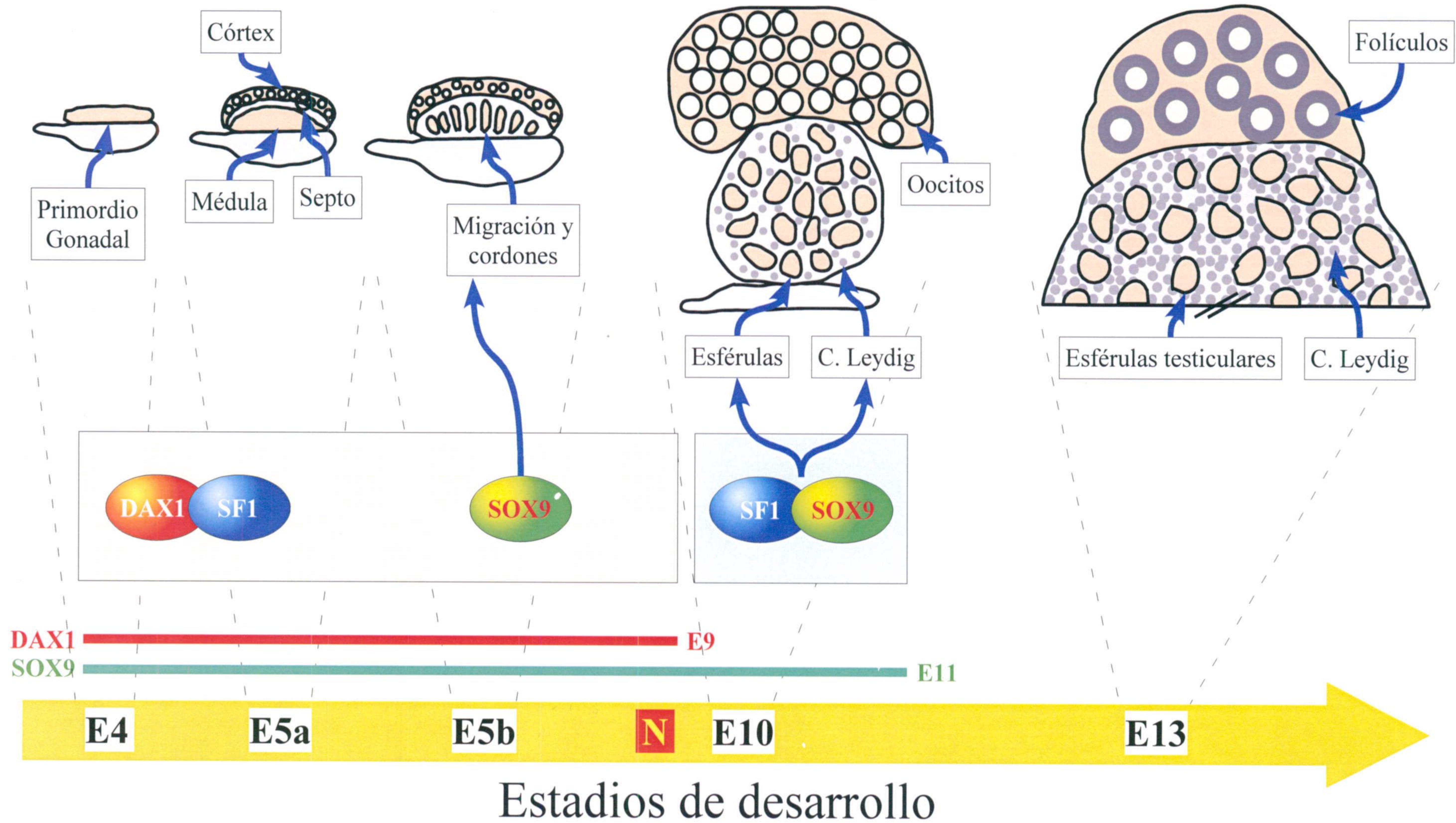
Desde el inicio de la formación del primordio gonadal indiferenciado de topo (E4), en el mismo se expresan los genes *SOX9* y *DAX1*. Es precisamente esta expresión de *SOX9* lo que diferencia claramente al topo de otras especies de mamíferos (rata, ratón, humanos, etc...) en cuanto al inicio del desarrollo gonadal XX y, por ello, este gen podría ser el responsable primario de la reversión sexual que hemos descrito en este trabajo. Aunque no sabemos en qué células lo hace, es probable que la expresión de *SOX9* en hembras de topo tenga lugar en las células somáticas del primordio gonadal en E4 y en las células de los cordones medulares desde entonces. Nuestros resultados demuestran que en presencia del gen *SRY* (embriones XY), el gen *DAX1* no es capaz de inhibir ninguno de los procesos propios de la diferenciación testicular. El resultado es el desarrollo de testículos normales en los machos. Sin embargo, también podemos comprobar que incluso en ausencia del producto del gen *SRY* (embriones XX), *DAX1* no es capaz, al menos en el topo, de inhibir completamente la inducción por *SOX9* de la diferenciación testicular, habiendo algunos procesos que escapan de esa inhibición. Así, las células pre-Sertoli de la región medular son capaces de iniciar el proceso de diferenciación testicular, induciendo la migración mesenquimática desde el mesonefros, que ocurre en E5b. Sin embargo, en este momento no se produce la diferenciación de las

DISCUSIÓN

células de Leydig (ni en los días sucesivos), lo que puede atribuirse al efecto inhibitor del gen *DAX1*, dado que estas células aparecen en E10, poco después del cese de la expresión de este gen (E9). Una vez diferenciadas las células de Leydig y las células mioideas, la expresión de *SOX9* se deprime en E11. El posterior aumento en el número de estas células se produce en ausencia de *SOX9*, pero probablemente no se deba a procesos de diferenciación celular, sino más bien a un intenso proceso de proliferación vegetativa de células ya diferenciadas. La Fig. 31 resume también una hipótesis para explicar cómo podrían las células de Sertoli ejercer distintas funciones en presencia y en ausencia de producto del gen *DAX1*. Tal como se revisó extensamente en la introducción de esta memoria, el gen *DAX1* tiene un efecto antitesticular que podría derivarse de la capacidad de la proteína DAX1 por ligarse competitivamente a otros factores de transcripción, perturbando así sus efectos en la regulación de la transcripción de otros genes. Así, la formación de un dímero SF1-SOX9 es necesaria para la activación del gen de la hormona antimülleriana (*AMH*) humana en estudios de transfección celular *in vitro* (de Santa Barbara y col., 1998). De forma similar, estudios de mutagénesis dirigida en ratones demostraron que el complejo SF1-SOX9 es necesario para que el gen *AMH* se exprese a niveles altos, mientras que por sí solo, SOX9 no puede inducir más que niveles basales en la expresión de *AMH* (Arango y col., 1999). También se ha sugerido que la unión de la proteína WT1 a SF1 tiene un efecto sinérgico sobre la capacidad transactivadora de este último, y que DAX1 elimina tal sinergismo compitiendo con WT1 por unirse a SF1 (Nachtigal y col., 1998). Por tanto, la avidez de DAX1 por ligarse con SF1 podría también perturbar o impedir la capacidad de éste para unirse a SOX9 durante la activación del gen *AMH* (ver Bowles y Koopman, 2001), y posiblemente de otros genes necesarios para la función de las células de Sertoli.

Aunque no disponemos de datos experimentales al respecto, varios indicios sugieren claramente que las células pre-Sertoli de las gónadas XX de topo no producen AMH durante su desarrollo prenatal. En primer lugar, la producción de AMH en este periodo tendría una fuerte selección natural en contra, ya que implicaría la infertilidad de todas las hembras. De hecho, los conductos de Müller se desarrollan correctamente en las hembras de topo. En segundo lugar, estas células pre-Sertoli no adquieren hasta E15b, la morfología de Sertoli inmaduras, como lo hacen las células XY presentes en los testículos de los machos. Entre esas características está el considerable desarrollo del retículo endoplásmico rugoso, que se considera necesario para producir grandes cantidades de AMH, hecho que no se produce

Hipótesis sobre el origen de los ovotestes en topos



DISCUSIÓN

durante el desarrollo prenatal del topo XX. La falta de producción de AMH podría pues explicar el retraso que sufren estas células pre-Sertoli XX de topo en alcanzar la morfología de las células de Sertoli inmaduras.

