

03062
13
2eje.

Universidad Nacional Autónoma de México

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS
Y HUMANIDADES

ANGIOGENESIS Y
DIFERENCIACION SEXUAL EN
LAS GONADAS DE RATON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA:

ENRIQUE SALAS VIDAL

Departamento de Biología del Desarrollo
Instituto de Investigaciones Biomédicas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar al Dr. Horacio Merchant Larios por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por el apoyo que recibí de él para la realización de la presente tesis. Al Dr. Gabriel Corkidi coasesor del presente trabajo por el apoyo y la asesoría en la parte de análisis de imágenes.

Quiero agradecer a los demás miembros de mi comité tutorial por su asesoría a lo largo del trabajo de investigación Dr. Luis Covarrubias y Dr. Alejandro García.

También al jurado que revizó y corrigió el trabajo escrito:

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| Presidente: | Dr. Horacio Merchant Larios. |
| Vocal: | Dr. Gregorio Pérez Palacios. |
| Secretario: | Dra. Irma Villalpando Fierro. |
| Suplente: | Dr. Gabriel Issac Corkidi Blanco. |
| Suplente: | Dr. Jesús Manuel León Cázares. |

También agradezco a José Guadalupe Baltazar (a quien deberían beatificar), a Diana María Escalante Alcalde por adoptarme cuando entré al laboratorio, a todos mis compañeros del mismo por sus comentarios y su apoyo: Norma Moreno, Alejandro Marmolejo, Rosa María Vigeras, Salvador Ruiz, Arturo Salame, Alejandra Nuñez y a Denhí Schnabel.

Agradezco a Catherine Butterfield y al Dr. Judah Folkman por la asesoría para el cultivo de células endoteliales.

Quiero agradecer de manera muy especial a toda la gente que me apoyó a lo largo de la realización de la presente tesis en diferentes formas como al Dr. Lino Díaz de León , a Jorge Pérez de la Mora, al personal administrativo, de compras y de la biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Al personal del rastro de Milpa Alta y de Temamantla.

A mis padres Teresa y Guillermo

A Denhí

CONTENIDO

I. INTRODUCCION

- A. FORMACION DE LAS GONADAS EN MAMIFEROS
- B. DIFERENCIACION DE LAS GONADAS EN MAMIFEROS.
- C. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA DIFERENCIACION DEL TESTICULO.

II. HIPOTESIS

III. OBJETIVOS

IV. MATERIALES Y METODOS

- A. EXTRACCION Y CULTIVO *IN VITRO* DE CELULAS ENDOTELIALES DE AORTA DE BOVINO (CEAB)
- B. EXTRACCION DE COLAGENA DE COLA DE RATA
- C. CULTIVO DE CELULAS ENDOTELIALES EN MATRICES TRIDIMENSIONALES DE COLAGENA
- D. ANIMALES
- E. DISECCION DE GONADAS DE EMBRIONES DE RATON
- F. DETERMINACION DE LOS ESTADIOS DEL DESARROLLO Y SEXADO DE LOS EMBRIONES
- G. ENSAYO DE ANGIOGENESIS
- H. PROCESAMIENTO DE TEJIDOS PARA INCLUSION EN EPON. MICROSCOPIA DE LUZ Y DE ALTA RESOLUCION
- I. CRIOPRESERVACION DE TEJIDOS Y CORTES AL CRIOSTATO
- J. INCLUSION EN PARAFINA Y TINCION CON EL FLUOROGENO HOECHST 33258
- K. QUIMERAS RATA-RATON EN LA DIFERENCIACION DEL TESTICULO
- L. INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA DETECCION DE LAMININA
- M. CITOQUIMICA PARA LA DETECCION DE $\Delta 5-3\beta$ -HSD
- N. ANALISIS MORFOMETRICO DE COMPLEJOS UROGENITALES

V. RESULTADOS

- A. EXTRACCION Y CULTIVO *IN VITRO* DE CELULAS ENDOTELIALES DE AORTA DE BOVINO
- B. CULTIVO DE CELULAS ENDOTELIALES EN MATRICES TRIDIMENSIONALES DE COLAGENA
- C. CULTIVO *IN VITRO* DE GONADAS DE EMBRIONES DE RATON SOBRE MATRICES DE COLAGENA
- D. ENSAYO DE ANGIOGENESIS
- E. IDENTIFICACION DEL ORIGEN DE LAS CELULAS

**PRESENTES EN LAS ESTRUCTURAS TIPO CAPILARES
ORIENTADAS (ETCO).**

F. QUIMERAS RATA-RATON

G. MORFOMETRIA DE GONADAS DE RATON DE 11, 12 Y 13 DPC

VI. DISCUSION.

A. ANGIOGENESIS

B. QUIMERAS

C. MORFOMETRIA

VII. CONCLUSIONES

VIII. BIBLIOGRAFIA

I. INTRODUCCION

A. FORMACION DE LAS GONADAS EN MAMIFEROS

En el ratón el desarrollo gonadal comienza a los 9.5 días post coito (dpc) en la parte ventral de la región mesonéfrica. Se desconoce si en esta región existen genes determinantes de la formación de las gónadas, que regulen su especialización morfológica y fisiológica (Jost y Magre, 1988). La gónada indiferenciada queda constituida a los 10 dpc y está formada por dos componentes, el germinal y el somático.

Se sabe, que las células germinales primordiales tienen un origen extraembrionario. Las células germinales provienen de la región del endodermo del saco vitelino (Jones y Scott, 1971 y Merchant-Larios y Zamboni, 1973) y migran hasta las crestas gonadales por mecanismos aún desconocidos (Zamboni et al., 1979). La formación de la gónada indiferenciada no depende de la presencia de células germinales (Merchant, 1975), lo que indica que ésta se lleva a cabo exclusivamente bajo la interacción entre células del componente somático. Existe controversia con respecto del origen de las células somáticas de la gónada (Tabla 1). Witschi en 1951 propuso que el ovario se forma por una proliferación de la corteza (o epitelio celómico) y que el testículo se forma por el desarrollo de la médula (mesénquima que se condensa del blastema mesonéfrico).

Gillman en 1948 en cambio, propuso que la gónada indiferenciada se origina exclusivamente por un engrosamiento del epitelio celómico.

Finalmente se ha propuesto que tanto el epitelio celómico como el mesénquima subyacente, participan en la formación de la cresta gonadal (Gruenwald, 1942; Pinkerton *et al.*, 1961; Merchant, 1979, Jost y Magre, 1988).

| | EPITELIO | MESENQUIMA |
|---|--|-----------------------------------|
| Witschi, 1951 | Su engrosamiento forma ovarios | Su engrosamiento forma testículos |
| Gillman, 1948 | Primera proliferación forma testículos, la segunda ovarios. | |
| Gruenwald, 1942 Pinkerton et al., 1961 | Ambos componentes participan en la formación de la gónada indiferenciada | |

Tabla 1.-Teorías de la participación del epitelio celómico y mesénquima del mesonefros, en la formación de la gónada indiferenciada.

Por otro lado, la contribución del mesonefros a la formación de la gónada indiferenciada no es clara. Algunos autores proponen que los túbulos mesonéfricos aportan células a la formación del primordio gonadal, basándose principalmente en la evidencia histológica; microscopía de luz y electrónica (Witschi, 1951, Zamboni *et al*, 1979; Upadhyay *et al*, 1979; Wartenberg *et al*, 1991).

Sin embargo Merchant *et al*. (1984), utilizando embriones de pollo, demostraron que aún cuando se inhiba la formación de los túbulos mesonéfricos (por métodos mecánicos), la gónada indiferenciada se desarrolla adecuadamente.

**B. DIFERENCIACION
DE LAS
GONADAS EN
MAMIFEROS**

A los 12 dpc la diferenciación sexual morfológica de las gónadas del ratón es evidente. Los testículos se reconocen debido a que los cordones epiteliales internos se separan del epitelio celómico por el incremento del tejido estromático como: vasos sanguíneos, células mioides y mesénquima (Witschi, 1951; Merchant, 1975, 1984 y Lovell-Badge, 1992). En cambio, los ovarios de la misma edad se mantienen histológicamente similares a la gónada indiferenciada. La proliferación del estroma ocurre en etapas posteriores de su desarrollo (Witschi, 1951; Jost *et al*, 1973 y Merchant, 1984).

