

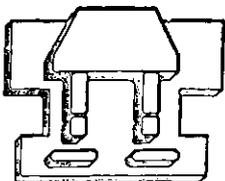


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

Apoptosis en el desarrollo y regresión de los conductos de
Wolff y Müller durante la diferenciación sexual del ratón.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA
P R E S E N T A :
Nayelli Nájera García



293757

Tlalnepantla, Estado de México

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biología
Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

DEDICATORIAS:

A mis papás Sara García y Julio Nájera por todo el apoyo que me han brindado y que me ha permitido llegar hasta donde ahora estoy.

A mis hermanitas Karina y Zenyese por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas

A ocelopan (Eduardo Nuñez)

Por todo el apoyo dado en la
parte final de este trabajo

Por toda una historia

Por el escalofrío celular

A la sci que me permitió conocerte

A mis amigas: **Rosy, Martita y Angie** que compartieron conmigo excelentes momentos durante la carrera.

A **Hugo, Fer y Horacio** por su singular alegría y amistad.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios por permitirme realizar mi tesis en su laboratorio y poder aprender de su línea de investigación.

Al M. en C. Martín Martínez Torres por abrirme la puertas de su laboratorio, por las constantes revisiones y excelentes sugerencias hechas a este escrito, por la asesoría en la parte de estadística y sobre todo por su amistad.

A José Baltazar por todo su apoyo técnico, ya que gracias a él fue posible realizar la parte de microscopía electrónica. Agradezco también su infinita paciencia y disposición para ayudarme cuando lo necesite.

A Alejandro Marmolejo y Leda Torres por su amistad, por su valiosa ayuda para aprender el trabajo de laboratorio y por compartir conmigo sus conocimientos sobre el área.

A Rosa María Viguera por su contagiosa alegría y buen humor; porque su laboratorio siempre estuvo abierto para mi. Gracias.

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION	
Determinación sexual.....	2
Diferenciación sexual primaria.....	3
Diferenciación sexual secundaria.....	6
Regresión de los conductos genitales.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL Y METODO.....	16
RESULTADOS	
Conducto de Müller de hembra.....	19
Conducto de Wolff de hembra.....	20
Conducto de Müller de macho.....	26
Conducto de Wolff de macho.....	27
DISCUSION.....	39
Dirección de la regresión.....	42
CONCLUSIONES.....	44
LITERATURA CITADA.....	45

INDICE DE FIGURAS

		página
Figura 1	Diferenciación de los genitales en mamíferos.....	10
Figura 2	Mesonefros y los conductos sexuales.....	17
Figura 3	Cambios morfológicos de las células apoptóticas.....	18
Figura 4	Cortes transversales del mesonefros de hembra.....	23
Figura 5	Gráficas de los diámetros del conducto de Müller de hembra en la región cefálica.....	24
Figura 6	Gráficas de los diámetros del conducto de Müller de hembra en la región caudal.....	24
Figura 7	Gráficas de los diámetros del conducto de Wolff de hembra en la región cefálica.....	25
Figura 8	Gráficas de los diámetros del conducto de Müller de hembra en la región caudal.....	25
Figura 9	Cortes transversales de la región cefálica del mesonefros de macho.....	29
Figura 10	Gráficas de los diámetros del conducto de Müller de hembra en la región cefálica.....	30
Figura 11	Gráficas de los diámetros del conducto de Müller de macho en la región caudal.....	30
Figura 12	Gráficas de los diámetros del conducto de Wolff de macho en la región cefálica.....	31
Figura 13	Gráficas de los diámetros del conducto de Wolff de macho en la región caudal.....	31
Figura 14	Micrografía del conducto de Wolff de hembra de 14 <i>dpc</i> con características de apoptosis.....	32
Figura 15	Amplificación del conducto de Wolff de hembra de 14 <i>dpc</i>	33
Figura 16	Micrografía de la presencia simultánea de apoptosis y mitosis en el conducto de Müller de hembra de 14 <i>dpc</i>	33

Figura 17	Micrografía del conducto de Müller de macho de 14 <i>dpc</i>	34
Figura 18	Micrografía de los contactos celulares del conducto de Müller de macho de 14 <i>dpc</i> con el mesénquima periductal.....	35
Figura 19	Micrografía del contacto de un fagocito con el conducto de Wolff de hembra de 15 <i>dpc</i>	35
Figura 20	Micrografía de los contactos celulares del conducto de Müller de macho de 15 <i>dpc</i> con el mesénquima.....	36
Figura 21 A	Micrografía del conducto de Müller de macho de 15 <i>dpc</i> mostrando los dos mecanismos de remoción de células apoptóticas.....	37
Figura 21 B	Amplificación de un cuerpo apoptótico dentro del conducto de Müller de macho de 15 <i>dpc</i>	37
Figura 22	Micrografía del conducto de Wolff de macho de 15 <i>dpc</i>	38

RESUMEN:

Durante la diferenciación sexual, la gónada indiferenciada se encuentra asociada con el mesonefros. En éste órgano se localizan el conducto de Wolff (cW) y el de Müller (cM). En el macho, la Sustancia Inhibidora de Müller induce la regresión de los cM y la testosterona la diferenciación de los cW en epidídimo, conductos deferente y vesícula seminal. En la hembra, los cM se desarrollan en oviductos, útero, cervix y el tercio superior de la vagina mientras que los cW degeneran. Durante la regresión ductal se ha descrito autofagia, heterofagia, aumento en el número de lisosomas e infiltración de macrófagos lo que sugiere que la apoptosis juega un papel importante durante la regresión de los conductos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue aportar evidencias de que la apoptosis participa durante la regresión de los conductos en el ratón. Se obtuvieron complejos urogenitales de embriones de ratón CD-1 de 12.5 a 15.5 *días post coito* (*dpc*) se fijaron y procesaron para su inclusión en Epon 812. Se realizaron cortes seriados semifinos y finos de las regiones cefálica y caudal. Y se hicieron mediciones de los diámetros mayor y menor de cada conducto mediante el programa Metamorph Imaging System. Se encontró que a los 12 *dpc* es frecuente encontrar células mitóticas, mientras que en el siguiente día es más frecuente observar células apoptóticas en los dos conductos en ambos sexos. A nivel de microscopía electrónica, algunas células epiteliales presentan núcleos picnóticos, fagosomas y células fagocíticas invadiendo el epitelio ductal después de atravesar la membrana basal. Aunque no todas las células epiteliales presentan las características antes mencionadas, es evidente una disminución en el tamaño del conducto y en el número de células que lo conforman. No se encontraron diferencias importantes entre los diámetros obtenidos en la región cefálica con respecto a la región caudal. Basándose en estas observaciones podemos sugerir que el proceso de apoptosis se lleva a cabo durante la regresión de los cW y los cM y que también está presente durante la diferenciación de los mismos como un evento de control de la morfogénesis hacia los genitales internos de cada sexo. También se apoya la propuesta de que la regresión ductal se lleva a cabo de manera homogénea a lo largo de todo el conducto y no en dirección cefalo - caudal como otros autores han propuesto.

INTRODUCCIÓN

1. Determinación sexual

Se le llama determinación sexual al evento que determina el sexo genético del embrión mientras que la diferenciación sexual es la cascada programada de eventos morfológicos y moleculares que dirigen la diferenciación de la gónada indiferencia hacia ovario o hacia testículo.

El sexo en el embrión de mamífero queda establecido en el momento de la fertilización debido a la existencia de cromosomas sexuales, donde las hembras son XX y los machos son XY. Sin embargo se observó que independientemente del número de cromosomas X pero con la presencia del cromosoma Y el resultado es el desarrollo de un macho (Ford, 1959). Estas observaciones permitieron establecer que la presencia del cromosoma Y es necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación testicular y hace evidente que en este cromosoma se encuentran el (los) factor (es) o gen (es) necesario (s) para la diferenciación testicular. Mas tarde este factor se denominó TDF (de sus siglas en inglés: Testis-Determining Factor) en humanos y Tdy (de sus siglas en inglés: Testis -determining gen on the Y) en el ratón.

Posteriormente se observó que individuos que presentan el brazo corto del cromosoma Y pero no el brazo largo se diferencian como machos mientras que los individuos que presentan en brazo largo pero no el corto se diferencian como hembras, estas observaciones permitieron establecer que el TDF se localiza en el brazo corto del cromosoma Y.

Mas adelante, se localizó una región de 35 Kb dentro del brazo corto del cromosoma Y que contenía el TDF, este gen se denominó SRY (Sex determining Region, Y chromosome) en humanos y Sry en ratón, este gen presentaba todas las propiedades esperadas para el TDF (Sinclair *et al.* 1990).

La prueba de que el Sry corresponde al Tdy se realizó en ratones transgénicos donde individuos XX que portaban el Sry se desarrollan como machos y ratones XY que carecían de Sry se

desarrollaron como hembras (Koopman *et al.* , 1990) Estos experimentos demostraron que el Sry es necesario para que se lleve a cabo la diferenciación testicular y que por lo tanto este gen correspondía al Tdy.

El gen Sry se expresa en las células somáticas de la cresta urogenital del macho a partir de los 10.5, disminuyendo su expresión a los 12.0 *dpc* que es cuando aparecen los primeros signos histológicos de la diferenciación testicular y se apaga a los 12.5 *dpc* (Hacker *et al.* , 1995).

2. Diferenciación sexual primaria.

La diferenciación sexual primaria se refiere a la diferenciación de la gónada hacia ovario o testículo, dicha gónada emerge de un tejido precursor inicialmente común tanto en las hembras como en los machos: la gónada indiferenciada. Este precursor aparece como una angosta banda de tejido a lo largo del mesonefros, localizado en el mesenterio dorsal del embrión y que tiene el potencial para desarrollarse como ovario o testículo (Capel and Lovell-Badge, 1993). La gónada indiferenciada (también llamada cresta genital) y el mesonefros son llamados en conjunto cresta urogenital, este primordio puede identificarse en el ratón a partir de los 10.5 *dpc*.

La gónada indiferenciada presenta dos diferentes linajes celulares durante su desarrollo, las células germinales y las células somáticas. Las células precursoras de las células germinales se denominan células germinales primordiales (CGPs) que son de origen extragonadal (Merchant-Larios, 1975). Las CGPs del ratón derivan del ectodermo embrionario y se han detectado posteriormente en el endodermo del saco vitelino y el mesodermo del alantoides, luego migran a través del intestino posterior y el mesenterio dorsal entre los días 10 y 12 hasta colonizar las crestas genitales (Ginsburg *et al.* , 1990). En el testículo fetal, las células germinales se desarrollan hacia proespermatozonias y se mantienen en un estado de reposo mitótico alrededor de los 13.5 *dpc*, mientras que en el ovario de la misma edad, las células germinales inician la meiosis y forman ovocitos (McLaren, 1988).

Dentro de los componentes somáticos de la gónada encontramos las células de soporte, las células productoras de esteroides y las células de tejido conectivo. Las células de soporte se diferencian en células de Sertoli en el testículo y en células de la granulosa en el ovario; las células productoras de esteroides se desarrollan hacia células de Leydig en el testículo y células de la teca en el ovario y las células de tejido conectivo que incluye las células mioideas y endoteliales, éstas últimas forman los vasos sanguíneos que son necesarios para el transporte de la testosterona a los tejidos blanco (McLaren, 1988).