De acuerdo con estos datos, nosotros proponemos que entre E4 y E9, el producto del gen *DAX1* secuestraría las moléculas SF1 presentes en las células pre-Sertoli de la gónada XX de topo, ligándose a ellas para formar dímeros DAX1-SF1, e impidiendo así la formación de dímeros SF1-SOX9. Es posible que, tal como ocurre con la activación del gen *AMH*, estos dímeros SF1-SOX9 sean también necesarios para que las células pre-Sertoli puedan inducir la diferenciación de células de Leydig. Esto explicaría porqué estas células, igual que podría ocurrir con la AMH, no se forman en presencia de DAX1 (período E4-E9), sino que lo hacen una vez que ha desaparecido éste (período E10-E11). Sin embargo, la inducción de la migración mesenquimática por parte de las células pre-Sertoli podría requerir la presencia de SOX9, bien solo o en combinación con otros factores, pero no la formación de dímeros SF1-SOX9. De esta forma, el proceso podría producirse en presencia de DAX1 (período E4-E9).

Evidentemente, un conocimiento más preciso del origen de la reversión sexual de *Talpa* requerirá el estudio de los patrones de expresión temporal y espacial de estos y otros muchos genes que actualmente se saben implicados en los procesos de determinación y diferenciación sexual de mamíferos. Los estudios que llevaremos a cabo con genes tales como el de la *AMH* y *SF1* contribuirán a apoyar o descartar esta hipótesis y probablemente, especular acerca de otros aspectos del proceso.

EVOLUCIÓN MOLECULAR DE *SOX9* y *DAX1* EN MAMÍFEROS

La elevada homología entre las secuencias del fragmento clonado del gen *DAX1*, y los de los exones primero y segundo de *SOX9* con los segmentos respectivos de esos mismos genes de otras especies de mamíferos y aves, demuestra que en este trabajo se aislaron los segmentos correspondientes del gen *SOX9* de topo. Además, puesto que, en general, la homología de la secuencia de topo con la de humano es superior a la que presenta con la de roedores, estos segmentos apoyan el hecho de que los Soricomorfos [superfamilia de

DISCUSIÓN

insectívoros que incluye musarañas (Familia Soricidae) y los topos (Familia Talpidae)] están estrechamente emparentados con los primates desde un punto de vista evolutivo (Novacek y col. 1988). Además, esta elevada homología, tanto de *SOX9* como de *DAX1* corrobora que estos genes desempeñan importantes papeles en el desarrollo de la gónada, que deben haberse conservado en los grupos taxonómicos a los que pertenecen las especies comparadas. Por lo tanto, las conclusiones que se puedan extraer respecto a las funciones desempeñadas, tanto por *SOX9* como *DAX1*, a partir de los estudio realizados en *T. occidentalis* deberán ser extrapolables a grandes rasgos a otras especies pertenecientes a esos grupos taxonómicos.

Haciendo referencia especial al gen *DAX1*, cuando se compara la secuencia de las dos repeticiones clonadas entre sí, su homología resulta ser solo del 53%, muy inferior a la que existe entre repeticiones homeólogas de distintas especies. Esto podría ser indicativo de una larga historia evolutiva de las distintas repeticiones, que pudieron haberse originado al menos en el tronco común de los mamíferos, y haber alcanzado un cierto grado de divergencia antes de la separación de los distintos grupos taxonómicos incluidos en las alineaciones.

También merece especial atención el hecho de que la homología se haya conservado alta en la primera mitad de cada repetición y haya desaparecido prácticamente en la segunda, así como que la última repetición sea más corta en todas estas especies. Esto podría ser indicativo de una fuerte presión selectiva, que ha mantenido las secuencias de la primera mitad, mientras que en la segunda mitad de cada repetición no ha existido prácticamente esta selección. Proponemos en virtud de estos resultados, que los aminoácidos codificados por los primeros 80 nucleótidos, aproximadamente, de cada repetición estarían destinados a reconocer una secuencia repetida cuatro veces en el ADN, mientras que el resto, codificaría aminoácidos con un papel meramente espaciador, que mantendrían la distancia adecuada entre los dominios de reconocimiento de la secuencia diana. Esto explicaría asimismo el hecho de que la última repetición sea más corta, ya que no necesitaría mantener la distancia adecuada con la siguiente, sino con el dominio LBD, de unión al ligando, actuando así como simple secuencia "bisagra".

¿EXISTE UN PATRÓN GENERAL DE DESARROLLO GONADAL EN MAMÍFEROS? UNA PERSPECTIVA EVOLUTIVA

Gran parte del indiscutible interés biológico de las hembras de topo, surge del carácter excepcional de la morfología y funcionalidad de sus gónadas. Efectivamente, los topos son lo únicos mamíferos cuyas hembras tienen ovotestes y, a pesar de ello, son fértiles, una situación que se puede calificar de excepcional sin lugar a dudas. Pero, puesto que la excepcionalidad de algo se define por comparación con el resto, en este apartado vamos a presentar argumentos para demostrar que el grado de excepcionalidad de las hembras de topo no es tan alto como en principio pudiera parecer. Esto se pone de manifiesto cuando se compara el desarrollo de los ovotestes de *Talpa* con el de los ovarios de muchas otras especies de mamíferos. Como veremos, estas comparaciones sugieren que el topo es más distinto de unos mamíferos que de otros, porque los mamíferos no son un grupo homogéneo en cuanto al desarrollo ovárico y que las diferencias con el topo se refieren principalmente a cómo termina el desarrollo ovárico y no tanto a cómo se inicia éste.

Es sobradamente sabido que la mayor parte de la investigación biológica contemporánea sobre mamíferos se realiza utilizando como especie modelo el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) y, en mucha menor medida, la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*). Esto es especialmente acusado en el campo de la Biología y la Genética del Desarrollo de mamíferos, donde los trabajos, como el presente, dedicados a conocer otras especies, son casi anecdóticos y se realizan generalmente para añadir un enfoque evolutivo al tema de que se trate. Es lo que ocurre, por ejemplo, en la investigación actual sobre la determinación genética del sexo en mamíferos.

Como ya hemos comprobado en otro apartado de este capítulo, si comparamos el desarrollo gonadal del topo con el del ratón, podemos constatar numerosas diferencias, principalmente en el desarrollo ovárico, no tanto así en relación con el desarrollo testicular, que es bastante similar en ambas especies. Esas diferencias son especialmente acusadas en relación con el desarrollo de la región medular, que no existe en el ratón, pero también las hay en cuanto al desarrollo de la porción ovárica, que en el ratón es mucho más precoz. Sin

DISCUSIÓN

embargo, también hemos visto que el desarrollo del tejido ovárico de topo es muy similar al del ovario humano, aunque, como el ratón, éste también carece de región medular.