Ya en 1988 Jost y Magre, encontraron que la diferenciación gonadal comprende dos fenómenos diferentes, por un lado la morfogénesis y por el otro, la diferenciación de las células somáticas. Estos fenómenos pueden ocurrir por separado, es decir, puede haber morfogénesis sin diferenciación de células somáticas o *vice versa*. La independencia de estos procesos ha sido reafirmada por los estudios recientes de cultivos *in vitro* de gónadas de ratón de 11 dpc (gónada indiferenciada) (Merchant *et al.*, 1993). En gónadas aisladas, después de 96 horas de cultivo se diferencian células de Sertoli y de Leydig, aún en ausencia de la morfogénesis típica del testículo (Merchant *et al.*, 1993).

El primer tipo celular en diferenciarse dentro del testículo son las células de Sertoli (Jost *et al.*, 1973; Merchant y Taketo, 1991), las cuales secretan la hormona antimülleriana (HAM) que provoca la regresión de los conductos de Müller en el tracto urogenital masculino (Jost *et al.*, 1973; Kofman *et al.*, 1982 y Lovell-Badge, 1992).

C. FACTORES
QUE INTERVIENEN
EN LA
DIFERENCIACION
DEL TESTICULO

En los mamíferos se ha identificado recientemente el factor determinante del testículo (FDT), que está contenido en el brazo corto del cromosoma Y, al cual se le ha denominado *Sry* ("sex determining region of the chromosome Y"), en ratones y *SRY* en humanos (Koopman *et al.*, 1990; McLaren, 1990).

En los humanos se han reportado casos clínicos de hombres genotípicamente XY pero con fenotipo femenino. En estos pacientes se encontró que el gene *SRY* esta incompleto, lo que aparentemente genera un producto no funcional (Jäger *et al.*, 1990).

En los ratones originalmente se encontró que el gene *Sry* se expresa en los primordios gonadales machos (10.5 dpc), y deja de expresarse una vez que se ha diferenciado el testículo (12.5 dpc) (Koopman *et al*, 1990). Sin embargo, diferentes estudios recientes indican que el gen *Sry* se expresa desde la etapa de dos blastómeros (Zwingman *et al*, 1993).

Además se han generado ratones transgénicos para *Sry*, utilizando como hospedero al cromosoma X, que originan hembras transgénicas con fenotipo masculino (Koopman *et al*, 1991). Este último experimento es el más importante para proponer al *Sry* como "factor determinante de testículos" (FDT).

Se ha mostrado que *Sry* codifica una proteína que se une al ADN, porque contiene sitios de homología con las proteínas de alta movilidad (HMG) (Koopman *et al*, 1991). Por su capacidad de unión al ADN se ha propuesto que *Sry* inicia una cascada de expresión génica, la cual trae como consecuencia la diferenciación testicular (McLaren, 1990)

A pesar de que *Sry* pueda ser el FDT, los factores que siguen en la cascada de expresión para promover la diferenciación testicular son aún desconocidos. Una de las primeras hipótesis de cómo se diferencian las gónadas, fue propuesta por Witschi en 1951. El pensaba que las diferencias morfogénicas se originaban por una competencia cortico-medular, dependiendo de qué tejido se desarrollaba, la corteza o la médula, se generaba un ovario o un testículo, respectivamente.

Merchant-Larios *et al* en 1984 y 1993, proponen que la gónada indiferenciada macho secreta factores que promueven la invasión tanto de mesénquima, como de vasos sanguíneos

provenientes de la región mesonéfrica, lo cual provoca la morfogénesis del testículo.

Buehr *et al* en 1993, demostraron que las células del mesonefros invaden al testículo durante su morfogénesis. Además Merchant *et al* en 1993, utilizando mesonefros marcados con timidina tritiada unidos a gónadas aisladas sin marcar, demostraron que al menos dos tipos celulares provienen de la región mesonéfrica, las células mioides y los endotelios. Por otro lado diversos autores (Mittwoch y Delhanty, 1969 y Zwingman *et al*, 1993), proponen que el FDT (*Sry*) promueve un crecimiento acelerado en los embriones macho y en el caso particular del testículo esto provoca que aún en estado indiferenciado, el primordio testicular tenga un volumen mayor que la gónada indiferenciada hembra de la misma edad. Por lo que el crecimiento acelerado de todos los tejidos gonadales en el macho, provoca la diferenciación de éste órgano como testículo. Sin embargo, Merchant-Larios en 1978 propone que el crecimiento acelerado en el testículo, comparado con el ovario, no es un crecimiento general del primero sino que se debe a un aumento del componente estromático. De manera que al inicio de la diferenciación del testículo el componente epitelial ocuparía el mismo volumen en ambos sexos.

II. HIPOTESIS

El presente trabajo se basa en la hipótesis de que la gónada indiferenciada macho secreta factores angiogénicos entre los 11 y 12 dpc, los cuales actúan como "morfógenos". Se propone que estos morfógenos promueven la invasión y/o proliferación tanto de vasos sanguíneos como de mesénquima, provocando así la separación de los cordones epiteliales del epitelio celómico del testículo (Merchant-Larios, 1984; Merchant-Larios *et al.*, 1993) (Figura 1).

Lo anterior tendría como consecuencia que el aumento en volumen en los testículos a los 12 dpc (comparado con los ovarios), se deba principalmente a una proliferación/invasión del componente estromático y no a un aumento del componente epitelial (Merchant-Larios, 1978).

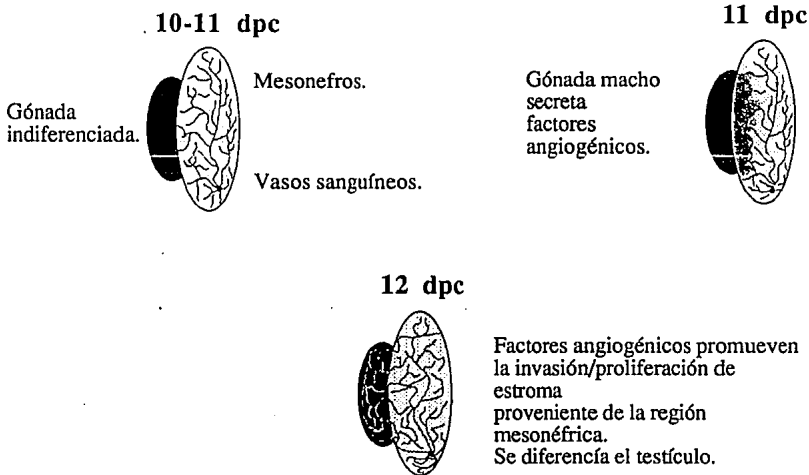


Figura 1- Hipótesis sobre el posible papel de la angiogénesis en la diferenciación sexual de las gónadas del ratón, acorde a lo propuesto por Merchant-Larios (1984, Merchant-Larios *et al.*, 1993).

III.OBJETIVOS

Objetivo general:

Establecer el papel de la angiogénesis y la relación epitelio-mesénquima en el inicio de la diferenciación sexual de las gónadas del ratón.

Objetivos particulares:

A) Comparar la capacidad angiogénica de complejos urogenitales y gónadas aisladas de los dos sexos, en diferentes estadios del desarrollo, cultivadas sobre matrices de colágeno con endotelios.

B) Determinar el volumen ocupado por el estroma y el componente epitelial en la gónada indiferenciada y diferenciada, haciendo uso de un sistema de análisis de imágenes, para determinar si en la diferenciación del testículo el aumento en volumen se debe principalmente a una invasión/proliferación del componente estromático.

C) Evaluar si la vascularización predominante en los testículos se debe a un aumento en el número de vasos sanguíneos o bien a una hipertrofia de los mismos, esto se intenta determinar con el sistema de análisis de imágenes.