El origen de las células somáticas de la gónada fue atribuido a dos principales fuentes: el epitelio celómico y el mesonefros (Satoh, 1991). En el conejo, células del epitelio celómico parecen combinarse con células mesonefricas para formar un blastema mixto de donde se diferencian las células de Sertoli y las foliculares (Wartenberg *et al.*, 1991). En algunas especies donde la maduración de la gónada es lenta, como en el caso del humano, la mayoría de las células somáticas de la gónada se derivan a partir del mesonefros adyacente (Satoh, 1991).

Merchant-Larios *et al.* (1993) demostraron *in vitro* la activa participación del mesonefros en la formación de los cordones seminíferos del testículo de ratón y que células tipo mioide y endoteliales provenientes del mesonefros penetran hacia el testículo. También demostraron que la diferenciación de las células de Sertoli y Leydig se lleva a cabo aún en ausencia del mesonefros.

La diferenciación de la gónada en rata y ratón comienza con la condensación de las células somáticas de tipo epitelial (células pre-Sertoli o pre-foliculares) y la deposición de los componentes de la lámina basal alrededor de ellas. Este arreglo ocurre en gónadas de hembras y machos logrando la formación de cordones gonadales (también llamados cordones sexuales), dentro de los cuales se localizan las células germinales (Merchant-Larios and Taketo, 1991; Smith and MacKay, 1991).

En los embriones de ratón que genéticamente son machos, expresan el gen determinante de testículo (Sry) entre los 10.5 y 12.5 *dpc* y es justo en el día 12.5 que comienzan a observarse

diferencias morfológicas en la gónada de macho al compararse con un ovario de la misma edad (Koopman, 1990).

En la gónada de macho se establecen diferencias fisiológicas cuando las células de pre-Sertoli se diferencian (12.5 *dpc*) y comienzan a secretar la Sustancia Inhibidora de Müller (MIS) cuya principal función es la causar la regresión de los conductos mullerianos del macho (Münsterberg and Lovell-Badge, 1991).

La expresión de MIS se apaga entre 2 y 3 semanas después del nacimiento lo que coincide con la diferenciación terminal de las células de Sertoli y la presencia de las primeras espermatogoniass que entran en meiosis. El sitio y los niveles de expresión de MIS son muy importantes ya que en el desarrollo temprano los altos niveles de esta hormona parecen ser tóxicos para las células germinales en meiosis (Münsterberg and Lovell-Badge, 1991).

Durante la diferenciación de las células de Sertoli, las células mesonéfricas migran hacia la gónada aumentando el número de células del compartimento estromático y por contribución de células endoteliales (vasos sanguíneos) y mioides se provoca la separación de los cordones testiculares del epitelio celómico (Merchant-Larios *et al.* , 1993; Nordqvist, 1995). Como resultado, el testículo difiere del ovario de 12.5 *dpc* por su alta vascularización.

A partir del estroma testicular de 14 *dpc* se diferencian las células de Leydig que sintetizan y secretan testosterona, la cual induce el desarrollo de los conductos de Wolff hacia los genitales internos del macho. La testosterona es convertida, por la enzima 5 α -reductasa en 5 α -dihidrotestosterona, un andrógeno especialmente importante para los cambios morfológicos del seno urogenital hacia los genitales externos masculinos (Bardin and Catterall, 1981).

Por otro lado, en el ovario de ratón de 12.5 *dpc* no se observan diferencias morfológicas y se mantiene histológicamente similar a la gónada indiferenciada y sólo es posible observar un

aumento en el número de células somáticas y germinales así como del estroma y de vasos sanguíneos, constituyendo el estroma ovárico.

El primer indicador de la diferenciación del ovario es que las células germinales inician la profase de la primera división meiótica alrededor de los 13.5 *dpc*. Las células epiteliales que rodean a los ovocitos comienzan a separarlos formando los primeros folículos cerca del nacimiento (Merchant-Larios and Chimal-Monroy, 1989; Merchant Larios, 1991).

3. Diferenciación sexual secundaria

En la cresta urogenital, la gónada indiferenciada, sin importar el sexo genético, está acompañada por dos pares de conductos sexuales o genitales: los conductos paramesonéfricos o de Müller y los conductos mesonéfricos o de Wolff, los cuales se diferencian en los genitales internos de hembra y macho respectivamente.

Los conductos de Wolff se desarrollan alrededor del día 24 de gestación del humano, surgen a partir del mesénquima paravertebral como cordones sólidos de células que circulan por el interior del mesonefros y que posteriormente abren hacia la cloaca donde sirven como el principal conducto excretor del embrión (Wilson *et al.* , 1981; Lawrence *et al.* , 1992).

Los conductos de Müller están externos al mesonefros y siguen un recorrido paralelo al de los conductos de Wolff, luego los cruzan hasta unirse ambos conductos de Müller (Wilson *et al.* , 1981). Estos conductos surgen por invaginación de la superficie del epitelio celómico lateral, probablemente inducido por el conducto de Wolff (Didier, 1971; Paranko *et al.* 1985; 1986) creciendo en dirección craneal - caudal (Byskov and Hoyer, 1988; Tsuji *et al.* 1992, Wibbels *et al.* , 1999).

En el embrión sexualmente indiferenciado existe una abertura común para los conductos genitales y el tracto urinario hacia afuera denominado seno urogenital, el cual está localizado en la pared abdominal. El desarrollo y destino de los conductos genitales así como del seno urogenital dependen del tipo de gónada que se diferencie, en el macho los conductos de Wolff persisten y los de Müller degeneran mientras que en la hembra los conductos de Müller permanecen y los de Wolff degeneran (Wilson *et al.* , 1981).

El mecanismo fundamental de la diferenciación sexual fue establecido por Alfred Jost en 1947 y 1953. Estableció que embriones castrados de conejo antes de la diferenciación de la gónada, desarrollan los conductos de Müller y degeneran los conductos de Wolff dando un fenotipo femenino sin importar el genotipo del embrión. Esas observaciones le permitieron establecer que la presencia del ovario o la ausencia de gónada permiten el desarrollo de los caracteres femeninos y que la presencia del testículo fetal es importante para el desarrollo del fenotipo sexual masculino. Una segunda serie de experimentos demostró que cuando un cristal sintético de andrógenos es introducido en la cavidad abdominal de un embrión macho castrado se estimula el desarrollo de las estructuras masculinas pero no se inhibe el desarrollo de los conductos mullerianos. Estos dos experimentos demostraron la existencia de una hormona producida por el testículo fetal, diferente a la testosterona, causante de la regresión de los conductos mullerianos, actualmente conocida como Hormona Anti-Mülleriana (AMH) (Jost, 1947; 1953).

A partir de las observaciones realizadas por Jost, se establecieron las diferencias hormonales de los sexos y con ello la diferenciación sexual de los genitales internos y externos. En el macho, el proceso de regresión o estabilización de tracto reproductor es controlado por hormonas producidas por el testículo embrionario. La presencia de testosterona, producida por las células de Leydig, estabilizan los conductos wolffianos mientras AMH es secretada por las células de Sertoli (Tran and Josso, 1982) e inducen la regresión de los conductos mullerianos que son sensibles a AMH solo durante un periodo limitado de tiempo después de la diferenciación gonadal. La exposición de los conductos a esta hormona antes o después del periodo crítico no es efectiva (Byskov and Hoyer. 1988).

La parte craneal de cada conducto de Wolff está conectada, en el macho, al testículo y origina el epidídimo. la porción central se desarrolla como una gruesa capa muscular que origina el vaso deferente y la porción terminal o caudal forma el conducto eyaculatorio y la vesícula seminal (Wilson *et al.* . 1981; Byskov and Hoyer, 1988). Algunos túbulos mesonéfricos craneales que están conectados a la red de testis, son retenidos como conductos eferentes del epidídimo. Durante la diferenciación del epidídimo, el conducto de Wolff crece en longitud y se pliega, posteriormente es rodeado por células mesenquimáticas que se diferencian como una delgada capa de células musculares lisas (Byskov and Hoyer 1988). Simultáneamente, la glándula prostática se origina de la yema endodermal en la línea de la uretra primitiva (Wilson *et al.* , 1981).

El desarrollo de los genitales externos también está determinado por la presencia o ausencia del testículo y por los receptores para andrógenos. Además, la presencia de la enzima 5 α -reductasa en el seno urogenital provoca la biotransformación de la testosterona a dihidrotestosterona, causante de los cambios morfológicos hacia los genitales externos del macho. Así, el desarrollo del pene y del escroto comienza poco después de la virilización del conducto wolffiano. El pliegue genital se alarga y fusiona para formar el pene y la uretra. Como consecuencia de la fusión de las tumefacciones urogenitales en cada uno de los sitios del orificio uretral se forma un escroto bilobular que sirve como receptáculo para los testículos en el momento de descender. Hacia el termino del desarrollo de macho, se da el descenso testicular y el crecimiento de los genitales (Wilson *et al.* , 1981).

En la hembra a consecuencia de la falta de andrógenos ocurre la regresión del conducto de Wolff poco después de la diferenciación ovárica. Sin embargo, antes de que la degeneración del conducto sea completada, este da origen a brote o yema uretérica y contribuye a la formación de la vejiga y la uretra (Byskov and Hoyer, 1988). La ausencia de AMH en la hembra, permite que el conductos de Müller se desarrollen. La región cefálica de estos conductos origina los oviductos, la parte media de ambos conductos puede fusionarse para formar el canal uterovaginal que es el primordio de un cuerpo uterino simple y del cervix o pueden no fusionarse y mantenerse

separados para formar úteros pareados. La región caudal contribuye a la parte superior de la vagina. (Wilson *et al.* , 1981; Byskov and Hoyer, 1988; Lawrence *et al.* , 1992). El tubérculo genital formará el clítoris, las tumefacciones originaran los labios mayores y el pliegue genital a los labios menores (Wilson *et al.* , 1981)

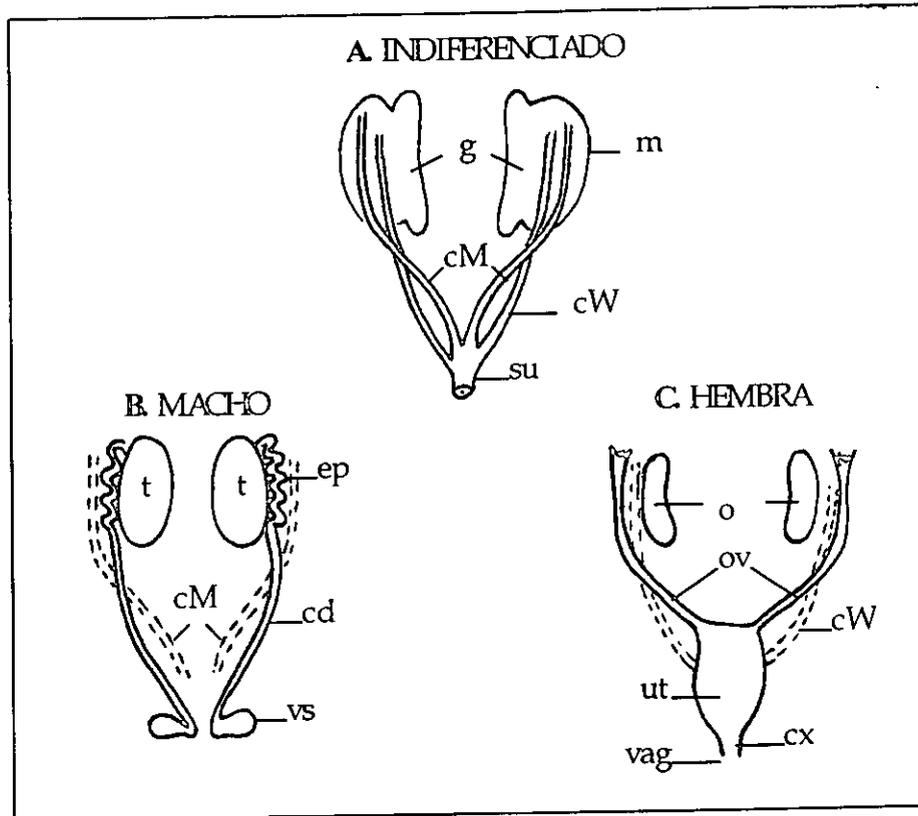


Fig. 1. Diferenciación de los genitales internos de mamíferos.