Sin embargo, los topos no son los únicos mamíferos que desarrollan una región medular en sus gónadas femeninas. Para encontrar documentación al respecto, hemos de remontarnos a trabajos publicados a finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Basándose en observaciones anteriores realizadas por Leydig y Tourneux a mediados del siglo XIX, Bouin y Limon acuñaron el término de "glándula intersticial" para referirse a la región medular del ovario de muchos mamíferos, compuesta por células intersticiales, similares a las de los testículos de los machos, acompañadas en muchos casos por cordones medulares (citado por Popoff, 1911). Fraenkel (1905) estudió el ovario adulto de 45 especies de mamíferos distintos y estableció que 24 de ellas, incluyendo la especie humana, carecen de glándula intersticial, mientras que las 21 especies restantes presentan una glándula intersticial más o menos desarrollada. Mac Leod (1880) investigó el ovario del topo europeo (*Talpa europaea*), el armiño (*Mustela arminea*) y una especie de murciélago (*Vesperugo pipistrella*) y revisó la bibliografía existente sobre la presencia de cordones medulares en la glándula intersticial de otras especies. El autor demostró que el topo y el murciélago presentan una glándula intersticial mucho más desarrollada que la de otras especies. Popoff (1911) investigó el desarrollo prenatal de las gónadas del topo europeo y comparó asimismo la situación del topo con la de otros mamíferos. De los datos proporcionados en estos trabajos, deducimos que los mamíferos se pueden clasificar dos grandes categorías a este respecto: aquellos que no tienen glándula intersticial en el ovario y los que sí la poseen. Entre los primeros están especies tales como la humana, el cerdo, la oveja y la cabra. Entre los segundos es preciso distinguir a su vez dos subgrupos: los que poseen glándula intersticial tanto en los estadios fetales como en los adultos (el gato, el topo y *Vesperugo pipistrella*), y los que la desarrollan en la vida fetal, pero desaparece posteriormente y ya no se observa en el ovario adulto. Es el caso de los Solípedos (ungulados perisodáctilos), como el caballo (Aimé, 1907). La glándula intersticial de *Talpa* (Mac Leod, 1880; Popoff, 1911) y *Vesperugo* (Mac Leod, 1880) alcanza un grado de desarrollo muy superior al de otras especies. Tourneux (1904) consideró la glándula intersticial del topo como un testículo rudimentario, en función de su origen ontogenético. Posteriormente, Peyre (1962) demostró que el desmán de los Pirineos (*Galemys pyrenaicus*) también posee una glándula intersticial muy desarrollada, cuyas características se asemejan bastante de la del topo.

DISCUSIÓN

Podemos concluir por tanto que, aunque *Vesperugo*, *Galemys* y, sobre todo, *Talpa* presentan un desarrollo anormalmente acusado de la glándula intersticial del ovario, hasta el punto que en el topo al menos ésta puede considerarse como una porción de tejido testicular disgenésico, la existencia de dicha glándula no es algo excepcional, dado que existen numerosos mamíferos que la tienen. Su presencia está representada en muchos grupos taxonómicos de distintos órdenes, tales como carnívoros, insectívoros o quirópteros, entre los estudiados desde este punto de vista. En todas estas especies, la gónada femenina presenta pues una estructura bipartita que se establece muy al principio del desarrollo, al menos en las especies en que se ha estudiado el desarrollo gonadal.

Durante muchos años se consideró válida la hipótesis de Witschi (1951) por la cual, el primordio gonadal de los mamíferos está regionalizado. Es lo que ocurre en taxones tan dispares como *Drosophila*, anfibios o reptiles (ver: Witschi, 1951; Merchant-Larios y col., 1997; Capel, 1999). Según este autor, la región cortical derivaría del epitelio celómico y sería la precursora del ovario, mientras que la región medular derivaría del mesonefros y daría origen al testículo. Witschi indicó además la existencia de una delgada capa de mesénquima, a la que denominó "albugínea primaria", entre el cortex y la médula y descartó así al epitelio celómico como posible fuente de células de la médula. Si obviamos las referencias al origen ontogenético de cortex y médula, el esquema propuesto por Witschi sobre la estructura del primordio gonadal indiferenciado de los mamíferos, se ajusta perfectamente al observado por nosotros en *Talpa*. En E5a existe un cortex, una médula y un septo mesenquimático. Sin embargo, nuestros datos de embriones E4 no apoyan la hipótesis de dos orígenes distintos, sino uno sólo, para todo el primordio gonadal, dado que se forma un único blastema, probablemente procedente del epitelio celómico, muy similar al descrito, por ejemplo, en la rata (Merchant-Larios, 1975). Muy recientemente se ha demostrado en el ratón, que efectivamente las células de la gónada XX y XY derivan del epitelio celómico (Karl y Capel., 1998). Esta y otras razones llevaron a varios autores a descartar por completo el modelo de Witschi (Merchant-Larios, 1975; Merchant-Larios y Taketo, 1991; Karl y Capel., 1998; Capel, 1999). El resultado ha sido que la regionalización del primordio gonadal de los mamíferos ha quedado olvidada durante lustros.

En nuestra opinión, sólo es necesario asumir que no todos los mamíferos son iguales a este respecto, para admitir que ambas alternativas probablemente recogen aspectos válidos.

DISCUSIÓN

El desarrollo de los testículos en los machos XY parece estar muy conservado en todos los mamíferos, no existiendo diferencias destacables entre especies tales como el ratón o el topo, que parecen ser tan diferentes en el desarrollo femenino. En el topo hemos comprobado que la gónada masculina no experimenta una regionalización evidente. El cortex y la médula no se separan nunca y no se hacen, en consecuencia, muy patentes. A pesar de ello, los cordones testiculares de topo y ratón solo se forman en la región medular. Es por ello que consideramos que los cordones testiculares de los testículos XY son ontogenéticamente homólogos de los cordones medulares de los ovotestes XX. La diferencia entre ellos es que los cordones testiculares XY provienen de la primera proliferación del epitelio celómico, mientras que la mayoría de los cordones medulares XX de topo se originan durante la proliferación secundaria que se establece tras la regionalización de la gónada XX y se prolonga hasta E8-E9.

Por tanto, proponemos que sólo el primordio gonadal femenino de mamíferos puede sufrir una regionalización que podríamos llamar facultativa en términos evolutivos, ya que ocurre en algunas especies pero no en otras. Entre las primeras estarían todas aquellas que forman una glándula intersticial durante el desarrollo, independientemente de si la conservan en el periodo adulto o no (topo, murciélago, desmán, etc.). Entre las segundas estarían aquellas que carecen de dicha glándula intersticial (rata, ratón, humano, etc.).

Esta hipótesis no es fácil de acomodar en un contexto evolutivo, dado que las especies con glándula intersticial no forman grupos taxonómicos homogéneos. Por ejemplo, especies de musarañas como *Crocidura russula*, que son sorícidos insectívoros, no tienen glándula intersticial en sus ovarios (Kress, 1984; Jeanmaire-Besançon, 1985), mientras que los topos, también insectívoros, sí la presentan. Sin embargo, los topos comparten este carácter con determinados murciélagos, a pesar de que éstos son quirópteros y no insectívoros. Como argumento en contra de lo anterior, observamos que posiblemente todos los géneros dentro de la familia Talpidae (Insectivora, Mammalia), que incluye especies de topos (géneros *Talpa*, *Mogera*, etc., ver Sánchez y col., 1996) y desmanes (género *Galemys*; ver Peyre, 1962), compartan el carácter de desarrollar una gran glándula intersticial en sus ovarios.

Desde un punto de vista evolutivo, es interesante recordar que Witschi (1951) se inspiró en sus propias observaciones sobre el desarrollo de anfibios para proponer su hipótesis sobre la regionalización del primordio gonadal de los mamíferos. Por otra parte, resulta especialmente interesante resaltar el alto grado de similitud estructural que existe entre el

DISCUSIÓN

desarrollo de la gónada femenina de la especie de tortuga *Lepidochelys olivacea*, y el de los ovotestes de topo descrita aquí. Existen una región medular y una región cortical bien definidas en el primordio gonadal de esta tortuga. En ambos sexos se forman cordones medulares en el cortex, que sólo evolucionan en el macho, mientras que se fragmentan originando algo muy similar a esférulas, y termina desapareciendo en las hembras. El cortex degenera en los machos y se desarrolla en las hembras (Merchant-Larios *y col.*, 1997). Además, los cordones medulares de *L. olivacea* son morfológicamente idénticos a los de la región medular de los ovotestes de topo: contorneados, de trayectoria zigzagueante y diámetro variable.