IV. MATERIALES Y METODOS

A. EXTRACCION Y CULTIVO IN VITRO DE CELULAS ENDOTELIALES DE AORTA DE BOVINO (CEAB)

Para este estudio se emplearon reses recién sacrificadas, con apariencia sana, musculosas, de carne color claro y sin parásitos evidentes. De estas se extrajo una porción de la aorta dorsal de aproximadamente 30 centímetros (cm), obturando previamente los extremos con hemóstatos, para así evitar contaminaciones por el contacto de la luz del vaso sanguíneo con el medio exterior.

La aorta se procesó sobre una charola metálica estéril, retirando el tejido adventicio, para localizar y cerrar las arterias laterales con hemostatos. Las aortas limpias se desinfectaron (en su parte externa) con etanol al 70%. Posteriormente se les inyectó 20 mililitros (ml) de medio de transporte estéril (NaCl 0.14 M, KCl 0.004 M, amortiguador de fosfatos 0.001 M pH 7.4 y glucosa 0.011 M) (Jaffe *et al.*, 1973).

Las aortas fueron transportadas dentro de una charola metálica estéril, en hielo para mantener frío al tejido y así procesarlo dentro de las tres horas siguientes.

Una vez en el laboratorio se preparó medio DMEM (GIBCO) con colagenasa tipo II (SIGMA), 1 miligramo (mg) por cada ml, y se esterilizó por filtración (Millipore 0.25 micrómetros (μm) de poro)

En la campana de flujo laminar, se lavó el exterior del tejido con etanol al 70%. Se cortaron los extremos de la aorta con tijeras y se lavó la luz con 500 mililitros (ml) de PBS-antibióticos (estreptomina 100 microgramos (μg) y penicilina 100 unidades (U) por cada ml).

La extracción de células endoteliales de aorta de bovino (CEAB) se realizó siguiendo la técnica de Madri *et al.* 1988, pero se utilizó medio DMEM en lugar de E199.

Las aortas lavadas se incubaron durante media hora con DMEM-Colagenasa a temperatura ambiente. Posteriormente se

tiró el medio y se añadió medio completo (DMEM, suero de ternera al 10 %, estreptomycin-penicilina y L-glutamina a 2 mM). Con el medio completo se dio un masaje suave, y el medio con las CEAB se vertieron en cajas de 25 cm² (Costar, Ma, USA).

Se dejó que las células se adhirieran durante 24 horas (hr) después de las cuales se les cambió el medio por medio fresco. Las células endoteliales fueron cultivadas en monocapa en medio completo, sobre portaobjetos multipozos de cultivo (Lab-Tek Products, Naperville, Il.), hasta llegar a confluencia. Para la verificación de la identidad de los endotelios se utilizó el lipopolisacárido de baja densidad, acetilado y acoplado al fluorógeno DiI (DiI-AC-LDL, BTI, Stoughton, Ma), éste se diluyó asépticamente a una concentración final de 10 µg/ml de medio completo y se reemplazó por el medio contenido en los portaobjetos multipozos. Se incubó a 37°C durante 4 horas. Posteriormente se removió el medio con DiI-Ac-LDL y se lavó tres veces con PBS. Se fijó con formaldehído al 3% en PBS por 20 min a temperatura ambiente.

Se lavó con agua destilada por 5 segundos (seg) y se dejó secar. Las laminillas se montaron en glicerol al 90% en PBS. Se observaron al microscopio de fluorescencia con filtro de rodamina (Nikon, Japón).

Modificado de Voyta *et al* en 1984.

B. EXTRACCION DE COLAGENA DE COLA DE RATA

Las colas de rata se esterilizaron por inmersión en etanol al 70% durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se extrajeron los tendones en campana de flujo laminar. Se desinfectaron en etanol al 70%, 30 min.

La colágena de los tendones estériles (5 gramos (gr) por cada litro (lt)) se extrajo por agitación en ácido acético 0.017 M (1:1000), a 4°C durante 48 hrs.

Finalmente se centrifugó la solución de colágena en una centrífuga Sorvall a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) por 1 hr a 4°C y se recuperó el sobrenadante.

Para la titulación de la colágena se mezcló un volumen de la solución de colágena con un volumen de medio DMEM 2X con HEPES 25 mM y bicarbonato de sodio 2X. A esta solución se le añadió el volumen necesario de NaOH 0.34 N para tener un pH de 7.4. Se dejó gelificar en una estufa de cultivo a 37°C, con atmósfera aire 95% y CO₂ al 5%.

C. CULTIVO DE
CELULAS
ENDOTELIALES
EN MATRICES
TRIDIMENSIONALES
DE COLAGENA

Las células endoteliales fueron cultivadas en monocapa y tripsinizadas al llegar a confluencia, con tripsina al 0.25% en PBS. Posteriormente fueron resuspendidas en DMEM ST 10%, con antibióticos. De esta suspensión se tomó una muestra y se tiñó con el colorante vital azul de toluidina. La viabilidad y concentración de CEAB se calculó en una cámara de Neubauer "mejorada" (Freshney, 1988).

Las células endoteliales se resuspendieron en una solución de colágena-DMEM en relación 1:1 y ST 10%, a una concentración de aproximadamente 415,000 células por ml de matriz de colágena.

La suspensión se transfirió a una caja petri de 35 milímetros (mm) de diámetro (Costar, Ma), la cual tenía un volumen previo igual de colágena sola. La suspensión se dejó gelificar en una estufa de cultivo a 37°C, con atmósfera húmeda y CO₂ al 5%.

D. ANIMALES

Los ratones CD1 (Miles, Quebec) adultos y las ratas Wistar, se mantuvieron en un cuarto con fotoperíodo controlado de 12 hrs de luz y 12 hrs de oscuridad, recibiendo agua y comida *ad libitum*.

Para las cruces, se puso 1 ratón (o rata) macho con 4 hembras por caja toda la noche. A la mañana siguiente se revisaron a las hembras. Las que presentaron un tapón de coito

fueron separadas en cajas etiquetadas, para tener control de la fecha de cruce. Ese día se tomó como día cero de gestación.

**E. DISECCION DE
GONADAS DE
EMBRIONES DE RATON**

De ratonas preñadas de 11 y 12 dpc y sacrificadas por dislocación cervical, se disecó el útero con embriones. En la campana de flujo laminar los embriones junto con las estructuras extra embrionarias fueron puestos en medio L15 (Microlab, México) con suero bovino fetal al 10% (GIBCO) y antibióticos (Microlab, México).

Bajo el microscopio estereoscópico (Nikon, Japón), se les extrajo el amnios para sexar a los animales (ver técnica de sexado más adelante). El estadio del desarrollo se determinó con la tabla de McLaren y Buehren de 1990, que se describe más adelante. Por otro lado se separó la región dorsal posterior con ayuda de un bisturí, para exponer los complejos urogenitales, y disectarlos con tijeras de microcirujía. Los complejos disecados se mantuvieron en L15 completo.

Las gónadas se aislaron del mesonefros utilizando agujas de jeringas de insulina (25 x 16mm) como microbisturís, bajo el microscopio estereoscópico de luz transmitida (Nikon, Japón).

**F. DETERMINACION
DE LOS ESTADIOS DEL
DESARROLLO Y
SEXADO DE LOS
EMBRIONES**

Para tener un control más preciso del estadio del desarrollo en que fueron utilizados los embriones, se recurrió a la serie de desarrollo embrionario de las extremidades posteriores elaborada por McLaren y Buehr en 1990, la cual cubre los distintos períodos comprendidos en la diferenciación sexual del ratón, entre los 10.5 y 12.5 dpc (Figura 2).

El método para el sexado fue tomado de Palmer y Burgoyne de 1991. El amnios extraído de los embriones disecados, se fijó inmediatamente en metanol-ácido acético 1:1, teniendo cuidado de no dejar secar el tejido. Se mantuvieron a 4°C.