A. Complejo urogenital sexualmente indiferenciado donde se observan las gónadas (g), los conductos de Wolff (cW) y los conductos de Müller (cM) embebidos en el mesonefros (m) así como el seno urogenital (su). **B.** Diferenciación del complejo urogenital en el macho donde se encuentran los testículos (t) y los derivados de los cW: epidídimo (ep), conducto deferente (cd) y vesícula seminal (vs) y el cM en regresión (---). **C.** Diferenciación del complejo urogenital en la hembra donde se observan los ovarios (ov) y los derivados de los cM: oviductos (ov), útero (ut), cervix (cx) y tercio superior de la vagina (vag) y el cW en regresión (---).

4. Regresión de los conductos genitales

El proceso de regresión o estabilización de los conductos genitales es controlado por las hormonas producidas por la gónada. En el testículo se sintetizan testosterona responsable de la estabilización de los conductos de Wolff mientras que la MIS causa la regresión del conducto de Müller (Jost, 1953; Josso *et al.* , 1977). En las hembras la ausencia de andrógenos provoca la regresión de los conductos de Wolff y la ausencia de MIS la permanencia de los conductos de Müller. Las diferencias en la dependencia hormonal de los dos sistemas de conductos genitales hace pensar que el (los) mecanismo(s) de regresión ductal también difiere (n).

En las hembras durante la regresión del conducto de Wolff se ha observado que existe una acumulación de células mesenquimáticas alrededor de este conducto, al mismo tiempo. la capa continua de fibronectina que lo rodea presenta degradación e interrupciones. Estas observaciones sugieren que el mesénquima juega un papel importante durante la regresión de los conductos wolffianos siendo responsables del decremento en la síntesis y/o deposición de fibronectina alrededor del conducto y que pueden ser inducidas de forma primaria durante la regresión del conducto de Wolff. Esto implica que las células mesenquimáticas dependen de un suministro continuo de testosterona para mantener su nivel original de síntesis y secreción de fibronectina por lo que en ausencia de testosterona y la desaparición de fibronectina asociada con la membrana basal, daría como resultado la involución del epitelio ductal y su membrana basal (Paranko *et al.*, 1984). También se ha reportado autofagia, heterofagia y degeneración *in situ* como eventos importantes durante la involución del conducto wolffiano de ratas hembras (Dyche, 1979).

Por otro lado, estudios previos hechos en rata demuestran que la degeneración de los conductos de Müller inicia en el extremo cefálico y sigue en dirección caudal tanto en observaciones hechas tanto *in vivo* como *in vitro* (Josso *et. al.* , 1977; Tsuji *et al.* , 1992), lo mismo sucede durante la regresión del cM derecho de pollos hembras, mientras que en los pollos (Forberg and Olivecrona 1963) y caimanes (Austin 1989) machos la regresión procede en dirección caudo-craneal.

El mecanismo de regresión de estos conductos ha sido objeto de diversos estudios, los cuales indican que el proceso de regresión está asociado con un incremento en enzimas hidrolíticas (Shieb, 1963), la aparición de lisosomas en las células ductales, la infiltración de macrófagos en el epitelio (Price *et al.*, 1977) y la presencia de grandes inclusiones en las células epiteliales, probablemente como signos de autofagia y heterofagia (Paranko *et al.*, 1984). En base a estas observaciones surgió la hipótesis de que la muerte celular programada llamada actualmente apoptosis, juega un papel importante en la regresión del conducto de Müller *in vivo* (Price *et al.*, 1977) e *in vitro* (Price *et al.*, 1979).

Dyche (1979) observó autofagia y heterofagia en la regresión de los conductos, pero observó que dicha actividad fagocítica también estaba presente en el conducto que no degenera sugiriendo así, que esta actividad es similar tanto en conductos en regresión como en los que se desarrollan y diferencian (Dyche, 1979; Trelstad, 1982).

Roberts *et al.* (1999) observaron apoptosis de las células epiteliales del conducto mulleriano durante su regresión en embriones macho de rata así como en los conductos de Müller de hembras aunque en menor cantidad. Usando detección colorimétrica, reportaron que el epitelio mulleriano no expresa el receptor tipo II de MIS (MISIIR) quedando restringida a las células mesenquimáticas que rodean al conducto lo que sugiere que MIS induce la muerte celular del epitelio del conducto de Müller vía parácrina del mesénquima.

Dado que la regresión del conducto mulleriano inicia en el extremo cefálico, se pensó en un posible gradiente cefálico - caudal de MISIIR produciendo un alto grado de apoptosis en el extremo cefálico del conducto, sin embargo la apariencia uniforme del transcrito del receptor y la presencia de células apoptóticas a lo largo de todo el conducto mulleriano elimina esa explicación (Roberts *et al.*, 1999).

En el caimán (*Alligator mississippiensis*) el mesénquima que rodea el conducto mulleriano también se pierde durante la regresión como resultado de muerte celular o bien por migración (Austin, 1989).

Evidencias en mamíferos y aves sugieren que algunas de las células del conducto mulleriano se mantienen viables durante el proceso de regresión y pueden migrar. Estudios usando microscopía electrónica muestran que las células epiteliales viables emiten proyecciones hacia el compartimento estromático a través de interrupciones de la membrana basal sugiriendo la posible interacción epitelio - mesénquima durante la regresión mulleriana (Dyche *et al.* , 1979; Cuhna and Lung, 1979; Trelstad *et al.* , 1982).

La ausencia de fibronectina en los sitios donde existen dichos contactos celulares, junto con la similitud que existe entre las células epiteliales y las mesenquimáticas de la periferia apoya la idea de que existe migración de las células epiteliales (Dyche 1979; Paranko *et al.* , 1984).

En la fase de regresión, usando H^3 -glucosamina, Hayashi *et al.* (1982) observaron la presencia de células en el estroma que retienen restos de membrana basal en su superficie, éstas se han interpretado como células epiteliales que migran fuera del conducto y se integran al mesénquima para luego desdiferenciarse. Seguida de la aparente transformación de células epiteliales, se ha propuesto la posible migración hacia el mesonefros, esta propuesta se basa en observaciones hechas en quimeras de pollo - codorniz en el que los conductos mullerianos de codorniz fueron transplantados a embriones macho de pollo. Se observó que los conductos mostraron regresión y que las células ductales de codorniz migraron hacia el mesonefros (Hutson *et al.* 1984).

Austin (1995) reportó que las células epiteliales marcadas del conducto de Müller en regresión del lagarto salen del conducto y entran al estroma mientras que en conductos cultivados las células epiteliales migran hacia el mesonefros y se incorporan al epitelio de los túbulos mesonéfricos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El proceso de regresión o estabilización de los conductos genitales es controlado en los machos por las hormonas producidas por el testículo embrionario. Los conductos de Wolff son estabilizados por los andrógenos secretados por las células de Leydig, mientras que los conductos de Müller entran en degeneración por la presencia de la hormona anti - mulleriana secretada por las células de Sertoli.

En la hembra la ausencia de Testosterona causa la regresión del conducto de Wolff y la falta de MIS permite el desarrollo del conducto de Müller hacia los genitales internos de la hembra. Las diferencias en la dependencia hormonal de los dos sistemas de conductos hace pensar que el (los) mecanismo(s) de regresión ductal también es diferente (s).

Hasta hoy existen dos propuestas que pretenden explicar el fenómeno de regresión de los conductos. El primero de ellos propone a la muerte celular programada o apoptosis de las células epiteliales de los conductos. La segunda propone que la disolución de los conductos es mediante migración de las células ductales hacia otras regiones mesonéfricas. Sin embargo, no existen trabajos en ratón que demuestren que la regresión de los conductos se lleva a cabo por apoptosis ni que dicho evento se da en dirección cefálica - caudal, por lo que en el presente trabajo se abordarán estos puntos. Además, resulta importante trabajar con ratón, ya que actualmente es el modelo de mamífero mas conocido en cuanto a su genética molecular.

OBJETIVO GENERAL :

- Aportar evidencias de que durante la regresión y diferenciación sexual de los conductos de Wolff y Müller hay apoptosis en fetos de ambos sexos.

Objetivos particulares:

- Establecer la presencia de células apoptóticas en las células epiteliales de los conductos así como en las células del mesénquima periductal.
- Determinar la presencia de mitosis en las células ductales.
- Establecer los cambios en el diámetro de los conductos durante la diferenciación sexual de fetos de ratón.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron complejos urogenitales (gónada con su mesonefros adyacente) de embriones hembras y macho de ratón de la cepa CD-1 de 12 a 15 días post coito (*dpc*), contando como día cero el día en que se observó el tapón vaginal en hembra.

Los complejos urogenitales fueron fijados en Karnovsky (buffer compuesto por paraformaldehído al 1%, glutaraldehído al 2.5% y cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.5) (Karnovsky, 1965) posteriormente se lavaron en buffer de cacodilato de sodio y se post-fijaron con tetróxido de osmio al 1%. Se deshidrataron con cambios progresivos de etanol (70, 80, 90, 95 y 100%) y se incluyeron en Epon 812.

Se realizaron cortes semifinos (1 μ m de grosor) seriados de la parte cefálica y caudal de cada mesonefros, tomando como punto de referencia la gónada. Los cortes se tiñeron con azul de toluidina para su observación al microscopio de luz. También se realizaron cortes de entre 90 y 150 nm de grosor los cuales se tiñeron con acetato de uranilo al 2.5% y con citrato de plomo al 0.3% para su posterior observación a través de un microscopio electrónico de transmisión.