Asumiendo que estas similitudes probablemente no son casuales, podemos entonces especular sobre su origen desde un punto de vista evolutivo. La regionalización del primordio gonadal es probablemente un rasgo primitivo (se da en anfibios y reptiles) y los mamíferos podrían haber modificado este mecanismo para constituir su primordio gonadal sin que haya regionalización. Sin embargo, es posible que las alteraciones que se establecieron en el control genético de este proceso hayan sido tan sutiles que puedan revertir con cierta facilidad a la forma primitiva. Para ello sólo sería necesario que una gónada regionalizada también fuese funcional en mamíferos. Además, la principal diferencia entre mamíferos y otros vertebrados en relación con el proceso de determinación del sexo radica en que los mamíferos han desarrollado un mecanismo genético controlado por su gen exclusivo *SRY*. Este gen parece funcionar correctamente en los embriones XY de todas las especies de mamíferos que lo poseen, independientemente de si el primordio gonadal XX se regionaliza o no en cada especie concreta, y parece claro también que ello implica la no regionalización la gónada XY. Por tanto, en estas condiciones, la presión selectiva contra la regionalización de la gónada XX probablemente no sería muy alta, lo que permitiría la variabilidad que hemos constatado a este respecto. Esta hipótesis podría explicar así cómo especies de distintos órdenes de mamíferos comparten un rasgo que, sin embargo, las diferencia de otras especies de su mismo grupo taxonómico.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. El desarrollo testicular de los machos del topo *Talpa occidentalis* se realiza según el patrón común en otras especies de mamíferos, no existiendo diferencias significativas que merezcan ser destacadas.
2. Los genes *SRY*, *DAX1* y *SOX9* se expresan de forma ininterrumpida durante todo el desarrollo prenatal de los testículos XY de topo, un perfil de expresión bastante distinto del de especies tales como rata y ratón. La expresión continuada de *SRY* explica que la de *DAX1* no tenga ninguna consecuencia negativa en el desarrollo testicular.
3. El topo es el único mamífero en el que el primer signo de diferenciación sexual aparece en las hembras, en lugar de en los machos. Es la regionalización del primordio gonadal indiferenciado, en el que se definen una región cortical y una región medular, separados por un septo mesenquimático.
4. La región medular es precursora del tejido testicular, mientras que la región cortical da origen al tejido ovárico de los ovotestes que poseen las hembras de topo.
5. El desarrollo del tejido ovárico de los ovotestes de las hembras de topo ocurre según un patrón muy similar al del ovario humano, pero bastante diferente del de otras especies como ratón o rata. Se caracteriza por un retraso considerable en el inicio de la meiosis y de la posterior foliculogénesis, una característica bastante excepcional entre los mamíferos de pequeño tamaño corporal.
6. El tejido testicular de los ovotestes del topo es ontogenéticamente homólogo del de los testículos de los machos. Su desarrollo se inicia al mismo tiempo (estadio E5b) y a partir de la misma porción del primordio gonadal (la región medular).

CONCLUSIONES

7. Este tejido testicular de los ovotestes se desarrolla siguiendo un patrón idéntico al del tejido testicular XY, aunque a una velocidad inferior. Como en los machos, este patrón incluye: migración mesenquimática, formación de cordones, vascularización, diferenciación de células de Sertoli, Leydig y mioideas, formación de una *rete testis* y una túnica albugínea.
8. Los nuevos datos morfológicos y moleculares demuestran que las gónadas de las hembras de topo son verdaderos ovotestes. En consecuencia, estos animales son hermafroditas verdaderos desde un punto de vista fenotípico. La presencia de tejido testicular XX en estas gónadas permite hablar de reversión sexual XX en las especies del género *Talpa*.
9. La presencia, como en los testículos de los machos adultos de topo, de células polinucleadas premeioticas también en las gónadas de las hembras, junto con otros datos referidos a otras especies, sugiere la existencia de una clara tendencia de las especies del género *Talpa*, o quizás de otras familias entre los insectívoros, a sufrir este fenómeno tan poco común en otros mamíferos.
10. La diferencias entre el desarrollo del tejido testicular XY en los testículos de los machos, y del XX en los ovotestes de las hembras de topo, indican que en el inicio del desarrollo testicular, el gen *SRY* ejerce otras funciones además de facilitar la activación de *SOX9*.
11. La expresión del gen *SOX9* durante todo el proceso de formación del tejido testicular de los ovotestes de las hembras de topo apunta hacia este gen como el responsable de la inducción de dicho proceso.
12. La presencia de células germinales primordiales XX en la región cortical, pero no en la región medular de la gónada femenina de topo desde los primeros estadios del desarrollo, sugiere que la presencia de estas células conlleva la represión, en las células pe-Sertoli, de genes necesarios para el desarrollo testicular. Entre estos genes estaría *SOX9*.

CONCLUSIONES

13. El patrón de expresión de *DAX1* en las gónadas XX de topo sugiere que, en ausencia de *SRY*, *DAX1* es capaz de reprimir en las células pre-Sertoli su capacidad para inducir la diferenciación de las células de Leydig, pero no la de inducir la migración, la formación de cordones, la vascularización y la formación de la túnica albugínea.
14. El hecho de que dos repeticiones del dominio DBD del gen *DAX1* de topo guarden entre sí menor homología que cualquiera de ellas con sus homeólogos de otras especies, denota un origen antiguo de las mismas, seguido de cierta divergencia entre sus secuencias, que sería anterior a la separación de los grupos taxonómicos comparados.
15. La distribución de la homología entre repeticiones, que se concentra en los primeros 80 nucleótidos de cada repetición, apoya la idea de que sólo los aminoácidos codificados por esta porción de las repeticiones reconocerían secuencias diana en el ADN, sirviendo el resto como espaciadores entre repeticiones, o como región "bisagra" entre los dominios de unión al ADN y de unión al ligando, en el caso de la última repetición del DBD.
16. Los datos de este y otros trabajos anteriores sobre el desarrollo gonadal de mamíferos permiten clasificarlos en dos categorías, según presenten o no en sus ovarios vestigios de la región medular del primordio gonadal (la glándula intersticial). El caso de las hembras de *Talpa* puede representar un caso extremo en el desarrollo de esa glándula intersticial, que se transforma en un tejido testicular disgenésico, y convierte a estas gónadas en verdaderos ovotestes.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFIA

- Adams, L. (1909). Notes on the breeding habits of the common mole. *Ibid.* Liv. no. 2 pp. 1-9.
- Aimé, P. (1907). Recherches sur les célules interstitielles de l'ovarie chez quelque mamifères. *Arch. Zool. Exp.* XXXVII^e année, n° 3.
- Arango, N., Lovell-Badge, R. and Behringer, R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gen promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 4:409-419.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K.C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E.R.G., Fraccaro, M., Zuffardi, O. y Camerino, G. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature Genetics* 7:497-501.
- Barr, M., Shaver, E., y Carr, D. (1959). An unusual sex chromatin pattern in three mentally deficient patients. *J. Ment. Defic. Res.* 3:78-87.
- Behringer, R., Cate, R., Froelick, G., Palmiter R. y Brinster R. (1990). Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature* 345:167-170.
- Behringer, R., Finegold, M. y Cate, R. (1994). Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 79:415-425.
- Bell, D., Leung, K., Wheatley, S., Zhou, S. y col. (1997). *SOX-9* directly regulates the type II collagen gene. *Nature Genet.* 16: 174-178.
- Beolchini, F., Revecchi, L. Capanna, E. y Bertolani, R. (2000). Female gonad of moles, genus *Talpa* (Insectivora, Mammalia): ovary or ovotestis. *J. Exp. Zool.* 286:745-754.
- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N. y Fellows, M. (1990). Genetic evidence equating *SRY* and the testis determinig factor. *Nature* 348:448-450.
- Bialer, M., Penchaszadeh, V., Kahn, E., Libes, R., Krigsman, G. y Lesser, M. (1987). Female external genitalia and Müllerian duct derivatives in a 46,XY infant with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 28:723-731.
- Bitgood, M., Shen, L. y McMahon, AP. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr. Biol.* 6(3):298-304.
- Bowles, J., Koopman, P. (2001). New clues to the puzzle of mammalian sex determination. *Genome. Biol.* 2:REVIEWS1025.
- Buehr, M., Gu, S., y McLaren, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development.* 117:273-281.
- Burgoyne, P., y Palmer, S. (1991). The genetics of XY sex reversal in the mouse and other animals. *Sem. Devl. Biol.* 2:277-284.
- Burgoyne, P., y Palmer, S. (1993). Cellular basis of sex determination and sex reversal in mammals. In "Gonadal development and Function" (S.G. Hillier, Ed.), pp. 17-30. Raven Press, New York.
- Byskov, A. (1986). Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol. Rev.* 66 :71-117.
- Cabrera, A., 1914: Fauna Ibérica. Mamíferos. ED. Por museo Nac. Cienc. Nat. Madrid.
- Capel., B. (1999) The battle of the sexes, *Mech. Devel.* 92:89-103.
- Capel, B., Albrecht, K., Washburn, L. y Eicher, E. (1999). Migration of mesonephric cells into mammalian gonad depends on *Sry*. *Mech. Dev.* 84:127-131.
- Cardigan, K. y Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Gene Dev.* 11:3286-3305.
- Cattanach, B.M. (1961). XXY mice. *Genet. Res.* 2:156-158.
- Chandra, H.S. (1984). A model for mammalian male determination based on passive Y chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 193:384-388.
- Chandra, H.S. (1985). Sex determination: A hypothesis based on non coding DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:1165-1169.
- Charpentier, G. y Magre, S. (1990) Masculinizing effect of testes on developing rat ovaries in organ culture. *Development.* 110:839-49.
- Chung, K. (1974). A morphological and histochemical study of Sertoli cells in normal and XX sex reversed mice. *Am J. Anat.* 139:369-388.