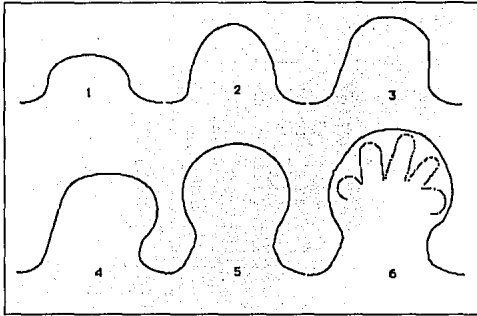


Figura 2- Estadios del desarrollo embrionario en ratón, acorde con la tabla elaborada por McLaren y Buehr (1990), tomando como referencia a la extremidad posterior. 1 y 2, 10 dpc. 3, 4 y 5, 11 dpc. 6, 12 dpc.

Los tubos fueron centrifugados 3 minutos a 1,500 rpm; y el sobrenadante decantado, procurando dejar el amnios a 1 o 2 centímetros de la base del tubo.

Se aplicó una gota de ácido acético glacial al 60% en agua, directamente sobre el amnios, y con la ayuda de una pipeta Pasteur, sellada por calor, se disoció el tejido durante 60 segundos, después de los cuales, la acción del ácido acético fue bloqueada con 1 ml del fijador.

Las células fueron centrifugadas 5 min a 1500 rpm, y con la ayuda de una pipeta, se removió el mayor volumen posible de líquido, dejando únicamente una o dos gotas aproximadamente, con la cual el botón de núcleos fue resuspendido y puesto sobre un portaobjetos limpio.

Al secarse el portaobjetos (al aire), se aplicó una gota de solución de azul de toluidina al 1%, sobre el portaobjetos, y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos limpio, para revisar las muestras al microscopio de luz (Nikon, Japón) y determinar el sexo por la presencia de la cromatina sexual.

G. ENSAYO DE ANGIOGENESIS

Las gónadas de ratón (de 11 y 12 dpc) aisladas o los complejos urogenitales, fueron bañados en DMEM completo con HEPES. Posteriormente se cultivaron en matrices de colágena con o sin CEAB. (Figura 3).

DISECCION DE
TENDONES DE
COLA DE RATA.



EXTRACCION DE
COLAGENA CON
AC. ACETICO.



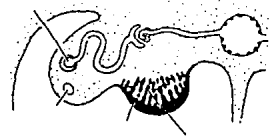
ENDOTELIOS DE AORTA
BOVINO, TRATADOS CON
COLAGENASA.



ENDOTELIOS CULTIVADOS
EN E199+ST 10%, A 37°C
CO₂ 5%.



EMBRIONES DE RATON
CON GONADAS
INDIFERENCIADAS.



DISECCION DE
COMPLEJO URO-
GENITAL O
GONADAS.

ENDOTELIOS SE
TRIPSINIZAN

ENDOTELIO:
SUSPENDIDOS EN
SOLUCION DE
COLAGENA

GELIFICAR
A 37°C



GONADAS SOBRE
LA MATRIZ DE
COLAGENA CON
ENDOTELIOS.

Figura 3.- Ensayo de angiogenesis *in vitro* para evaluar la capacidad de induccion de estructuras tipo capilar (ETCO), por gonadas aisladas o complejos urogenitales de raton de 11 y 12 dpc. Técnica modificada de Folkman *et al*, 1989

En los ensayos de angiogenesis, en el material fijado en Karnovsky modificado por la técnica descrita más adelante, se

cuantificó el número de estructuras tipo capilar que se formaron alrededor del tejido (ovario, testículo o mesonefros), con un método semiautomático desarrollado por Alvarez-Buylla y Vicario en 1988. El método consiste en sobreponer la imagen de un monitor monocromático de una IBM PC-XT, que gráfica un eje de coordenadas, sobre la imagen de la preparación que se esté observando bajo un microscopio Nikon, con ayuda de una cámara lúcida. De esta manera se pueden marcar y cuantificar las estructuras que se señalen con el cursor de la computadora.

**H. PROCESAMIENTO
DE TEJIDOS PARA
INCLUSION EN EPON.
MICROSCOPIA DE LUZ
Y DE ALTA
RESOLUCION**

Las gónadas o los mesonefros se fijaron en Karnovsky modificado (glutaraldehído, paraformaldehído, cacodilato de sodio) durante 1 hora a 4°C (Karnovsky, 1965). Se lavaron una hora a 4°C con amortiguador de cacodilatos de sodio (0.1M pH 7.3). Se post fijaron con tetróxido de osmio 1% (Zetterqvist, 1956), una hora a 4°C., y se deshidrataron en alcoholes graduales (70 al 100%) (todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente excepto en donde se indica lo contrario) 10 minutos en cada uno, se pasaron por 2 cambios de óxido de propileno de 20 minutos, y se impregnaron en EPON óxido de propileno, 1:1 y 2:1 una hora en cada proporción, para posteriormente incluir los tejidos en EPON puro 812 a 60° C durante 12 horas.

Para el análisis histológico de los cortes semifinos (1.5 µm de espesor) y finos (de 60 a 90 nm) se obtuvieron en un ultramicrotomo III 8800 LKB. Los cortes semifinos se tiñeron por flotación en azul de toluidina al 0.5%, y se lavaron en agua destilada o se destiñó el exceso con etanol absoluto, para montarlos finalmente en portaobjetos para su estudio en microscopía de luz. Las observaciones y fotografías fueron tomadas en un microscopio de luz OPTIPHOT (NIKON, Japón).

Los cortes finos fueron montados en rejillas de cobre, y contrastados 5 minutos con acetato de uranilo al 2.5% en agua

destilada y 1 minuto con citrato de plomo alcalino. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico EM-9 (ZEISS, Alemania), y el análisis de los resultados se realizó sobre las micrografías electrónicas tomadas.

I. CRIOPRESERVACION
DE TEJIDOS Y CORTES
AL CRIOSTATO

Los experimentos de quimeras rata-ratón se congelaron en Tissue-Tek (Miles, USA), con hielo seco en hexano. Se hicieron cortes de 6 μm en un criostato Cryo-Cut (American Optical, USA), y se montaron en portaobjetos cubiertos con Vecta-Bond (Vector, USA). Se detectó la deposición de laminina con inmunohistoquímica (ver más adelante).

J. INCLUSION EN
PARAFINA Y TINCION
CON EL FLUOROGENO
HOECHST 33258

Para la inclusión en parafina se fijaron los tejidos en Karnovsky modificado por 1 hora a 4°C. Se lavaron durante 30 minutos en agua corriente. Se deshidrataron en alcohol gradualmente (50, 70, 80, 90 y 100%). Se pasó el tejido por las siguientes mezclas: alcohol:xilol (1:1) 1 hora, xilol puro 1 hora, xilol:parafina (1:1) 1 hora a 60°C, xilol:parafina(1:2) 1 hora a 60°C, parafina pura toda la noche a 60°C.

Se incluyeron en parafina y se hicieron cortes seriados en un micrótopo (American Optical). Los cortes se flotaron en agua con gelatina (1% aproximadamente) a 45°C y se montaron en portaobjetos.

Se desparafinaron a 60°C, con dos cambios de xilol de 10 minutos cada uno. Se rehidrataron en alcoholes decrecientes (100, 90, 80, 70, 50 %) 10 minutos en cada uno. Se les dio un paso rápido en agua destilada y finalmente se pasaron por solución Hanks por 10 minutos para continuar con la tinción con Hoechst 33258.

El método de tinción fue modificado de Cunha y Vanderslice de 1984. Los cortes obtenidos al criostato o de parafina, se dejaron 10 min en la solución balanceada de Hanks (SBH) sin rojo fenol, a 4°C. Se tiñeron por 20 segundos en Hoechst 33258 (Sigma, USA) 4 $\mu\text{g/ml}$ de SBH a 4°C. Se lavaron

en agua bidestilada corriente por 1 minuto y se montaron en amortiguador de McIlvaine (solución A de ácido cítrico 0.1 M, y la solución B de fosfato disódico 0.2 M, mezclar 122.9 ml de A y 77.1 ml de B pH 5.5). Los cubreobjetos fueron sellados con barniz de uñas transparente.