Se hicieron mediciones del diámetro menor y mayor de ambos conductos usando microscopía de luz y mediante el programa de computadora Metamorph Imaging System. Los valores obtenidos fueron analizados a través de ANOVA simple y de pruebas de Fisher para determinar diferencias significativas entre los diferentes días del desarrollo así como entre las dos regiones estudiadas.

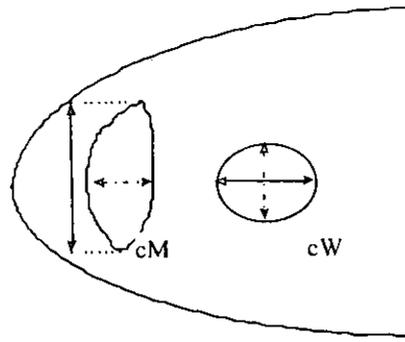


Fig. 2 Esquema del mesonefros y los conductos sexuales.

Forma en que se realizaron las mediciones de los diámetros de los conductos de Wolff (cW) y Müller (cM). La línea punteada corresponde al diámetro menor mientras que la línea continua corresponde al diámetro mayor.

Las características morfológicas que se consideraron para establecer la presencia de apoptosis en los conductos fueron: ① núcleos con cromatina condensada y ubicada en la periferia del nuclear, ② presencia de cuerpos apoptóticos (fragmentos de cromatina y algunos organelos envueltos por una membrana celular), ③ presencia de fagosomas dentro de células epiteliales y/o mesenquimáticas y ④ la presencia de células fagocíticas entre las células que conforman el conducto o próximos a él (Kerr 1971). La identificación de células en mitosis se llevó a cabo mediante la observación de figuras mitóticas.

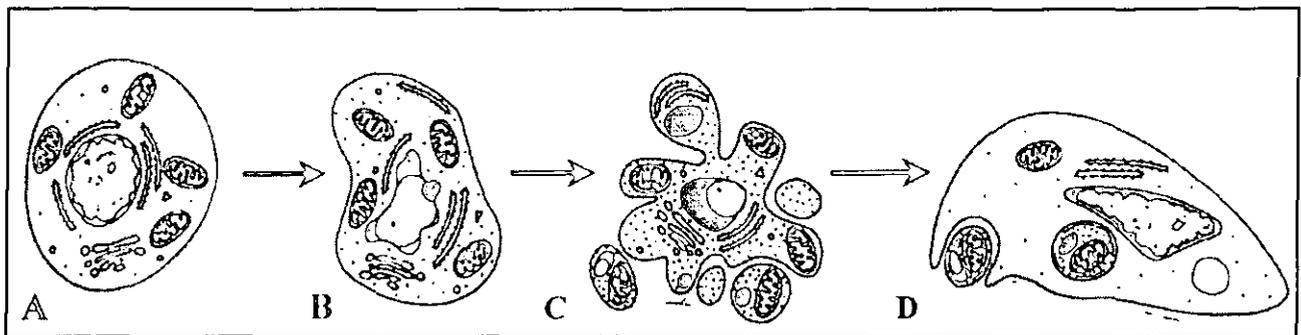


Fig. 3. Secuencia de cambios morfológicos de las células en apoptosis.

A. Célula normal. **B.** Compactación y segregación de la cromatina y condensación del citoplasma. **C.** Fragmentación nuclear, convolución de la superficie celular y producción de cuerpos apoptóticos. **D.** Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos o células adyacentes.

RESULTADOS

CONDUCTO DE MÜLLER DE HEMBRA

A los 12 *dpc*, la región cefálica del conducto de Müller (cM) presenta una forma elíptica y se localiza muy cerca del epitelio celómico por lo que pocas células mesenquimáticas se infiltran entre ellos. El conducto se presenta como una masa de células epiteliales sin polaridad ni luz definidas y algunas de ellas se encuentran en mitosis o presentan proyecciones citoplasmáticas dirigidas hacia el epitelio celómico, en este último es frecuente encontrar células en mitosis (Fig. 4a). El conducto mide aproximadamente $38.23 \times 73.28 \mu\text{m}$ (Fig. 5)

La región caudal del conducto se localiza al igual que en la región cefálica muy cerca del epitelio celómico pero en este caso el cM se encuentra en contacto con el conducto de Wolff (cW); al microscopio de luz se observa que la membrana basal de uno de los conductos se vuelve discontinua en la superficie en la que tiene contacto con el otro conducto. Las células del epitelio presentan las mismas características que en la región cefálica y el mesénquima se observa laxo. Su diámetro promedio es de $38.86 \times 62.15 \mu\text{m}$ por lo que el diámetro mayor es significativamente más pequeño que en la región cefálica (Fig. 6).

Durante los 13 *dpc* el conducto se mantiene de forma elíptica de epitelio tipo pseudoestratificado, algunas células epiteliales presentan material fagocitado rodeado por una membrana (fagosomas) en su interior mientras que en otras se observan figuras mitóticas. Con frecuencia se presentan fagocitos invadiendo el compartimento epitelial en cuyo interior contienen fagosomas en diferentes grados de reabsorción. El mesénquima que rodea al conducto es el típico indiferenciado y en él es posible observar algunas células mitóticas (Fig. 4b). Existe un incremento significativo en el diámetro mayor con respecto al día anterior ($49.04 \times 79.91 \mu\text{m}$) (Fig. 5). A diferencia del día anterior, ambos conductos pierden contacto en su región caudal, debido a la infiltración de células mesenquimáticas entre ellos, así como también podemos ver invasión de mesénquima entre el cM y el epitelio celómico. El diámetro del conducto es

significativamente menor que en la región cefálica ($38.86 \times 65.93 \mu\text{m}$) (Fig. 6) y se mantiene sin cambios importantes en su diámetro respecto al día anterior.

A los 14 *dpc* el cM se mantiene con características similares tanto en su región cefálica como en la caudal, ya que en ambas regiones es frecuente encontrar células fagocíticas intraepiteliales así como fagosomas en el epitelio sin embargo, el número de fagocitos y de cuerpos apoptóticos es menor que en el día 13 *dpc*; tampoco es frecuente observar figuras mitóticas (Fig. 4c, 16). El diámetro mayor de la región cefálica muestra una disminución significativa con respecto al día anterior ($53.47 \times 65.39 \mu\text{m}$) (Fig. 5) mientras que en la región caudal no existen diferencias importantes ($46.20 \times 62.01 \mu\text{m}$) (Fig. 6).

El cM de hembras a los 15 *dpc* se observa más desarrollado tanto en su región cefálica como en la caudal; presenta una luz definida aunque no tan desarrollada como la que se observa en el cW de machos de la misma edad. Se observan cuerpos apoptóticos fagocitados por células epiteliales adyacentes y en diferentes grados de degradación (Fig. 4d). El diámetro del conducto en la región cefálica no presenta diferencias importantes con respecto al día anterior de desarrollo ($48.48 \times 58.88 \mu\text{m}$) (Fig. 5), sin embargo, en la región caudal se observa un decremento significativo ($34.17 \times 45.60 \mu\text{m}$) (Fig. 6), además se encontró que el diámetro de la región cefálica es mayor que en la región caudal.

CONDUCTO DE WOLFF DE HEMBRA

A los 12 *dpc* la región cefálica del cW de hembras se observa bien definido y su forma difiere a la del cM de la misma edad ya que recuerda más un círculo que una elipse, sus células epiteliales muestran una marcada polaridad alrededor de una luz pequeña pero bien definida, al microscopio de luz se observa una membrana basal completa. Algunas células epiteliales presentan fagosomas en su citoplasma y el estroma está formado por células mesenquimáticas típicas (Fig. 4a). Su diámetro promedio es de $41.72 \times 55.47 \mu\text{m}$ (Fig. 7).

La región caudal, está muy cerca del cM y sus células epiteliales presentan las mismas características que en la región cefálica y que en la hembra de la misma edad. El diámetro del conducto en esta región ($41.89 \times 52.60 \mu\text{m}$) no muestra diferencias importantes con respecto a la región cefálica (Fig. 8).

Durante los 13 *dpc* comienza a observarse muestras de regresión del cW en su región cefálica, ahora las células presentan desarreglo y al microscopio de luz parece que partes de la membrana basal se han disuelto, también puede observarse material amorfo en la luz del conducto así como núcleos picnóticos. Es frecuente observar células fagocíticas en la periferia del conducto o atravesando la membrana basal e invadiendo el compartimento epitelial, también es frecuente encontrar cuerpos apoptóticos dentro de células epiteliales. El mesénquima que rodea a éste conducto se ve más compacto en comparación al conducto mulleriano compañero (Fig. 4b). En su región caudal se observan muy pocas mitosis y pocos fagosomas. El diámetro del conducto en ambas regiones se mantiene sin cambios significativos con respecto al día anterior de desarrollo ($39.86 \times 53.75 \mu\text{m}$; $44.95 \times 59.92 \mu\text{m}$) (Fig. 7, 8).

En la región cefálica del cW a los 14 *dpc* se pueden observar algunas células fagocíticas. En algunos lugares parece que la membrana basal ha disuelto. La abundancia de fagosomas es menor que el que presentaba en el día 13 de gestación (Fig. 4c). El diámetro del conducto muestra un decremento importante en su diámetro mayor ($35.91 \times 42.38 \mu\text{m}$) (Fig. 7).

Al microscopio electrónico se observan células en mitosis. En las proximidades del conducto se pueden observar fagocitos que contienen fagosomas en diferentes grados de reabsorción (Fig. 14). A mayor aumento se observa como la membrana basal del conducto se extiende sobre la superficie del fagocito mientras que células mesenquimáticas emiten proyecciones citoplásmicas penetrando entre los dos tipos celulares (Fig. 15).

En la región caudal del cW las células epiteliales rara vez presentan fagosomas en su citoplasma y tampoco se observan células con actividad fagocítica invadiendo el epitelio. En el mesénquima

que rodea este conducto ocasionalmente presenta figuras mitóticas. El conducto se mantiene sin cambios significativos en los valores del diámetro ($38.96 \times 45.83 \mu\text{m}$) (Fig. 8).

En el cW de hembras de 15 *dpc* en su región cefálica es frecuente observar signos apoptóticos, las células epiteliales han perdido su polaridad tipo epitelial y se ven inmersas en material amorfo que se tiñe más que su citoplasma (Fig. 4d, 19). El diámetro del conducto se mantiene sin cambios estadísticamente importantes con respecto al día anterior de desarrollo, pero se puede ver que es significativamente más pequeño que a los 12 *dpc* ($32.49 \times 41.21 \mu\text{m}$) (Fig. 7). En la región caudal tampoco se observa un decremento importante en su diámetro con respecto al día anterior de desarrollo ($26.53 \times 39.57 \mu\text{m}$) (Fig. 8).

Fig. 4 Cortes transversales de la región cefálica de mesonefros de hembra.