BIBLIOGRAFÍA

- Cidecyan, D., Rodriguez, M., Haun., R., Abdenour, G. y Bruce, J. (1993). New findings in short rib syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 46:255-259.
- Clépet, C., Schafer, A.J., Sinclair, A.H., Palmer, M.S., Lovell-Badge R. y Goodfellow P.N. (1993). The human *SRY* transcript. *Hum. Mol. Genet.* 2:2007-2012.
- Cline, T.W. y Meyer, B.J. (1996): Vive la difference: males vs females in flies and worms. *Annu. Rev. Genet.* 30:637-702.
- Cohen, D., Sinclair, A. y McGovern, J. (1994). Sry protein enhances trascription of Fos-related antigen 1 promoter construct. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 91:4372-4376.
- Colvin, J., Green, R., Schmahl, J., Capel, B. y Ornitz, D. (2001). Male to female sex reversal in mice lacking fibroblast groth factor 9 *Cell* 104:875-889.
- Crews, D. (1996). Temperature-dependent sex determination: the interplay of steroid hormones and temperature. *Zool. Sci.* 13:1-13.
- Crummeyrolle-Arias, M., Scheib, D. y Ascheim, P. (1976). Light and electron microscopy of the ovarian interstitial tissue in the senile rat: normal aspect and response to HCG of deficiency cells and epithelial cords. *Gerontology.* 22:185-204.
- De Grandi, A., Calvari, V., Bertini, V., Bulfone, A., Peverali, G., Camerino, G., Borsani, G. y Guioli, S. (2000). The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech. Dev.* 90:323-326.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F., Berta, P. (1998) Direct interaction of SRY related protein SOX9 and steroidigenic factor 1 regulates transcription of the human antimüllerian hormone gene. *Mol. Cell Biol.* 18:6653-6665.
- Donovan, P. (1991). Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. In Pederson RA. Ed. *Current topics in developmental biology.* Vol 29 San Diego Academic Press, pp 189-218.
- Ebensperger, C. y col. (1991). No evidence of mutation in four candicates genes for male sex determinatio/diferentiation in sex reversed XY females with campomelic dysplasia. *Ann. Genet.* 34:233-238.
- Eichwald, E.J. y Silmsner C.R. (1955). Sin titulo. *Transplant. Bull.* 2:148-149.
- Fechner, P., y col. (1993). Report of a kindred with X-linked (or autosomal dominant sex limited) 46 X,Y gonadal dysgenesis. *J. clin. endocrinol. Methabol.* 76:1248-1252.
- Ferguson-Smith, M., North, M., Affara, N. y Briggs, H. (1990). The secret of sex. *Lancet.* 1990 Sep 29;336(8718):809-10.
- Ferrari, S., Harley, V.R., Pontiggia, A., Goodfellow, P.N., Lovell-Badge, R. y Bianchi, M.E. (1992). SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J.* 11:4497-4506.
- Ford, C.E., Jones, C., Polani, C., de Almeida J., y Briggs H. (1959). A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Tumer's Syndrome). *Lancet* 1:711-713.
- Foster, J.W., Dominguez-Steglich, M.A., Guioli, S., Kwok, C., Weller, P.A., Stevanovic, M., Weissenbach, J., Mansour, S., Young, I.D. y col. (1994). Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372: 525-530.
- Fraccaro, M., y Lindsten J. (1960). A child with 49 chromosomes. *Lancet* 2:1303.
- Fraccaro, M., Kaijser, K., y Lindsten, J. (1960). A child with 49 chromosomes. *Lancet* 2:899-902.
- Fraenkel, L. (1905). Vergleichend-histologische untersuchungen über das vorkommen drüsiger formationen im interstitiellen Eierstocksgewebe. *Archiv. f. Gynäk. Bd.* 75.
- Gartler, s., Waxman, S. y Gilgert, E. (1962). An XX/XY human hermaphrodite resulting from double fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48:332-335.
- German, J. y col. (1978). Genetically determined sex-reversal in 46 X,Y humans. *Science* 202:53-56.
- Gessler, M., Poustka, A., Cavenee, W., Neve, R., Orkin, S. y Bruns, G. (1990). Homozygous deletion in Wilm's tumors of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-778.
- Gibbons, R., Wilkie, A., Weatherall, D. y Higgs, D. (1991). A newly defined X-linked mental retardation syndrome associated with thalassaemia. *J. Med. Genet.* 28:729-733.
- Giese, K., Pagel, J., y Grosschedi, R. (1994). Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:3368-3372.
- Girondont, M., Zaborski, P., Servan J., y Pieau C. (1 994). Genetic contribution to sex determination in turtles with envirorunental sex determination. *Genet. Res.* 63:117-127.
- Giuli, G., Shen, W. e Ingraham, H. (1997). The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian Inhibiting Substance in vivo. *Development.* 124:1799-1807.