Las muestras se observaron con epifluorescencia en un microscopio OPTIPHOT (Nikon, Japón), con un filtro UV2A. Las células del ratón se identificaron debido a la presencia de abundantes gránulos fluorescentes en el núcleo, a diferencia de las células de otras especies de mamífero (bovino, rata o humano) que tienen un patrón de tinción homogéneo. Los nucléolos se distinguieron por su gran tamaño y su baja intensidad de fluorescencia.

K. QUIMERAS RATA-
RATON EN LA
DIFERENCIACION DEL
TESTICULO

Las gónadas y los mesonefros de ratón (de 11 dpc) y de rata (de 12 y 13 dpc) se disectaron bajo el microscopio estereoscópico por la técnica descrita anteriormente. Brevemente: se sacrificaron por dislocación cervical ratonas preñadas de 11 dpc y ratas de 12 y 13 dpc, de las cuales el útero fue disecado. Dentro de la campana de flujo laminar, los embriones fueron separados del útero y la placenta, dejando el amnios para el sexado.

Bajo el microscopio estereoscópico (Nikon, Japón), se separó el amnios para sexar a los embriones, el estadio del desarrollo de los embriones fue verificado conforme a la tabla elaborada por McLaren y Buehr en 1990. La región dorsal caudal fue separada con bisturí para exponer las gónadas y los complejos urogenitales fueron disecados.

Posteriormente las gónadas fueron separadas del mesonefros con la ayuda de agujas de jeringas de insulina, apoyando los complejos urogenitales sobre silicones transparentes, bajo el microscopio de luz transmitida, lo cual permitió diferenciar fácilmente a la gónada del mesonefros,

debido a que este último tejido es un poco más opaco que las gónadas (Buehr *et al*, 1993)

Las gónadas o los mesonefros aislados de rata se unieron con las gónadas o los mesonefros de ratón y se cultivaron sobre filtros de policarbonatos, flotando sobre medio McCoy con SBF al 10%, en una estufa de atmósfera controlada con CO₂ al 5% a 37°C, durante 96 horas. Después de este tiempo el tejido se congeló en Tissue Tek, se cortó al crióstato y se determinó la formación de cordones epiteliales por inmunohistoquímica contra laminina, además se determinó el origen del estroma que separa a los cordones epiteliales utilizando la técnica de tinción con Hoechst 33258.

L. INMUNOHISTO-
QUIMICA PARA LA
DETECCION DE
LAMININA

El método fue tomado de Merchant *et al*, 1993. Los cortes hechos al criostato de tejidos sin fijar, se secaron a temperatura ambiente, después se colocaron en una cámara de vacío a 4°C por 1 hora. Los cortes fueron lavados 4 veces en amortiguador de fosfatos (AF) (NaH₂PO₄-H₂O 1.38%, Na₂HPO₄-7H₂O 5.37%, total al 1% pH 7.4) con albúmina sérica bovina (ASB) (Sigma) al 1% (AF-Albumina). Se incubaron con anticuerpo policlonal de conejo antilaminina (Sigma), en AF-Albúmina al 0.5 % (1:500) por 2 horas. Se lavaron 4 veces en AF y se incubaron en reactivos Vectastain ABC kit (Vector, USA) acorde con el instructivo del proveedor.

M. CITOQUIMICA
PARA LA DETECCION
DE Δ5-3β-HSD

El procedimiento fue tomado de Merchant *et al*, 1993. Para la detección de células de Leydig, se utilizó el sustrato dehidro-epiandosterona, la cual da una reacción de color azul en presencia de la enzima Δ5-3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, enzima característica de las células esteroideogénicas como las células de Leydig (Levy *et al*, 1959). Con este sustrato se incubaron los cortes al crióstato a 37°C durante 1 hora.

N. ANALISIS
MORFOMETRICO DE
COMPLEJOS
UROGENITALES

Se analizaron los cortes longitudinales seriados de complejos urogenitales de embriones de ratón de 11, 12 y 13 dpc, incluidos en EPON, en un sistema de análisis de imágenes HISTOSCAN.5 (BIOCOM, Francia) descrito por Corkidi en 1989 y Hirsh *et al* en 1992, en el cual se capturaron de manera semiautomatizada las imágenes de uno de cada diez cortes de los complejos urogenitales de embriones de 11 y 12 dpc y uno de cada veinte de los complejos urogenitales de 13 dpc. En la captura se marcaron y cuantificaron tres componentes: epitelio, estroma y vasos sanguíneos. Los datos obtenidos se editaron en el procesador de textos Word (IBM), se analizaron en una hojas de cálculo Quatro Pro (IBM) y Claris (Macintosh).

V.RESULTADOS

A. EXTRACCION Y CULTIVO *IN VITRO* DE CELULAS ENDOTELIALES DE AORTA DE BOVINO

Las aortas de bovino fueron disecadas de reses sanas del rastro de Milpa Alta, y se transportaron al laboratorio en medio de transporte a 4°C, con ligeras modificaciones al protocolo de Jaffe *et al* (1973). Una vez en el laboratorio las células endoteliales de aorta de bovino (CEAB), fueron obtenidas tratando la luz de la arteria con colagenasa tipo II (Madri *et al*, 1988). Las células recuperadas fueron cultivadas en medio DMEM completo con suero de ternera inactivado al 10%. Se observó que las células obtenidas formaron pequeñas colonias. Las células proliferaron lentamente durante los primeros 2 días y alcanzaron la confluencia entre los 3 y 4 días de cultivo.

Las celulas endoteliales de cultivos primarios hasta el segundo pase, mostraron un crecimiento rápido y en confluencia presentaron una morfología hexagonal o cuboide. En cultivos post confluentes se observó la aparición de una "red" de células endoteliales alargadas e interconectadas como las descritas por Schor *et al* (1983).

En el presente estudio únicamente se lograron cultivos de las CEAB por lapsos de un mes, correspondiente a 3 resiembras. Las células después de la tercera resiembra podían mantenerse vivas durante semanas. Sin embargo si se realizaba una resiembra más, la mayoría de las células sembradas no llegaban a adherirse al substrato y las pocas que lo hacían dejaron de proliferar, se extendieron y se observó la formación de un gran numero de vacuolas en el citoplasma. Eventualmente morían.

En los experimentos de angiogénesis se utilizaron CEAB correspondientes a la primera resiembra, para así asegurar su crecimiento. Adicionalmente esto garantizaba que fueran principalmente endoteliales, ya que así no se permitió que sobrecrecieran otras células como los fibroblastos.

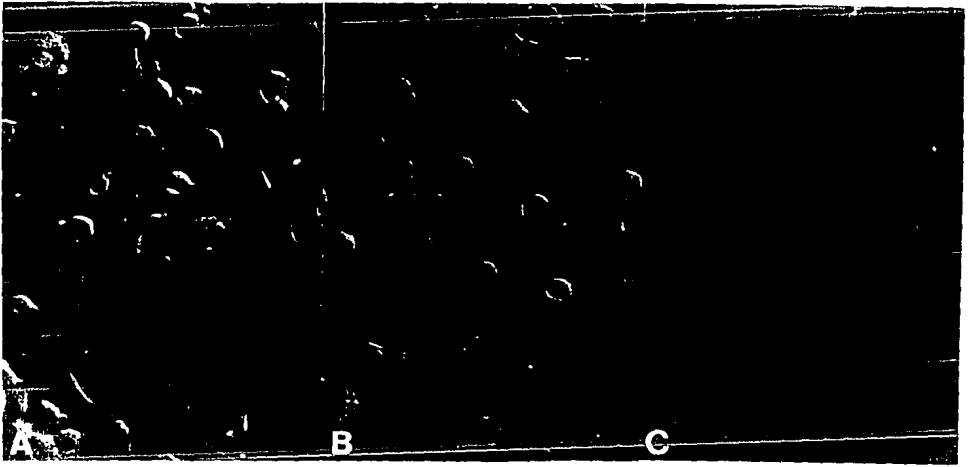


Figura 4- A) CEAB cultivadas en monocapa. Auto fluorescencia. B) CEAB marcadas DiI-Ac-LDL. C) Células 3T3 marcadas con DiI-Ac-LDL. Doble exposición Nomarsky-epifluorescencia. Aumento 20X.