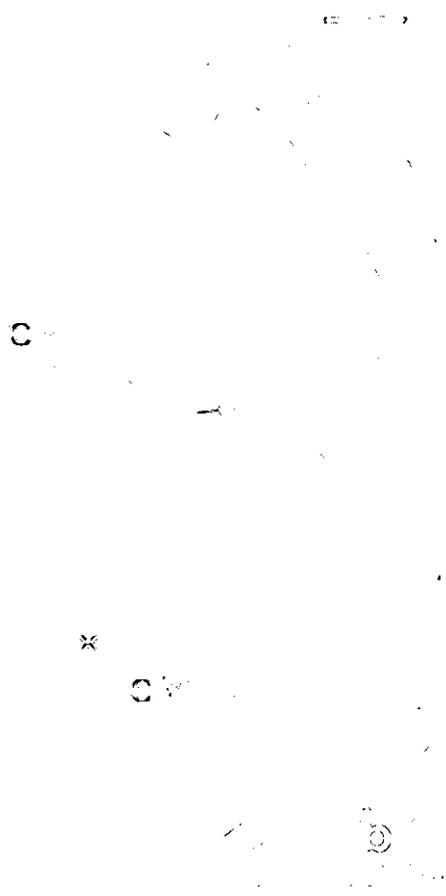
El conducto de Müller se encuentra hacia el exterior y presenta una forma ovoide, mientras que el conducto de Wolff se localiza hacia el interior del mesonefros y su forma es circular. **a.** A los 12 *dpc* se observan figuras mitóticas en el conducto de Müller. **b.** A los 13 *dpc* se observan fagosomas y células con núcleos picnóticos en el conducto de Wolff, también se presentan células fagocíticas en el conducto de Müller. **c.** A los 14 *dpc*, el conducto de Wolff está formado por pocas células epiteliales. **d.** A los 15 *dpc* solo se observan los restos del conducto de Wolff.

Conducto de Müller (cM), conducto de Wolff (cW) Fagocitos (→), mitosis (*).

12



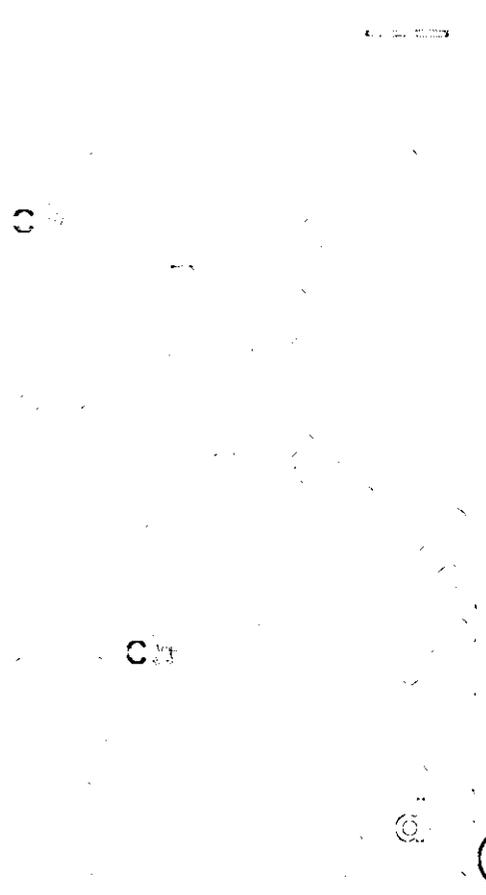
13

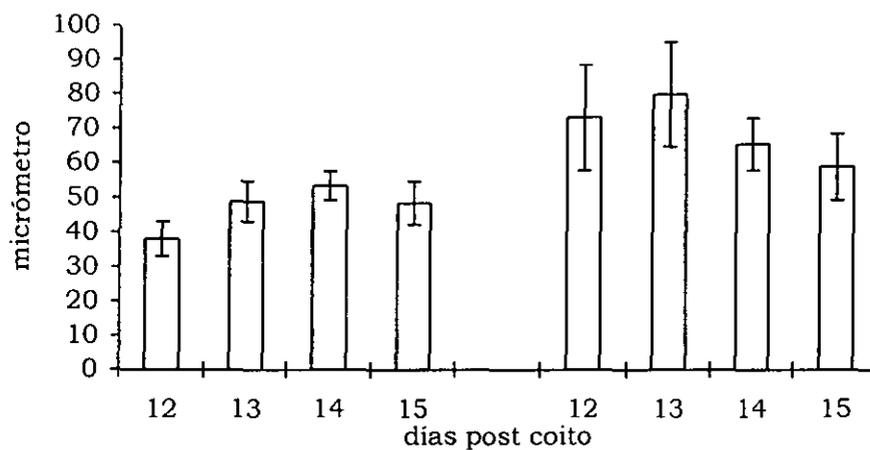


14



15

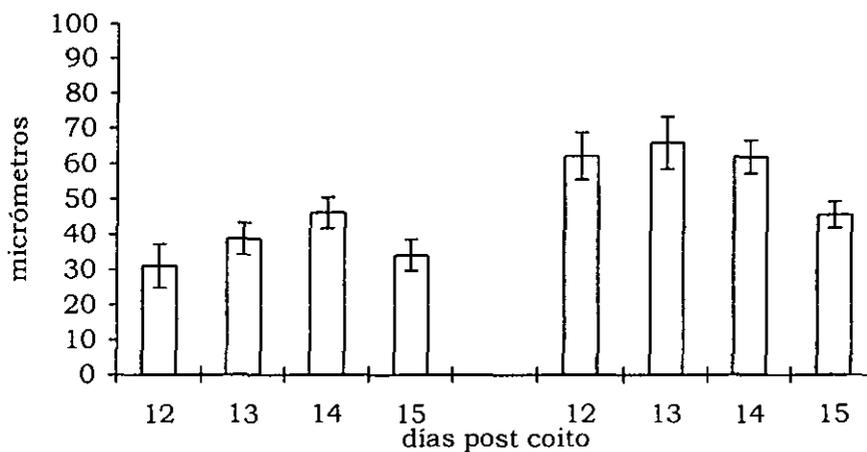




		Diámetro menor				Diámetro mayor			
x		38.23	49.04	53.47	48.48	73.28	80.01	65.39	58.88
d.s.		5.06	5.83	4.10	6.19	15.41	15.30	7.53	9.58
		F(3,41)=17.49				F(3,41)=5.99			

* diferencias significativas $P > 0.01$

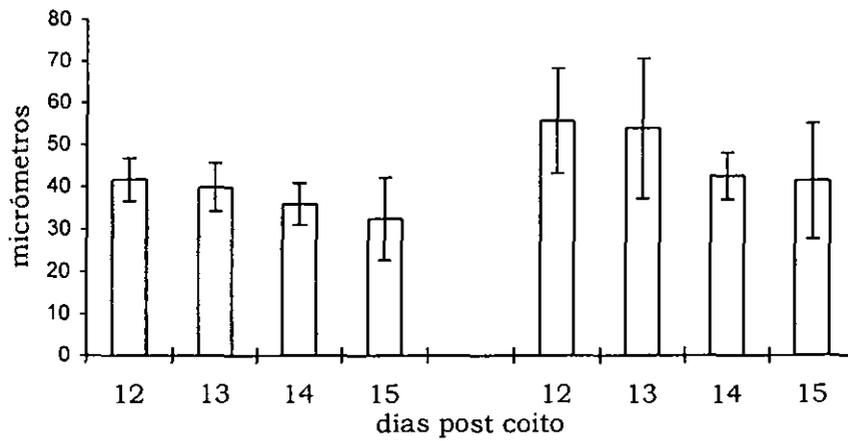
Fig. 5 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Müller de hembra en la región cefálica de los 4 días estudiados



		Diámetro menor				Diámetro mayor			
x		31.13	38.86	46.2	434.2	62.15	65.93	62.01	45.6
d.s.		6.18	4.53	4.37	4.44	6.63	7.41	4.72	3.72
		F(3,35)=16.64				F(3,35)=18.78			

* diferencias significativas $P > 0.01$

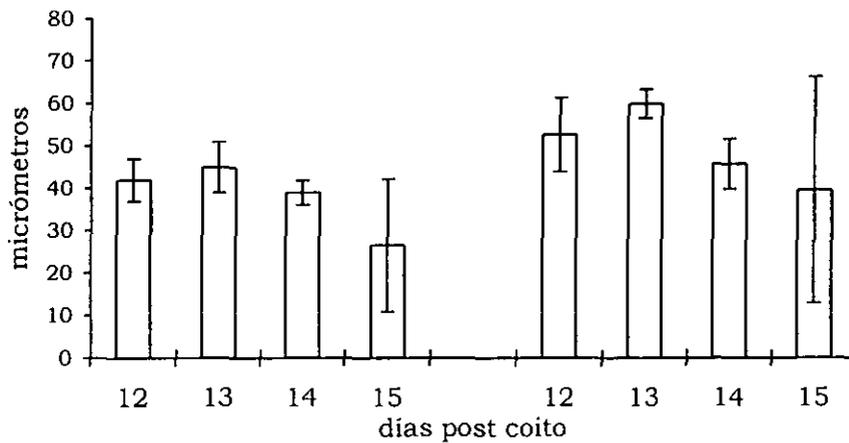
Fig. 6 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Müller de hembra en la región caudal de los 4 días estudiados



		Diámetro menor				Diámetro mayor			
x		41.72	39.86	35.91	32.49	55.47	53.75	42.38	41.21
d.s.		5.03	5.66	4.89	9.66	12.51	16.64	5.48	13.57
		F(3,38)=4.25				F(3,38)=3.87			

* diferencias significativas $P > 0.01$

Fig. 7 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Wolff de hembra en la región cefálica de los 4 días estudiados



		Diámetro menor				Diámetro mayor			
x		41.89	44.95	38.96	26.53	52.6	59.92	45.83	39.57
d.s.		5.00	5.99	2.91	15.65	8.73	3.40	5.92	26.69
		F(3,41)=9.34				F(3,41)=2.58			

* diferencias significativas $P > 0.01$

Fig. 8 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Wolff de hembra en la región caudal de los 4 días estudiados

CONDUCTO DE MULLER DE MACHO

A los 12 *dpc*, el cM en el macho es de forma alargada, se localiza en la misma posición y su epitelio presenta características similares a las observadas en la hembra de la misma edad tanto en la región cefálica (Fig. 9a) como en la caudal. El diámetro en la región cefálica es de 32.51 x 58.91 μm (Fig. 10) mientras que en la caudal es de 39.20 x 63.11 μm (Fig. 11).

A los 13 *dpc* las células epiteliales del cM tanto en la región cefálica (Fig. 9b) como en la caudal, presentan proyecciones laterales. Es frecuente observar células fagocíticas intraepiteliales y escasos fagosomas en las células ductales. El mesénquima periductal comienza a condensarse alrededor del cM formando anillos concéntricos. El diámetro del conducto en ambas regiones se mantiene sin cambios importantes con respecto al día anterior (34.47 x 62.73 μm ; 28.53 x 56.16 μm) (Fig. 10,11).