BIBLIOGRAFÍA

- Glickman, S., Frank, L., Holekamp, K., Smale, L. y Licht, P. (1993) Costs and benefits of androgenization in the female spotted hyena: The natural selección of physiological mechanisms. In: Bateson PPG, Klopfer PH, Thompson NS (eds.), *Perspectives in Ethology: Behaviour and evolution*. New York: Plenum Press. 10:87-117.
- Godet, R. (1950). La différenciation du sexe chez la taupe. *Arch. Anat. Mic. Morf. Exp.* 39:445-451.
- Goldberg, E.H., Boyse, E.A., Bennett, D., Scheid, M., y Carswell, E.A. (1971). Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature* 232:478-480.
- Goldberg, E.H., Shen, F. y Tokuda, S. (1973). Detection of H-Y (male) antigen on mouse lymph node cells by cell to cell cytotoxicity test. *Transplantation* 15:334-336.
- Gorman, M., y Stone, D. (1990). *The natural history of moles*. Comstock publishing associates. Cornell University Press. Ithaca, New York.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P.N. y Lovell-badge, R. (1990). A gene mapping to the sex determining region of the Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.
- Guellaen, G., Casanova, M., Bishop, C., Geldwerth, D., Andrt, G., Fellows, M. y Weissenbach, J. (1984): Human XY males with Y single-copy DNA fragments. *Nature* 307:172-173.
- Hanley, N., Ball, S., Clement-Jones, M., Hagan, D., Strachan, T., Ostrer, H., Parker, K. y Wilson, D. (1999). Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech. Dev.* 87:175-180.
- Hanley, N., Hagan, D., Clement-Jones, M., Ball, S., Strachan, T., Salas-Cortés, L., McElreavy, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H. y Wilson, D. (2000). SRY, SOX-9 and DAX-1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech. Dev.* 91:403-407.
- Haqq, C., King, C., Donahoe, P. y Weiss M. (1993). SRY recognizes conserved DNA sites in sex specific promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1097-1101.
- Harley, V.R., Jackson, D., Hextall, P.J., Hawkins, J.R., Berkovitz, G.S., Sockanathan, S., LovellBadge R. y Goodfellow P.N. (1992). DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255:453-456.
- Harley, V.R., Lovell-Badge, R. y Goodfellow, P.N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nuc. Acids Res.* 22:1500-1501.
- Harrison-Matthews, L. (1935). The estrous cycle and intersexuality in the female mole (*T. europea*). *Proc. Zool. Soc.* 2:347-383.
- Harry, J.L., Koopman, P., Brennan, F.E., Marshal Graves J.A. y Renfree, M.B. (1995). Widespread expression of the testis-determining gene *SRY* in a marsupial. *Nat. Genet.* 1:347-349.
- Hashimoto, N., Kubokawa, R., Yamazaki, K., Noguchi, M. Y Kato Y. (1990) Germ cell deficiency causes testis cord differentiation and reconstituted fetal ovaries. *J. Exp. Zool.* 253:61-70.
- Hawkins, J.R., Taylor, A., Berta, P., Levilleirs, J., Van der Auwera, B. y Goodfellow, P.N. (1992). Nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum. Genet.* 88:471-474.
- Hawkins, J.R. (1993). The SRY gene. *Trends Endocrinol Metab.* 4:328-332.
- Hodking, J. (1992). Genetic sex determination mechanisms and evolution. *BioEssays* 14:253-261.
- Hoo, J., Salafsky, I. y Linn, C. (1989). Possible localisation of a recessive testis forming gene on 9p24. *Am. J. Hum. Genet.* 45:A73.
- Houston, C. y col. (1983). The campomelic síndrome: review, report of 17 cases and follow up on the currently 17-year old boy first reported by Maroteaux y col. in 1971. *Am J. med. Genet.* 58:91-97.
- Hunter, R. (1996) Aetiology of intersexuality in female (XX) pigs, with novel molecular interpretations. *Mol. Reprod. Dev.* 45:392-402.
- Ikeda, Y., Lala, D., Luo, X., Moisa, M. y Parker, K. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8:852-860.
- Ikeda, Y., Shen, W., Ingraham, H. y Parker, K. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8:654-662.
- Ikeda, Y., Swain, A., Weber, T., Hentges, K., Zanaria, E., Lalli, E. y col. (1996). Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiples cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol.* 10:1261-1272.
- Jacobs, P.A. y Strong, J. (1959). A case of human intersexuality having a possible XXY sex determining mechanism. *Nature* 183:302-303.
- Jäger, R.J., Anvret, M., Hall, K. y Scherer, G. (1990). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis determining gene *SRY*. *Nature* 183:302-303.

BIBLIOGRAFÍA

- Jantzen, H.M., Admon, A., Bell S.P. y Tjian, R. (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344:452-454.
- Jeanmaire-Besançon, F. (1985). Etude histologique de l'appareil génitale de *Crocidura russula* (Insectivora: Soricidae). *Rev. Suisse Zool.* 92:659-673.
- Jeske, Y., Mishina, Y., Cohen, D. y Behringer, R. (1996). Analices of the role of Amh and Fra1 in the Sry regulatory pathway. *Mol. Reprod. Dev.* 44:153-158.
- Jiménez, R., Burgos, M. y Díaz de la Guardia, R. (1984) Meiotic behaviour of sex chromosomes and polymeiosis in three species of insectivores. *Genetica.* 65:187-192.
- Jiménez, R., Burgos, M., Caballero, L. y Díaz de la Guardia, R., (1988). Sex reversal in a wild population of *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia). *Genetical Research Cambridge.* 52:135-140.
- Jiménez, R., Burgos, M., Sánchez, A., y Diaz de la Guardia, R. (1990a). The reproductive cycle of *Talpa occidentalis* in the southeastern Iberian Peninsula. *Act. Ther.* 35(1-2):165-169.
- Jiménez, R., Burgos, M., Sánchez, A. y Diaz de la Guardia, R. (1990b). Synaptonemal complex analysis of spermatocytes from *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia). The autosomal synapsis and the substaging of Cygonema and Pachynema. *Cytogenetics and Cell Genetics.* 53:97-102.
- Jiménez, R., Burgos, M., Sánchez, A. y Diaz de la Guardia, R. (1990c). Synaptonemal complex analysis in *Talpa occidentalis* spermatocytes II. Evolution of the X chromosome self-pairing process. *Cytogenetics and Cell Genetics.* 54:35-37.
- Jiménez, R., Burgos, M., Sanchez, A., Sinclair, A., Alarcón, F., Marín, J., Ortega, E. y Diaz de la Guardia, R. (1993). Fertile females of the mole *Talpa occidentalis* are phenotypic intersexes with ovotestes. *Development.* 118:1303-1311.
- Jiménez, R., Sanchez, A., Burgos, M. y Diaz de la Guardia, R. (1996a). Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet.* vol 12 nº5 :164-166.
- Jiménez, R., Alarcón, F., Sánchez A., Burgos, M. y Díaz de la Guardia, R. (1996b). Ovotestis variability in young and adult females of the mole *T. occidentalis* (Insectivora, Mammalia). *J. Exp. Zool.* 274:130-137.
- Jiménez, R., Burgos, M., Sánchez, A. y Díaz de la Guardia, R. (1997) Did Spanish moles really change their mechanism of sex determination in only 5 years? *J. Theor. Biol.* 188:141-142.
- Jiménez, R. y Burgos, M. (1998). Mammalian sex determination: joining pieces of the genetic puzzle. *Bioessay* 20:696-699.
- Jiménez, R., Barrionuevo., F.J. y Burgos, M. (2000). A procedure for preparing amniotic cells for sexing embryos. *Trends in Genetics on line. Technical Tips on line* (<http://research.bmn.com/tto/>)T02062
- Jordan, B., Mohammed, M., Cing, S., Délot, E., Chen, X. y col. (2001). Up-regulation of Wnt-4 signaling and dosage sensitive sex reversal in humans. *Am. J. Genet.* 68:1102-1109.
- Jost, A. (1947) Recherche sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin, III. Rôle des gonades foetales dans la diférentition sexuelle somatique. *Arch. Anat. Microscop. Morph.* 36:271-315.
- Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: The gonadal and the hypophyseal hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* 8:379-418.
- Jost, A., Vigier, B. y Prepin, J. (1972) Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 29:349-79.
- Jost, A., Perchellet, J., Prepin, J. y Vigier, B. (1975). The prenatal development of bovine freemartins. In *Symposium on Intersexuality.* (Ed. R. Reinborn) pp 392-406. Berlin: Springer-Verlag.
- Karl, J. y Capel, B. (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev. Biol.* 203:323-33.
- Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H. y Koopman, P. (1996). A male specific role of SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813-2822.
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. y Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P.N. y Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- Koopman, P. (1999). Sry and Sox-9: mammalian testis-determining genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:839-856.
- Koopman, P. (2001). The genetics and biology of vertebrates sex determination. *Cell.* 105:843-847.
- Korpelainen, H. (1990). Sex ratios and conditions required for environmental sex determination in animals. *Biol. Rev.* 65:147-184.