Utilizando como marcador específico de células endoteliales al lipopolisacarido de baja densidad, acetilado y acoplado al marcador fluorescente DiI (DiI-Ac-LDL, BTI, Stoughton, Ma.), se verificó que la mayoría de las células obtenidas en los cultivos primarios eran endoteliales. Este tipo celular se marca intensamente en forma de gránulos citoplasmáticos, que dan una señal muy intensa al observarse bajo el microscopio de fluorescencia, acorde con lo descrito por Voyta *et al* en 1984 (Figura 4B). Como controles se utilizaron células endoteliales sin marcador para verificar la auto fluorescencia (Figura 4A), además de células 3T3 (Figura 4C) y HeLa (amablemente proporcionadas por el Dr. Alejandro García Carrancá). Estas dos últimas al observarse en microscopía de fluorescencia presentaron señales muy débiles (comparadas con las de las células endoteliales), en el citoplasma (3T3) (Figura 4C) o bien en el citoplasma y núcleo (HeLa). (Datos no mostrados).

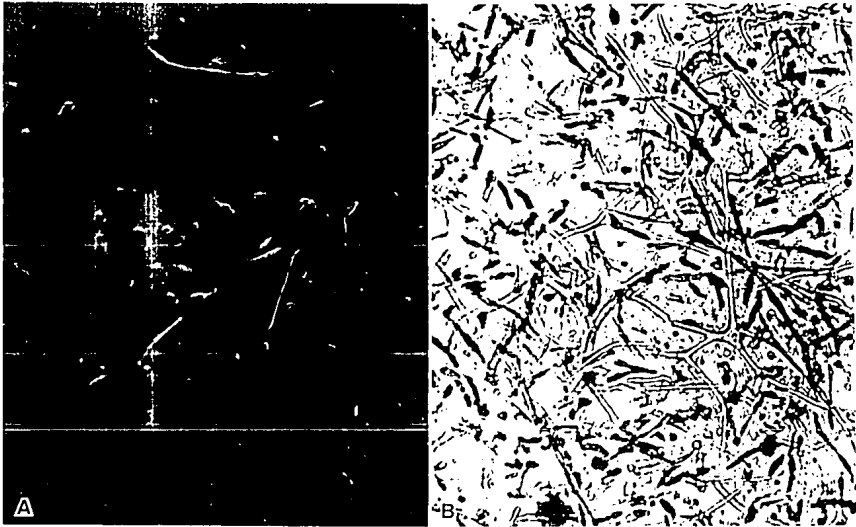


Figura 5- CEAB cultivadas en matrices tridimensionales de colágena de cola de rata. A) Células separadas. B) Células formando redes interconectadas. Aumento 6.3X.

C. CULTIVO DE CEAB
EN MATRICES
TRIDIMENSIONALES
DE COLAGENA

Se obtuvieron células endoteliales en suspensión por tratamiento de cultivos confluentes con tripsina, y se incorporaron en una mezcla de colágena de cola de rata con DMEM, para su cultivo en tres dimensiones. Se encontró que la morfología de las células endoteliales contenidas en la matriz dependía de la densidad a la que eran cultivadas. A densidades menores de 52,000 células viables (verificado por tinción con azul tripán) por ml de matriz de colágena, la mayoría de las células se encontraban aisladas y en forma esférica sin procesos celulares evidentes. A partir de una densidad de 100,000 células/ml de colágena, las células siguieron como una suspensión de células aisladas, sin embargo, la mayoría adoptó una forma de uso bipolar, con un engrosamiento en el centro correspondiente al núcleo. Además presentaron pseudopodios que en su mayoría terminaban en prolongaciones muy finas (Figura 5A). A densidades mayores de 415,000 células/ml, se

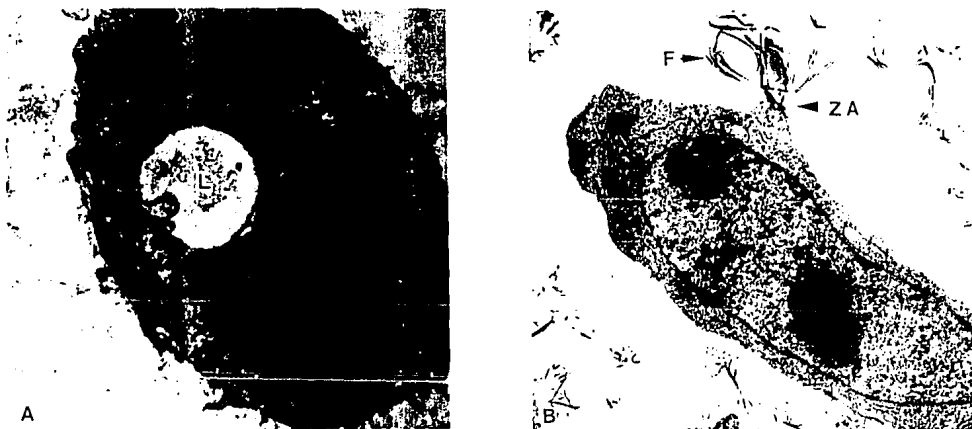


Figura 6- Micrografías de CEAB cultivadas en matrices tridimensionales de colágena de cola de rata. A) Células formando lumen (L). B) Células con zona de anclaje (ZA) a fibras de colágena (F). Amplificación 7,500X.

formaron redes complicadas de células endoteliales interconectadas entre ellas en diferentes puntos (Figura 5B). En el análisis de cultivos de CEAB a nivel de cortes histológicos para microscopía de luz y electrónica, se demostró que las células se encuentran en contacto muy estrecho y frecuentemente encierran espacios con lumen, (característica particular de los endotelios) (Figura 6A). Adicionalmente se observaron las zonas de anclaje de las CEAB a las fibras de colágena (Figura 6B).

C. CULTIVO *IN VITRO*
DE GONADAS DE
EMBRIONES DE RATON
SOBRE MATRICES DE
COLAGENA

En el presente estudio se utilizaron Ratones CD-I. Los machos sementales se dejaron en cajas con dos a cuatro hembras durante toda la noche. A la mañana siguiente se verificó la presencia del tapón de copulación. El día en que se encontró el tapón de cópula se tomó como el día cero de gestación.

Se obtuvieron embriones de diferentes edades de hembras preñadas, correspondientes a los 11 dpc o en etapa de gónada indiferenciada. De estos embriones se recuperó el amnios para el sexado por tinción de núcleos con azul de toluidina (Palmer y Burgoyne, 1991).

Debido a que la hora en que copularon los ratones se desconoce, el control exacto de la edad de los embriones que se disecaban era desconocido. Para tener un control del estadio del desarrollo se utilizó la tabla generada por McLaren y Buher en 1990, la cual se basa en la morfogénesis de las extremidades posteriores (Figura 2).

Los complejos urogenitales indiferenciados de machos y hembras (de 11 dpc), cultivados sobre matrices de colágena *in vitro*, a los 3 días de cultivo se diferenciaron como testículos u ovarios, respectivamente, y presentaron una estructura histológica muy parecida al tejido desarrollado *in vivo* (datos no mostrados) .

Las gónadas o complejos urogenitales de los estadios estudiados en estas condiciones de cultivo se mantuvieron compactos (Figura 7B), a menos que en el momento de ser disecados se dañaran mucho, lo cual evitaba una cicatrización adecuada lo que provocaba una gran migración de células sobre la superficie de la colágena.

Es importante señalar que en estas condiciones la vascularización del explante se desarrolla adecuadamente (datos no mostrados).

Se cultivaron gónadas, mesonefros o complejos urogenitales de embriones de ratón, sobre matrices de colágena que contenían células endoteliales, para verificar la capacidad de estos órganos para inducir atracción o formación de estructuras tipo capilares orientadas (ETCO) (Figura 3). O bien se cultivaron sobre colágena sola como control (Tabla 2).