La región cefálica del cM de 14 *dpc* muestra claros signos de regresión ya que está formado por un menor número de células epiteliales respecto al día anterior, las cuales presentan fagosomas de diferentes tamaños; algunos fagocitos son vistos en la periferia del conducto. Las células mesenquimáticas presentan características epitelioideas y se concentran alrededor del conducto formando anillos más compactos que los presentes alrededor del cW compañero (Fig. 9c, 17). Al microscopio electrónico se observa el contacto de proyecciones citoplásmicas emitidas por células epiteliales del cM y por células del mesénquima y que, al igual que en el cW de hembra de la misma edad, la membrana basal del conducto se extiende sobre la superficie del fagocito (Fig. 17, 18). Se observa un decremento significativo en el diámetro mayor mientras que el menor se mantiene sin cambios importantes (29.45 x 42.08 μm) (Fig. 10). La región caudal presenta características citológicas similares a la región cefálica pero a diferencia de ésta, no se observan cambios importantes en su diámetro (28.46 x 50.04 μm) (Fig. 11).

A los 15 *dpc* el cM en el macho tanto en su región cefálica (Fig. 9d) como en la caudal, está formado por pocas células epiteliales, también el número de células mesenquimáticas que rodean

al conducto han disminuido. Al microscopio electrónico se observa que algunas regiones del conducto presentan interrupciones de la membrana basal, sitios en donde proyecciones citoplasmáticas de las células mesenquimáticas hacen contacto con la superficie de algunas células epiteliales (Fig. 20, 21). El diámetro del conducto se reduce drásticamente tanto en la parte cefálica ($18.62 \times 25.29 \mu\text{m}$) (Fig. 10) como en la caudal ($15.53 \times 21.88 \mu\text{m}$) (Fig. 11).

CONDUCTO DE WOLFF DE MACHO

El cW de macho a los 12 *dpc* tiene una forma mas o menos circular con las mismas características que en la hembra de la misma edad tanto en su región cefálica (Fig. 9a) como en la caudal. El diámetro promedio del conducto es de $38.01 \times 44.69 \mu\text{m}$ en la región cefálica (Fig. 12) y de $42.10 \times 52.27 \mu\text{m}$ en la caudal (Fig. 13).

A los 13 *dpc*, en ambas regiones, se mantiene la forma circular, el epitelio es simple cilíndrico que limita una luz amplia donde en ocasiones se observa material amorfo. Al microscopio de luz se observa una membrana basal continua. Es posible observar escasos fagosomas en el epitelio del conducto no se observan fagocitos ni en el conducto ni en el mesénquima que lo rodea, el cual está indiferenciado (Fig. 9b). El diámetro del conducto muestra un incremento significativo ($51.29 \times 54.35 \mu\text{m}$; $47.45 \times 61.01 \mu\text{m}$) (Fig. 12, 13).

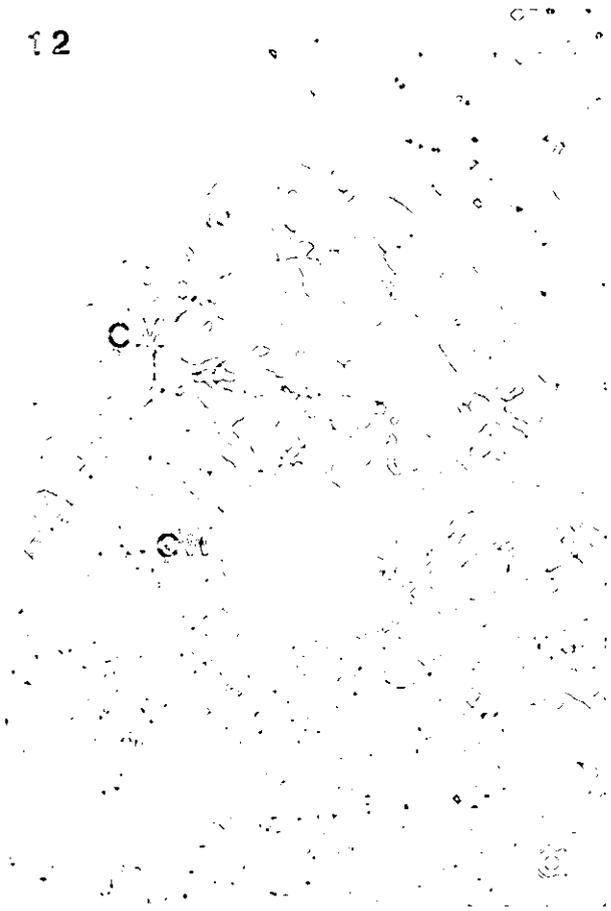
Durante los 14 *dpc* el cW tanto en su región cefálica (Fig. 9c) como en la caudal está desarrollado y sus células epiteliales presentan polaridad definida alrededor de una luz amplia, con poca frecuencia se observan fagosomas en las células epiteliales y en ocasiones se ven figuras mitóticas. Al igual que el cM, el cW se encuentra rodeado por células mesenquimáticas condensadas a su alrededor. El diámetro mayor del conducto en la región cefálica muestra un incremento significativo con respecto al día anterior ($56.43 \times 73.41 \mu\text{m}$) (Fig. 12) mientras que en la región caudal se presenta un incremento importante en el diámetro mayor y menor ($56.64 \times 68.08 \mu\text{m}$) (Fig. 13).

A los 15 *dpc* el cW en su región cefálica (Fig. 6d) y caudal, se mantiene con una luz amplia y está formado por un epitelio seudo-estratificado que en ocasiones presenta fagosomas (Fig. 20). El conducto se mantiene rodeado por células mesenquimáticas que forman anillos concéntricos menos compactos que los observados alrededor del cM compañero (Fig. 9d). La región cefálica, el diámetro del conducto no muestra diferencias significativas con respecto al día anterior de desarrollo (56.09 x 73.92 μm) (Fig. 12); por otro lado, en la región caudal muestra un decremento importante en el diámetro mayor (50.32 x 58.29 μm) (Fig. 22).

Fig. 9 Cortes transversales de la región cefálica de mesonefros de macho.

a. 12 *dpc*. El conducto de Müller se localiza hacia la parte externa del mesonefros y es de forma alargada mientras que el conducto de Wolff está hacia la parte interna del mesonefros. **b.** A los 13 *dpc* el conducto de Müller presenta fagocitos, el mesénquima muestra un arreglo compacto alrededor del conducto; el cW muestra una luz amplia. **c.** 14 *dpc*. Anillos concéntricos de mesénquima se concentran alrededor de los conductos. El conducto de Müller se ve reducido y con fagosomas, existen fagocitos cercanos al mismo. El conducto de Wolff está formado por un mayor número de células, las cuales presentan fagosomas. **d.** 15 *dpc*: El conducto de Müller es reducido y rodeado por células del mesénquima con características epitelioides. Conducto de Müller (cM), conducto de Wolff (cW) Fagocitos (→), mesénquima (*).

12



13

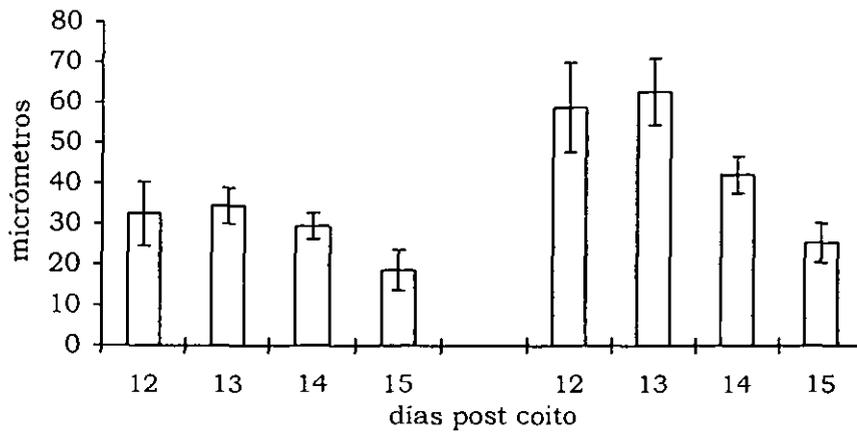


14



15





		Diámetro menor			
x		32.51	34.47	29.45	18.62
d.s.		7.87	4.43	3.21	4.93

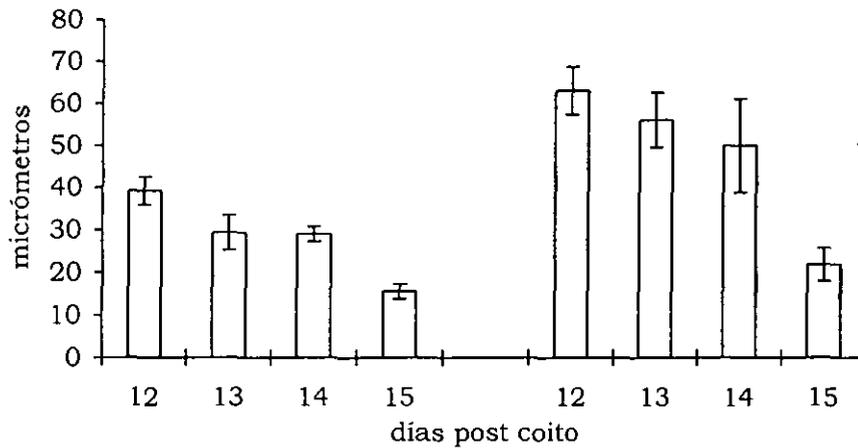
F(3,34)=44.65

		Diámetro mayor			
x		58.91	62.73	42.08	25.29
d.s.		11.21	8.33	4.54	4.83

F(3,34)=15.61

* diferencias significativas P>0.01

Fig 10. Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Müller de macho en la región cefálica de los 4 días estudiados



		Diámetro menor			
x		39.20	29.34	28.96	15.53
d.s.		3.35	4.07	1.78	1.74

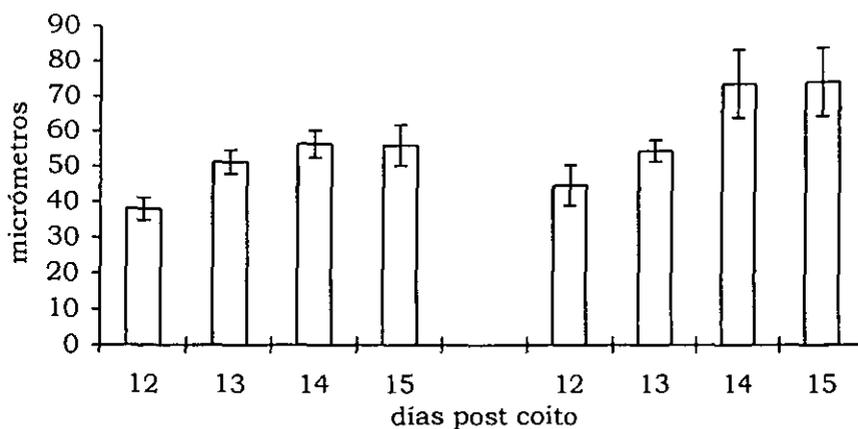
F(3,34)=110.29

		Diámetro mayor			
x		63.11	56.16	50.04	21.88
d.s.		5.72	6.49	11.15	3.89

F(3,38)=62.82

* diferencias significativas P>0.01

Fig. 11 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Müller de macho en la región caudal de los 4 días estudiados