BIBLIOGRAFÍA

- Kreidberg, J., Sariola, H., Loring, J., Maeda, M., Pelletier, J. y col. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691.
- Kress., A (1984) Ultrastructural studies on oogenesis in the shrew (*Crocidura russula*): I. the prenatal follicle. *J. Morphol.* 179:59-71.
- Lala, D., Rice, D. y Parker, K. (1992). Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expresión, is the mouse homolog of fushi tarazu factor I. *Mol. Endocrinology* 6:1249-1258.
- Lau, Y., YangFeng, T., Elder, B., Fredga, K. y Widberg, U. (1992). Unusual distribution of Zfy and Zfx sequencies on the sex chromosomes of the wood lemming, a species exhibiting XY sex reversal. *Cytogenet. Cell Genet.* 60:48-54.
- Lavorgna, G., Ueda, H., Clos, J. y Wu, C. (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 252:848-851.
- Leutert, T.R. (1974): Zur greschlechtsbestimmuna und gametogenese Yon *Bonellia vividis* Rolando. *J. Embryol. Morphol.* 32:169-193.
- Luo, X., Ikeda, Y. y Parker, K.I. (1994). A cell specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual diffenrentiation. *Cell* 77:481-490.
- Lyet, L., Louis, F., Forest, M., Josso, N., Behringer, R. y Vigier, B. (1995) Ontogeny of reproductive abnormalities induced by deregulation of anti-müllerian hormone expression in transgenic mice. *Biol. Reprod.* 52:444-54.
- MacLeod, J. (1880). Contribution à l'étude de la structure de l'ovarie de mamifère. *Arch. Biol. Paris*, i pp. 241-278.
- Majumdar, K.C., Shetty, S., Wadhwa, R., Bhaskar. S., Ganesan M. y Singh, L. (1996). Detection and purification of sequence-specific DNA binding protein. *Anal. Biochem.* 241:23-29.
- Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Lovell-Badge, R. y Capel B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr. Biol. Dec.* 1;7(12):958-968.
- Matsunga, E. (1981). Genetics of Wilm's tumour. *Hum. Genet.* 57:231-246.
- McElreavy, K. y Fellous, M. (1999). Sex determination and the Y chromosome. *Am. J. Med. Genet.* 89:176-185.
- McLaren, A. (1991). Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. *BioEssays.* 13:151-156.
- McLaren, A. (1995). Germ cells and germ cells sex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 350:229-233.
- McVean, G. y Hurst, L. (1996). Genetic conflicts and the parados of sex determination: three paths to the evolution of female intersexuality in a mammal. *J. Theor. Biol.* 179:199-211.
- Merchant-Larios, H., Moreno Mendoza, N., y Buehr, M. (1993). The role of mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* 37:407-415.
- Merchant-Larios, H. (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* 44:1-21.
- Merchant-Larios, H. (1976). The onset of testicular differentiation in the rat: An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 145:319-330.
- Merchant-Larios, H. y Chimal-Monroy, J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Devel. Ultr. Reprod.* pp. 55-63.
- Merchant-Larios, H. y Taketo, T. (1991). Testicular differentiation in Mammals under normal and experimental conditions. *J. Electron Microsc. Techn.* 19:158-171.
- Merchant-Larios, H., Ruiz-Ramirez, S., Moreno-Mendoza, N. y Marmolejo-Valencia, A. (1997). Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107 :373-85.
- Merchant-Larios, H. y Moreno-Mendoza, N. (1998) Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp. Cell. Res.* 244:230-8.
- Meyers-Wallen, V., Bowman, L., Acland, G., Palmer, V., Schlafer, D. y Fajt, V. (1995). Sry-negative XX sex reversal in the German shorthaired pointer dog. *J. Hered.* 86:369-74.
- Mishina, Y., Rey, R., Finegold, M., Matzuk, M., Josso, N., Kate, R. y Behringer, R. (1996). Genetic analysis of Mullerian inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sex differentiation. *Genes Dev.* 10:2557-2587.
- Molketin, J., Lin, Q., Duncan, S. y Olson, E. (1997). Requierment of the transcriptional factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes & Dev.* 11:1061-1072.
- Moniot, B., Berta, P., Scherer, G., Südbeck, P. y Poulat, F. (2000). Male expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mechanisms of Development.* 91:323-325.
- Moorthy, A., Chesney, R. y Lubinsky, M. (1987). Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Frasier" syndrome - a commentary on reported cases. *Am. J. Med. Genet.* 3:297-302.

BIBLIOGRAFÍA

- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A. y Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet.* 14: 62-68.
- Moreno-Mendoza, N., Herrera-Muñoz, J. y Merchant-Larios, H. (1995). Limb bud mesenchyme permits seminiferous cord formation in the mouse fetal testis but subsequent testosterone output is markedly affected by the sex of the donor stromal tissue. *Dev. Biol.* 169:51-6.
- Müller, R. (1994). The Denys-Drash syndrome. *J. Med. Genet.* 31:471-477.
- Münsterberg, A. y Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female differentiation. *Development* 113: 613-624.
- Muscatelli, F., Walker, A., De Plaen, E., Stafford, A. y Monaco, A. (1995). Isolation and characterization of MAGE gene family in the Xp 21.3 region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4987-4991
- Nachtigal, M., Hirokawa, D., Enyeart-VanHouten, D., Flanagan, J., Hammer, G. e Ingraham, H. (1998). Wilm's tumor and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex sex-specific gene expression. *Cell* 93:445-454.
- Novacek, M., Wiss, A. y McKenna, M. (1988) The major groups of eutherian mammals. In: *The phylogeny and classification of tetrapods, Vol2: Mammals, special vol. N° 35B.* M.J. Benton (de.) (Clarendon Press Oxford: Systematics Association), pp 31-71.
- Ohno, S. (1977). The original function of MHC antigens as the general plasma membrane anchorage site of organogenesis-directing proteins. *Inmunol. Rev.* 33:56-69.
- Ornitz, D. e Itoh, N. (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biology.* 2:3005.1-3005.12.
- Page, D.C., Brown, L.G. y de la Chapelle A. (1987a). Exchange of terminal portion of X-Y chromosomal short arm in human XX males. *Nature* 328:437-440.
- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E.M, Fisher, E.M.C., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., de la Chapelle A. y Brown, L.G. (1987b) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104.
- Page, D., Fisher, E., McGillivray, B. y Brown, L. (1990). Additional deletion in sex determining region of the human Y chromosome resolves paradox of X,t(Y;22) female. *Nature* 346:279-281.
- Palmer, M.S., Sinclair, A.H., Berta, P., Ellis, N.A., Goodfellow, P.N., Abbas, N.E. y Fellows, M. (1989). Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342:937-939.
- Palmer, J. y Burgoyne, P. (1991a). *In situ* analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY.
- Palmer, J. y Burgoyne, P. (1991b). XY follicle cells in the ovaries of XO/XY and XO/XY/XYY mosaic mice.
- Parker, K. (1998). The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 140:59-63
- Parma, P., Pailhoux, E., Puissant, C. y Cotinot, C. (1997). Porcine Dax-1 gene: isolation and expression during gonadal development. *Mol. Cel. Endocrinol.* 135:49-58.
- Payen, E., Pailhoux, E., Merhi, R.A., Gianquinto, L., Kirszenbaum, M., Locatelli, A. y Cotinot, C. (1996). Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 40:567-575.
- Pearson, W. y Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Nat. Acad. Science.* 85:2444-2448.
- Pearson, W. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods in Enzymology.* 183:63-98.
- Pesce, M., Gross, M. y Schöler, H. (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *BioEssays.* 20:722-732.
- Peyre, A. (1962). Recherches sur l'intersexualité spécifique chez *Galemys pyrenaicus*, G. (Mammifères Insectivore). *Arch. Biol.* 73:1-174.
- Pinkerton, J., McKay, D., Adams, E. Y Hertig, A. (1961) Development of the human ovary-A Study using histochemical techniques. *Obst. Gynecology.* 18:152-181.
- Pollock, R. y Treisman R. (1990). A sensitive method for the determination of protein-DNA bindingspecificities. *Nucleic Acids Res.* IS:6197-6204.
- Popov, N. (1911). Le tissue interstitiel et les corps jaunes de l'ovarie. *Arch. Biol. Paris.* XXVI. pp. 483-556.
- Prépin J. e Hida, N. (1989). Influence of age and médium on the formation of epithelial cords in the rat fetal ovary *in vitro.* *J. Reprod. Fertil.* 87:375-382.