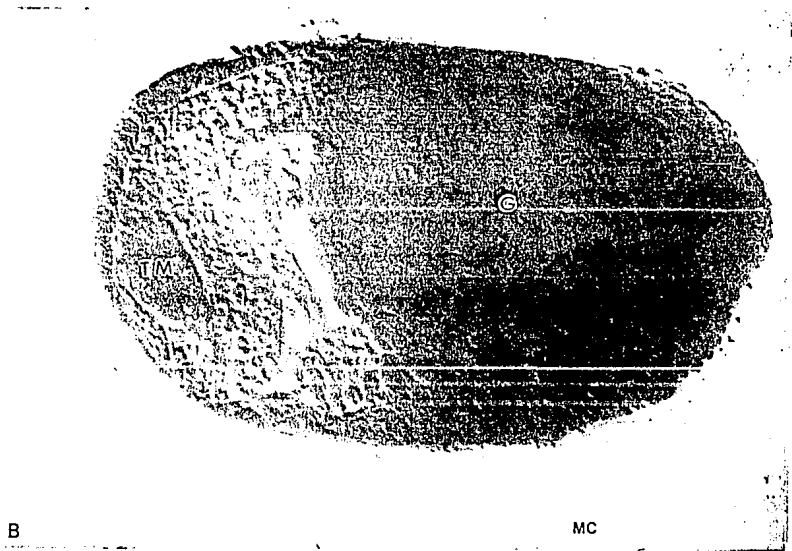
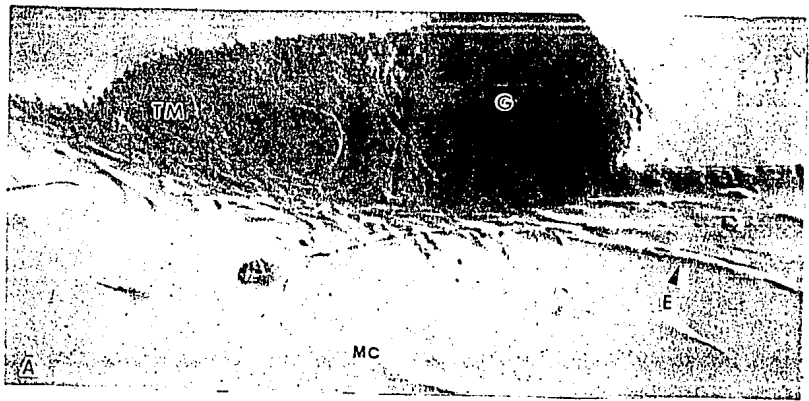


Figura 7- Experimento de angiogénesis in vitro sobre matrices de colágena. A) Corte grueso de complejo urogenital macho sobre colágena con CEAB (E). B) Corte grueso de complejo urogenital macho sobre colágena sola. Gónada (G). Túbulos mesonéfricos (TM). Matriz de colágena (MC). ETCO (E). 20X

Se observó que al cultivar complejos urogenitales en estas condiciones se generan estructuras "tubulares" orientadas hacia los complejos tipo vasos sanguíneos (Figura 7), los cuales a nivel de cortes semifinos y gruesos (estos últimos realizados a mano), se encontró que están formados por hileras de células (Figuras 7A, 8 y 9).

| Angio # | Dpc/est | Cel/ml | Días cond. | Días cult. |
|---------|----------|-------------|------------|------------|
| 1 | 11/7 | EAB/7 | 2 | 3 |
| 5 | 11/4,5 | MES/1.5E5 | 0 | 3 |
| 6 | 10/1,2,3 | EAB/0.9-7E5 | 3 | 1 |
| 16 | 12/6 | EAB/4.2E5 | 3 | 1 |
| 17 | 11/4 | EAB/4.5E5 | 3 | 1 |
| 18 | 11/5 | EAB/4.6E5 | 3 | 1 |

Tabla 2- Experimentos de angiogénesis. Angio #, Experimento de angiogénesis numero. Dpc, días post coito. Est, estadio de desarrollo según Buher y McLaren (1990). Cel, tipo celular en la colágena. EAB, endotelios. Mes, mesonefros disgregado. ml, numero de células viables por ml de matriz de colágena. Días de cond, días de condicionamiento de la colágena con las células que contiene. Días de cult, días de cultivo.

En el experimento # 5 (Tabla 2) se observó que la densidad de las células en cultivo (células de mesonefros de embriones de ratón de 11 dpc), afectaba drásticamente la estabilidad de la matriz de colágena. Aparentemente esto se debió a un cambio en el pH, evidenciado por el cambio en el color del rojo fenol del medio de cultivo, que viró de rojo a amarillo. Lo que provocó a su vez la depolimerización de la colágena.

Por lo anterior se probó el efecto de la densidad de las células endoteliales en la estabilidad de la matriz de colágena. A la densidad más alta, en los tiempos de cultivo estudiados, la matriz fue muy estable a diferencia de lo ocurrido con células de origen mesonéfrico (Angio # 6, Tabla 2).

Por otro lado, se observó que la zona de los complejos urogenitales cultivados, donde sólo había mesonefros, presentó una fuerte respuesta en la formación de ETCO (Fig 8 y 9). Lo anterior podría significar que el mesonefros oculta la respuesta inducida por las gónadas solas.

Debido a lo anterior en los experimentos de angiogénesis 16, 17 y 18 (Tabla 2) se cultivaron gónadas aisladas y por otro lado mesonefros aislados. En estos ensayos se cuantificaron las ETCO, en un sistema de análisis de imágenes semiautomático desarrollado por Alvarez-Buylla y Vicario (1988). En la figura 10 se muestra un ejemplo de las estructuras cuantificado.

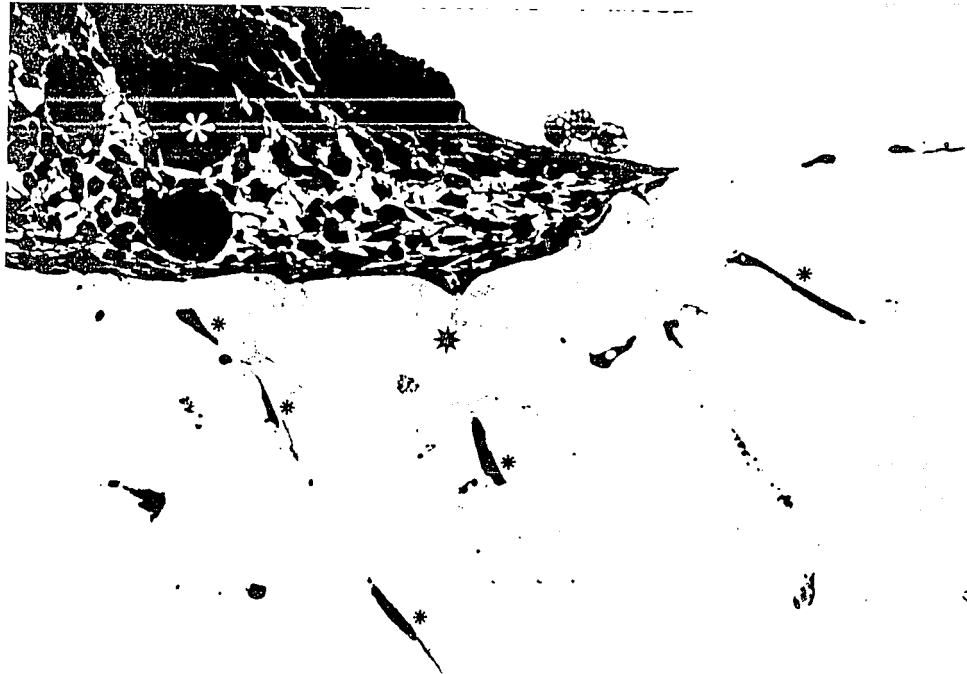


Figura 8- Corte semifino de complejo urogenital macho cultivado sobre colágena (Estrella) con CEAB (Asterisco chico). Se observa solo parte del mesonefros (Asterisco grande). 20X.



Figura 9- Corte grueso de mesonefros macho cultivado sobre colágena (MC) con CEAB, ETCO (E). Túbulos mesonéfricos (TM). 20X.