		Diámetro menor			
x		38.01	51.29	56.43	56.09
s.d.		3.14	3.39	3.91	5.81

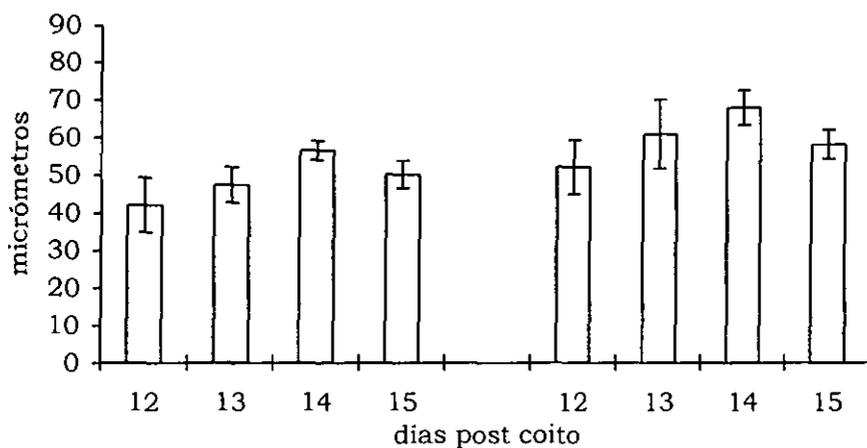
F(3,35)=41.27

		Diámetro mayor			
x		44.69	54.35	73.41	73.92
s.d.		5.67	3.09	9.69	9.73

F(3,35)=36.26

* diferencias significativas P>0.01

Fig. 12 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Wolff de macho en la región cefálica de los 4 días estudiados



		Diámetro menor			
x		42.10	47.45	56.64	50.32
d.s.		7.23	4.75	2.54	3.67

F(3,34)=110.29

		Diámetro mayor			
x		52.27	61.01	68.08	58.29
d.s.		7.24	9.15	4.61	3.89

F(3,38)=62.82

* diferencias significativas P>0.01

Fig. 13 Cambios observados en los diámetros menor (blanco) y mayor (gris) del conducto de Wolff de macho en la región caudal de los 4 días estudiados

Fig. 14 Micrografía electrónica de la región cefálica del conducto de Wolff de hembra a los 14 *dpc*. Se observa una célula epitelial en mitosis (mit), un fagocito en las proximidades del conducto que contiene fagosomas (*) en diferentes grados de degradación. También se observan algunas células mesenquimáticas (mes) que rodean al conducto (cW). X2500

2 μm

000



Fig. 15 Región cefálica del conducto de Wolff, amplificación del recuadro de la micrografía anterior. Se muestra como la membrana basala (→) del conducto es continua sobre la superficie del fagocito (fag) el cual hace contacto con una célula del epitelio ductal (cW); una célula mesenquimática (mes) muestra proyecciones citoplásmicas penetrando entre los dos tipos celulares (flecha curva) X1200.

Fig. 16 Micrografía del conducto de Müller de una hembra de 14 dpc. Se observan de manera simultánea una célula epitelial en apoptosis (ap) y otra en mitosis (mit) en el epitelio ductal X8000.

500 mm

500 mm

Fig. 17 Región cefálica del conducto de Müller de macho de 14 dpc.

Se observa la compactación de las células mesenquimáticas (mes) alrededor del conducto (cM) y la presencia de células fagocíticas (fag) en las proximidades del mismo, en cuyo interior se encuentran fagosomas (*) X8000.

5µm

100

100

100

Fig. 18 Conducto de Müller de macho de 14 *dpc.* Se observa el contacto de una célula epitelial del conducto (cM) con una célula mesenquimática (mes) mediante proyecciones citoplásmicas. La membrana basal del conducto es señalada con flechas. X1200.

Fig. 19 Conducto de Wolff de hembra de 15 *dpc.* Se muestra un fagocito (fag) en contacto con una célula epitelial (c.ep), parte de la membrana basal (→) del conducto (cW) se extiende sobre la superficie del fagocito X6000.

500 nm



1 μ m



Fig. 20 Región cefálica del conducto de Müller de macho de 15 *dpc*. Se observan interrupciones en la membrana basal (→), por donde las células mesenquimáticas (mes) hacen contactos con las células epiteliales del conducto (cM). X 10000.

500nm

1108

↓

↓

1109

Fig. 21 Región cefálica del conducto de Müller (cM) de macho de 15 *dpc*. A. Se muestran los dos mecanismo por los que se lleva a cabo la remoción de células apoptóticas : por la actividad fagocítica de las células epiteliales adyacentes (c.ep) o por fagocitos (fag) quienes presentan una mayor capacidad fagocítica. X1500. B. Amplificación de la micrografía superior, donde se observa con detalle el cuerpo apoptótico (*) dentro de la célula epitelial ductal. X8000.

5 μm



1 μm



Fig. 22 Corte transversal de la región cefálica del conducto de Wolff (cW) de macho de 15 *dpc*. Se observa el desarrollo de una luz prominente y la presencia de fagosomas (*) en células del epitelio ductal, el cual se encuentra rodeado por mesénquima (mes). X2500.

2 μm

1100

100

100



DISCUSIÓN

Los datos reportados en este trabajo son el resultado de observaciones hechas a los conductos de Wolff y Müller durante su regresión gradual en embriones de ratón hembras y machos respectivamente. En general, las características citológicas de los conductos son similares a las descritas durante la involución *in vitro* del cM de ratas hembras con suministro de MIS (Tsuji *et al.* 1992) así como lo reportado *in situ* en embriones machos de rata (Price *et al.* 1977, 1979), ratón (Dyche 1979), pollo y caimán (Forsberg and Olivecrona 1963).

Uno de los cambios morfológicos iniciales observados en el proceso de regresión del cW y cM es la presencia de fagosomas dentro de las células epiteliales ductales a partir de los 13 *dpc* lo cual nos indica la capacidad que tiene este tipo celular para fagocitar restos celulares (cuerpos apoptóticos). La presencia de fagosomas es simultánea con la de células fagocíticas que están en el estroma adyacente al conducto o atravesando la membrana basal e infiltrándose entre las células ductales. Price *et al.* (1977) y Dyche (1979) identificaron macrófagos invadiendo el cM durante su regresión, por lo que se sugiere que los fagocitos identificados en nuestros tejidos son macrófagos.

Se ha demostrado que fagocitos especializados como los macrófagos, son el principal tipo celular encargado de remover los restos de células apoptóticas, particularmente en tejidos con una alta tasa de muerte celular, con el fin de evitar una respuesta inmune en el sitio donde están muriendo células (Ukeshima, 1996). Sin embargo, también existen evidencias en otros tejidos de la participación de células diferentes a los macrófagos con capacidad fagocítica como por ejemplo: células epiteliales (Price *et al.* 1977; Wyllie *et al.* 1980), células foliculares (Ukeshima 1996), fibroblastos (Hall *et al.* 1994) y células endoteliales (Hess *et al.* 1997) que también fagocitan restos de células apoptóticas.

Otra característica morfológica importante que se observa durante la regresión de los conductos de Wolff y Müller, es la condensación de las células mesenquimáticas que forman anillos

concéntricos alrededor del cM los cuales son más evidentes en los machos que en las hembras. Un arreglo similar se observa alrededor del cM de rata macho (Price *et al.* 1977). Este arreglo de células mesenquimáticas se da poco después de la presencia de las primeras células fagocíticas cerca o dentro del epitelio del conducto en regresión y es particularmente interesante dado que parece ser una característica única de la regresión de los conductos sexuales.

A los 15.5 *dpc* las células del estroma adyacentes al conducto presentan características epiteliales por lo que son muy semejantes a las pocas células epiteliales que conforman los conductos en sus últimas etapas de regresión. Además, se observan algunas interrupciones de la membrana basal por donde se emiten proyecciones citoplásmicas de las células epiteliales hacia el estroma con el que en ocasiones llega a tener contacto. Las características citológicas de las células ductales y mesenquimáticas de los conductos de Wolff y Müller durante su regresión en hembras y machos respectivamente sugieren una compleja interacción entre estos dos tipos celulares.

La presencia de cuerpos apoptóticos, fagosomas y células fagocíticas aunado a las características del núcleo sugieren que la apoptosis juega un papel clave en la disolución de los conductos de Wolff y Müller como lo sugirió Price *et al.* en la rata (1977). Es importante señalar que la apoptosis se observa en las células epiteliales tanto del conducto que degenera como en el que desarrolla, aunque en este último las células apoptóticas son menos abundantes, datos que apoyan las observaciones hechas por Dyche (1979) y Trelstad *et al.* (1982) quienes observan fagosomas en los dos conductos y en ambos sexos.

En los tejidos embrionarios la apoptosis es uno de los eventos más importantes que participan en el desarrollo de varios órganos. La diferenciación de los conductos genitales es un buen modelo para el estudio del papel que juega la apoptosis en la morfogénesis del tracto genital durante la diferenciación sexual de los mamíferos.

Este estudio aporta evidencias de que la apoptosis y la heterofagocitosis son eventos que se presentan de forma simultánea con la mitosis durante en el proceso de regresión de los cW y cM.

Dado que no todas las células epiteliales muestran las características citológicas típicas de apoptosis ni rompimiento de las cadenas de DNA (Walker and Skoska 1994), por su actividad biosintética después de la significativa disolución de los conductos (Hayashi *et al.* 1982) y por la disminución de su volumen celular durante la regresión ductal (Dyche, 1979) no se descarta la posibilidad de que también se lleve a cabo autofagia.

Por otro lado se propuso que un mecanismo que puede estar involucrado en la regresión del cM es la migración de células epiteliales hacia otras regiones mesonéfricas mediante las proyecciones citoplásmicas, aunque existen pocos trabajos que confirmen esta versión (Austin 1995). Las explicaciones propuestas para la regresión mulleriana también podrían ser aplicadas para el caso de la regresión del cW de hembra. Estas proyecciones en el caso del macho, también podrían ser la evidencia de la interacción epitelio - mesénquima y sugerir que las células mesenquimáticas juegan un papel importante durante la regresión como intermediario para la acción de MIS sobre el epitelio mulleriano, como lo sugirió Roberts *et al.* en 1999.

La disminución gradual en el número y tamaño de las células epiteliales del conducto en regresión, con la consecuente reducción en el diámetro, comienza a ser evidente a los 13.5 *dpc* en el macho y un día después en la hembra. Podemos observar que la regresión del cM en la hembra comienza cuando las células epiteliales aun no presentan polaridad definida ni se han integrado como en el caso del cW compañero. Nuestros datos sugieren que en los machos el cM no alcanza la madurez estructural en ningún estadio, lo que probablemente permite que su regresión sea mas rápida y que se dé antes de la regresión del cW en la hembra de acuerdo a lo señalado por Paranko y Virtanen (1986).