BIBLIOGRAFÍA

- Raymond, C., Parker, E., Kettlewell, J., Brown, J., Page, D., Kusz, K., Jaruzetka, J., Reinbeg, Y., Flejte, W., Bardwell, V., Hirsch, B., y Zarkower, D. (1999) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to know sexual regulator. *Hum. Mol. Genet.* 8:989-996.
- Reddy, J. y Licht, J. (1996). The WT-1 Wilm's tumor supresor gen: How do we really Know. *Biochem. Biophys. Act.* 1287:1-28.
- Riccardi, V., Sujansky, E., Smith, A. y Franke, U. (1978). Chromosomal imbalance in the aniridia Wilm's tumour association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61:604-610.
- Rice, D., Mouw, A., Bogerd, A. y Parker, K. (1991). A shared promoter element regulates the expresión of three steroidogenic enzymes. *Mol. Endocrinol.* 5:1552-1561.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., y Solignac, M. (1992): *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc. P. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 250:91-98.
- Russell, L.B. y Chu, E.H.Y. (1961). An XXY male in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47:571-575.
- Russell, W.L., Russell, L.B., y Gower, J.S. (1959). Exceptional inheritance of a sex-linked gene in the mouse explained on the basis that the X/0 sex-chromosome constitution is female. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 45:554-560.
- Rychlik, W. (1989). OLIGO 4. I TM. National Biosciences, Inc. Plymouth, U.S.A.
- Rychlik, W. y Rhoads, R.E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 17:8543-8551.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.
- Sánchez, A., Bullejos, M., Burgos, M., Hera, C., Jiménez, R., and Diaz de la Guardia, R. (1996). High secuencia identity between the SRY HMG box from humans and insectivores. *Mammalian Genome.* 7:536-538.
- Satoh, M. (1985). The histogenesis of the gonad in rat embryos. *J. Anat.* 143 :17-37.
- Schneider-Gadicke, A., Beer-Romero, P., Brown, L.G., Nussbaum, R. y Page D.C. (1989). *ZFX* has a gene structure similar to *ZFY*, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell* 57:1247-1258.
- Shapiro, D.Y. (1990). Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. *J. Exp. Zool. (Sup.)* 4S: 132-136.
- Shawlot, W. y Behringer, R., (1995). Requirement for *Lim1* in head-organizer function. *Nature* 374:-425-430.
- Short, R., Smith, J., Mann, T., Evans, E., Hallett, J., Fryer, A. y Hamerton, J. (1969) Cytogenetic and endocrine studies of a freemartin heifer and its bull co-twin. *Cytogenetics.* 8:369-88.
- Simpson, J. (1976). *Disorders of sexual differentiation.* Academic Press, New York.
- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.M., Lovell-Badge, R. y Goodfellow, P.N. (1990). A gene from the human determining region encodes a protein with homology to a conserved Dna-binding motif. *Nature* 364:240-244.
- Smith, C.A., Clifford, V., Western, P.S., Wilcox, S.A., Bell, K.S. y Sinclair, A.H. (2000). Cloning and expression of a *DAX1* homologue in the chicken embryo. *J. Mol. Endocrinol.* 24(1):23-32.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva., G. y McMahon, A. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated *Wnt-4*. *Nature* 372:679-683.
- Sterba, O. (1977). Prenatal development of central european insectivores. *Folia Zoologica* 26(1):27-44.
- Stern, H., Garrity, A., Saal, H., Wangsa, D. y Disteche, C. (1990). Duplication Xp21 and sex reversal: Insight into the mechanism of sex determination. *Am. J. Hum. Genet.* 47,suppl,A41
- Stevens, N. (1905) *Studies in spermatogenesis with special reference to the accessory chromosome.* Carnegie Inst. Washintong Rep. 36.
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G. y Lovell-Badge, R. (1998). *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.
- Swain, A. y Lovell-Badge, R. (1999). Mammalian sex determination, a molecular drama. *Genes Develop.* 13:755-767.
- Taketo., T., Merchan-Larios, H., Thau, R. y Koide, S. (1985) Testicular cell differentiation in fetal mouse ovaries following transplantation into adult male mice. *J. Exp. Zool.* 236: 229-237.
- Taketo., T. y Merchan-Larios, H. (1986) Gonadal sex reversal of fetal mouse ovaries following transplantation into adult mice. *Prog. Clin. Biol. Res.* 217A :171-174.

BIBLIOGRAFÍA

- Tilmann, C. y Capel, B. (1999). Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in mammalian gonad Development. 126:2883-2890.
- Tommerup, N., Schempp, W., Mienecke, P., Pedersen, S., Bolund, L., Brandt, C. y col. (1993). Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. Nature Genet. 4: 170-174.
- Tourneux, F. (1904). Hermaphrodisme de la glande génitale chez la taupe adulte et localisation des cellules interstitielles dans le segment spermatique. Bibl. Anat. Suppl.
- Tran, D. y Josso, N. (1982). Localisation of anti-Müllerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine Sertoli cells using immunocytochemistry with a monoclonal antibody. Lancet 336:809-810.
- Tucker, P.K. y Lundrigan, B.L. (1993). Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. Nature 364:715-717.
- Upadhyay, S., Luciani, J. y Zamboni, L. (1979) The role of mesonephros in the development of indifferent gonads and ovaries of the mouse. Am. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 19:1179-1196.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N. y McMahon, A. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. Nature 397:405-497.
- Van Niekerk, W. y Retief, A. (1981). The gonads of true hermaphrodites. Hum. Genet. 58:117-122.
- Veitia, R., Salas-Cortés, L., Ottolenghi, C., Pailhoux, E., Cotinot, C. y Fellous, M. (2001) Testis determination in mammals: more questions than answers. Mol. Cell. Endocrinol. 179:3-16.
- Vidal, V., Chaboissier, M., de Rooij, D. y Schedl, A. (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. Nat. Genet. 28:216-7.
- Viger, R., Mertineit, C., Trasler, J. y Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian Inhibiting substance promoter. Development. 125:2665-2675.
- Vigier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D. y Josso, N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. Development. 100:43-55.
- Vogel, P., Jainta, S., Geerkens, C., Baumstark, A., Correa-Cerro, L., Ebenhoch, C. y Just, W. (1998). Sex determination in *Ellobius Lutescens*: the story of an enigma. Cytogenet. Cell Genet. 80:214-221.
- Wachtel, S., Ohno, S., Koo, G.C. y Boyse, E.A. (1975). Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. Nature 257:235-236.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F.J., Keutel, J. y Hustert, E. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene *SOX9*. Cell 79:1111-1120.
- Wartenberg, H. (1978). Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. Andrologia. 10:1-21.
- Wartenberg, H. (1982). Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. Anat. Embryol. 165:253-80.
- Welshons, W.J. y Russell L.B (1959). The Y chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 45:560-566.
- Whitfield, L.S., Lovell-Badge, R. y Googfellow, P.N. (1993). Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene *SRY*. Nature 364:713-715.
- Whitworth, D., Shaw, G. y Renfree, M. (1996). Gonadal sex reversal of the developing marsupial ovary *in vivo* and *in vitro*. Development 122:4507-4063.
- Whitworth, D. (1998) XX germ cells: the difference between an ovary and a testis. TEM 9:2-6.
- Whitworth, D., Licht, P., Racey, P. y Glickman, E. (1999) Testis like steroidogenesis in the ootestis of the European mole, *Talpa europaea*. Biol. Reprod. 60:413-418.
- Wilker, C., Meyers-Wallen, V., Schlafer, D., Dykes, N., Kovacs, A. y Ball, B. (1994) XX sex reversal in a llama. J. Am. Vet. Med. Assoc. 201:112-115.
- Witschi, E. (1951). Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. Recent. Prog. Horm. Res. 6:1-27.
- Wood-Jones, F. (1914). Some phases in the reproductive history of the female mole (*Talpa europaea*). Proc. Zool. Soc. Lond. pp. 191-216.
- Zamboni, L. y Upadhyay, S. (1982) The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. Am. J. Anat. 165:339-56.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A. y col. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. Nature 372:635-641.
- Zazopoulos, E., Lalli, E., Stocco, D.M. y Sassone-Corsi, P. (1997). DNA-binding and transcriptional repression by

BIBLIOGRAFÍA

DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390:311-315.

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

Zwingman, T., Fujiinoto, H., Lai, L.W., Boyer, T., Ao, A.,
Stalvey, J.R.D., Blecher, S. y Erickson R.P. (1995).
Transcription of circular and non circular forms of *Sry*
in mouse testes. *Mol. Reprod. Dev.* 37:370-381.