Dyche (1979) reportó que el diámetro promedio del conducto mulleriano de la hembra de ratón a los 12 *dpc* es considerablemente menor a los reportados en el presente estudio. Probablemente los valores medios de los diámetros del cM difieran debido al método de medición utilizado. El programa de computadora que nosotros utilizamos nos permite obtener un mayor grado de confiabilidad. Con respecto a los valores obtenidos en las mediciones hechas a los conductos de

Wolff y Müller podemos decir, de manera general, que el cM de hembra y el cW de macho muestra un incremento en su diámetro durante los primeros días estudiados para luego disminuir. Esto demuestra que en el ratón, alrededor de los días 12 y 14 los conductos aun se encuentran en formación y que hacia el día 15 se estabiliza su crecimiento para comenzar su diferenciación de acuerdo con el sexo genético de cada embrión.

DIRECCION DE LA REGRESION

Josso *et al.* (1977) y Tsuji *et al.* (1992) reportaron que en la rata la regresión de los cM se lleva a cabo en dirección cefalo - caudal en base a cultivos de complejos urogenitales en presencia o ausencia de MIS. En presencia de MIS, la región cefálica del cM comienza a degenerar antes que en la región caudal. Austin (1989) encontró en sus observaciones hechas *in vivo* e *in vitro* que el cM derecho de hembras de pollo degenera en la misma dirección. En pollo macho, la regresión mulleriana es en dirección caudo - craneal (Forberg and Olivecrona 1963) al igual que en el caimán macho (Austin 1989).

En el presente estudio no se observaron diferencias importantes ni en el diámetro ni en la estructura de los conductos al comparar la región cefálica con la caudal. Se sugiere que el proceso de regresión se lleva a cabo de forma gradual a lo largo de todo el conducto y no en dirección cefálica - caudal. Nuestros datos coinciden con las observaciones hechas por Roberts *et al.* (1999) en la rata quienes sugieren que la regresión ductal se realiza de manera homogénea a todo lo largo dado que observaron que el receptor tipo II de MIS se localiza en el mesénquima próximo al cM sin que haya un gradiente de concentración como se supondría debía ser si la regresión fuera en una dirección determinada.

Finalmente, las observaciones del presente estudio sugieren que durante la regresión de los conductos de Wolff y Müller del ratón, el epitelio ductal muestra tanto células apoptóticas como células mitóticas. La abundancia de células apoptóticas es mayor a las mitóticas en uno u otro conducto, dependiendo del sexo genético del feto. Lo cual sugiere que existe un mecanismo que

regula la tasa de mitosis - apoptosis que determina el desarrollo o regresión de los conductos de Wolff y Müller durante el desarrollo fetal del ratón.

CONCLUSIONES

- ✓ La apoptosis participa activamente durante la regresión de los conductos de Wolff o Müller de hembra o macho respectivamente por lo que se apoya la hipótesis planteada para este trabajo.
- ✓ La apoptosis también está presente durante el desarrollo de los conductos de Wolff y Müller en machos o hembras respectivamente.
- ✓ La mitosis también se presenta durante la regresión de los conductos de Müller y Wolff en machos y hembras respectivamente.

LITERATURA CITADA

- x Austin, H. 1989. Mullerian-duct regression in the American alligator (*Alligator mississippiensis*): its morphology and testicular induction. *J. Exp. Zool.* 251: 329-338.
- x Austin, H. B. 1995. DiI analysis of cell migration during mullerian duct regression. *Dev. Biol.* 169: 29-36.
- x Bardin, C. W. and Catterall, J. F. 1981. Testosterone: a major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science* 211 (4488) : 1285-1294.
- x Byskov, A. G. and Hoyer, P. E. 1988. Embryology of mammalian gonads and ducts. In: "The physiology of reproduction". Edited by Knobil E. and Neill J. D. Raven Press. Ltd. New York. 293-295.
- x Capel, B. and Lovell-Badge, R. 1993. The Sry gene and sex determining in mammals. *Adv. Dev. Biol.* 2: 1-35.
- x Cuhna, G. R. and Lung, B. 1979. The importance of stroma in morphogenesis and functional activity of urogenital epithelium. *In vitro* 15: 50-71
- x Dyche, W. J. 1979. A comparative study of the differentiation and involution of the mullerian duct and wolffian duct in the male and female fetal mouse. *J. Morphol.* 162: 175-210.
- x Ford, C. E.; Jones, K. W. ; Polani, P. E. ; De Almeida, J.C. and Briggs, J.H. 1959. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal sex dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* i: 711-713.

- x Forsberg, J. and Olivecrona, H. 1963. Degeneration processes during the development of the mullerian ducts in alligator and female chicken embryos. *Z. Anat. Entwickl* 124:83-96. Citado en Austin, H. 1989. Mullerian-duct regression in the american alligator (*Alligator mississippiensis*): its morphology and testicular induction. *J. Exp. Zool.* 251: 329-338.
- x Ginsburg, M.; Snow, M. and McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 102: 251-258.
- x Hacker, A.; Capel, B.; Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. 1995. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603-1614.
- x Hall, S. E.; Savill, J. S.; Henson P. M. and Haslett C. 1994. Apoptotic neutrophils are phagocytosed by fibroblasts with participation of the fibroblast vitronectin receptor and involvement of a mannose/fucose-specific lectin. *J. Immunol.* 153: 3218-3227.
- x Hayashi, A.; Donahoe, P. K. ; Budzik, G. P. and Trelstad, R. L. 1982. Periductal and matrix glycosaminoglycans in rat Mullerian duct development and regression. *Dev. Biol.* 92: 16-26.
- x Hess, K. L. ; Tudor, K-S R. S. ; Johnson, J. D. ; Osati-Ashtiani, F. ; Askew, D. S. and Cook-Mills, J. M. 1997. Human and murine high endothelial venule cells phagocytose apoptotic leukocytes. *Dev. Cell Res.* 236: 404-411.
- x Hutson, J. M.; Fallat, M. E. and Donahoe, P. K. 1984. The fate of the grafted quail Mullerian duct in the chick embryonic coelom. *J. Pediatr. Surg.* 19 (4): 345-352.

- x Jost, A. 1947. Sur les effets de castration precoce de l'embryon male de lapin. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 141: 126-129.
- x Jost, A. 1953. Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 8: 379-418.
- x Josso, N. ; Picard, J-Y. and Tran D. 1977. The antimüllerian hormone. *Recent Prog. Horm. Res.* 33: 117-167.
- x Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high molality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137.
- x Kerr, J. F. R. 1971. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105: 13.
- x Koopman, P. ; Münsterberg, A. ; Capel, B. ; Vivian, N. and Lovell-Badge, R. 1990. Expression of a candidate sex determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-452.
- x Koopman, P. ; Gubbay, J. ; Vivan, N. ; Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- x Lawrence, W. D.; Whitaker, D.; Sugimura, H.; Cunha, G.; Dickersin, R. and Robboy, S. J. 1992. An ultrastructural study of the developing tract in early human fetuses. *Am. J. Obst. Gynecol.* 167 : 185-193.
- x McLaren, A. 1988. The developmental history of the female germ cells in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 10: 162-179.

- x Merchant-Larios, H. and Chimal-Monroy, J. 1989. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Prog. Clin. Biol. Res.* 296: 55-63.
- x Merchant-Larios, H. and Taketo, T. 1991. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J. Electron Microsc. Tech.* 19: 158-171.
- x Merchant-Larios, H.; Moreno-Mendoza, N. and Buehr, M. 1993. The role of mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Inter. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.
- x Merchant, H. 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* 44: 1-12.
- x Münsterberg, A. and Lovell-Badge, R. 1991. Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggest a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.
- x Nordqvist, K. 1995. Sex differentiation - gonadogenesis and novel genes. *Inter. J. Dev. Biol.* 39: 727-736.
- x Paranko, J. ; Pelliniemi, L. J. and Foidart, J. M. 1984. Epithelio - mesenchymal interface and fibronectin in the differentiation of the rat mesonephric and paramesonephric ducts. *Differentiation* 27: 196-204.
- x Paranko, J. ; Foidart, J-M. and Pelliniemi, L. J. 1985. Basement membrane in differentiating mesonephric and paramesonephric ducts of male and female rat fetuses. *Differentiation* 29: 39-49.

- x Paranko, J.; Foidart, J-M. and Pelliniemi, L. J. 1986. Developmental change in interstitial collagens of fetal rat genital ducts. *Dev. Biol.* 113: 364-372.
- x Paranko, J. and Virtanen, I. 1986. Epithelial and mesenchymal cell differentiation in the fetal rat genital ducts: changes in the expression of cytokeratin and vimentin type of intermediate filaments and desmosomal plaque proteins. *Dev. Biol.* 117: 135-145.
- x Price, J. M.; Donahoe, P. K. and Ito, Y. 1979. Involution of the female müllerian duct of the fetal rat in the organ culture assay for the detection of müllerian inhibiting substance. *Am. J. Anat.* 156: 265-284.
- x Price J.M., Donahoe P.K., Ito, Y. and Hendren, W. H. 1977. Programmed cell death in müllerian duct induced by müllerian inhibiting substance. *Am. J. Anat.* 149: 353-376.
- x Roberts, L. M.; Hirokawa, V.; Nachtigal, M. and Ingraham, H. 1999. Paracrine-mediated apoptosis in reproductive tract development. *Dev. Biol.* 208: 110-122.
- x Satoh, M. 1991. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *J. Anat.* 177: 85-107.
- x Shieb, D. 1963. Properties and role of acid hydrolases of the Müllerian ducts during sexual differentiation in male chick embryo. In: "Lisosomes" (A. V. S. DeReuck and M. P. Cameron, eds.) p.281. Little, Brown, Boston.
- x Sinclair, A. H.; Berta, P. ; Palmer, M. S. ; Hawkins, J. R. ; Griffiths, B. L. ; Smith, M. J. ; Foster, J. W. ; Frischauf, A-M.; Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. 1990, A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.

- x Smith, C. and MacKay, S. 1991. Morphological development and late of the mouse mesonephros. *J. Anat.* 174: 171-184.
- x Tran D. and Josso N. 1982. Localization of anti-Müllerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine Sertoli cell using immunocytochemistry with a monoclonal antibody. *Endocrinology* 111: 1562.
- x Trelstad, R.; Hayashi, A.; Hayashi, K. and Donahoe, P. 1982. The epithelial-mesenchymal interface of the male rat mullerian duct: loss of basement membrane integrity and ductal regression. *Dev. Biol.* 92: 27-40.
- x Tsuji, M.; Shima, H. ; Yonemura, C. ; Brody, J. ; Donahoe, P. K. and Cunha, G. R. 1992. Effect of human recombinant mullerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during mullerian duct regression in the rat. *Endocrinology* 131: 1481-1488.
- x Ukeshima, A. 1996. Germ cell death in the degenerating right ovary of the chick embryo. *Zool. Sci.* 13: 559-563.
- x Wibbels, T.; Wilson, C. and Crews, D. 1999. Müllerian duct development and regression in a turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Herpetol.* 33 (1): 149-152.
- x Wilson, J.; George, F. and Griffin, E. 1981. The hormonal control of sexual developmental. *Science* 211: 1278-1284.,

x Wartenberg, H.; Winsky, Y. ; Viebahn, C. and SchMoke, C. 1991. Fine structural characteristics of testicular cord formation in the development rabbit gonad. *J. Electron Microsc. Tech.* 19: 133-15.