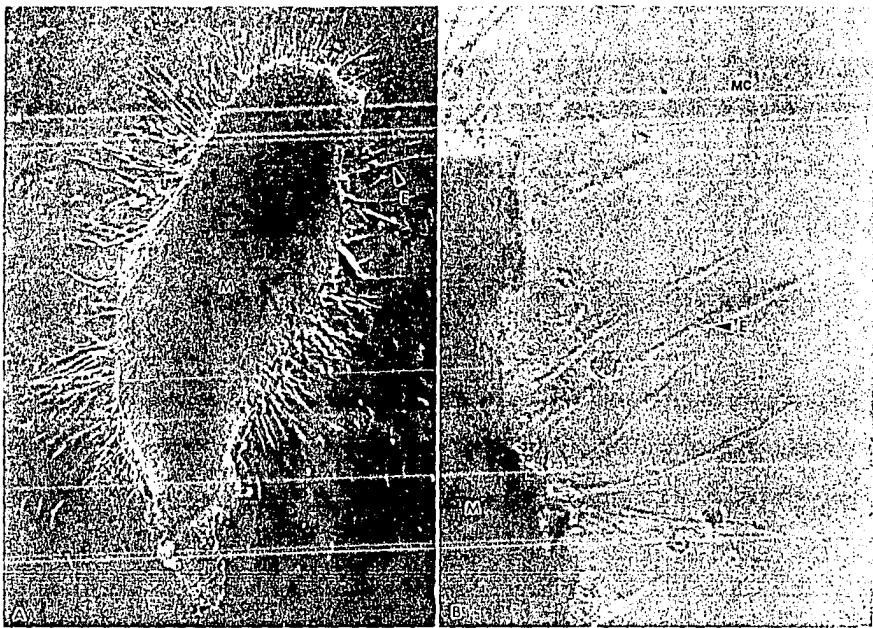
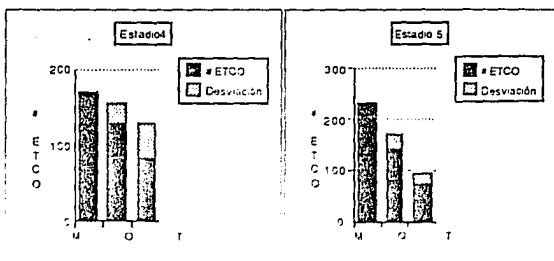


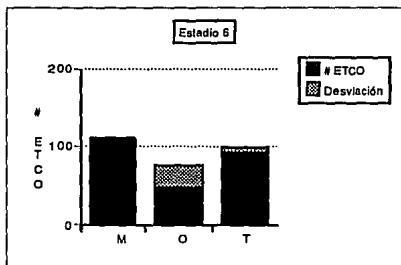
Figura 10- Experimento de angiogenesis in vitro sobre matrices de colágena (MC). A) Mesonefros (M) cultivado en el ensayo de angiogenesis formando estructuras tipo capilares orientados (E) 6.3 X. B) Detalle de A, en el que se observa que las ETCO están formadas por hileras de células. 60X.

Además se cuantificó el perímetro y el área de los explantes estudiados. Los resultados se muestran en las gráficas 1, 2 y 3.

Se observó en los estadios 4 y 5 (angio 17 y 18 respectivamente), correspondientes a gónada indiferenciada temprana y tardía, que el órgano más angiogénico fue el mesonefros aislado, independientemente del sexo. Los ovarios en esta edad indujeron una mayor formación de capilares orientados, comparado con los testículos (Gráfica 1 A y B), contrario a lo esperado.



Gráfica 1- # ETCO para los estadios A) 4 y B) 5. M, mesonefros. O, ovarios. T, testículos. Solo se cuantificaron 2 mesonefros.



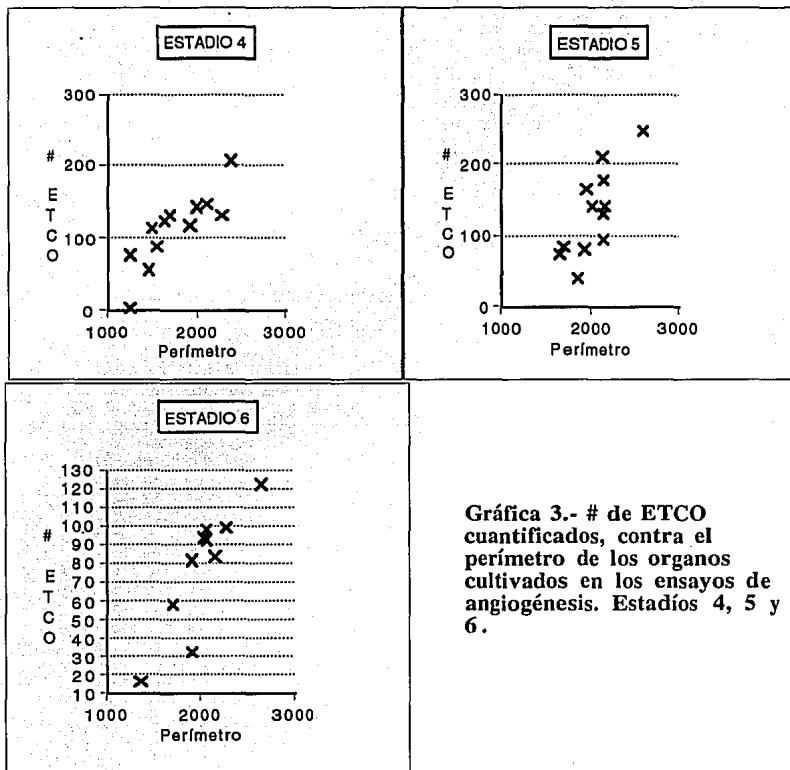
Gráfica 2.- # ETCO para el estadio 6. M, mesonefros. O, ovarios. T, testículos.

En cambio en el estadio 6 (angio # 16), o gónada diferenciada, la relación de inducción de estructuras capilares orientadas entre ovarios y testículos se invirtió, comparado con los estadios 4 y 5. Los mesonefros a esta edad fueron nuevamente los inductores más fuertes de estas estructuras (Gráfica 2).

Al graficar el perímetro de los órganos en cultivo (ovarios, testículos o mesonefros), contra el número de estructuras tipo capilar orientadas, para los tres estadios estudiados (4, 5 y 6), se encontró que el número de estructuras dependía del perímetro que presentó el órgano en cultivo (Gráfica 3) y no de sexo del órgano en cultivo como se presenta en las gráficas 1 y 2.

**E. IDENTIFICACION
DEL ORIGEN DE LAS
CELULAS PRESENTES
EN LAS ESTRUCTURAS
TIPO CAPILARES
ORIENTADAS (ETCO)**

En los experimentos de angiogénesis antes mencionados, se desconocía cuales de las ETCO estaban formadas por las CEAB y cuales por células de los tejidos de ratón que pudieran estar internalizándose en la matriz de colágena. De los experimentos de angiogénesis 17 y 18 de los estadios 4 y 5 (11 dpc), se determinó el origen de las estructuras por medio de la tinción con Hoechst 33258. Los tejidos estudiados con esta técnica, fueron incluidos en parafina, cortados en serie y teñidos con el fluorógeno. Con esta tinción fue posible identificar las estructuras generadas por células de ratón, debido a que los núcleos de estas células presentan un gran número de pequeños gránulos de cromatina. En cambio los



Gráfica 3.- # de ETCO cuantificados, contra el perímetro de los órganos cultivados en los ensayos de angiogénesis. Estadios 4, 5 y 6.

núcleos de células de bovino (al igual que en la rata y el humano) la tinción del núcleo es homogénea (Figura 11).

Se encontró que las células de ratón en cultivo sobre colágena con células endoteliales migran por la matriz de colágena formando ETCO, este tipo de formaciones no se generan en los cultivos control de gónadas o mesonefros sobre matrices de colágena sin células (Figura 7B) debido a la cicatrización del tejido.

Posteriormente fueron cuantificados los núcleos de las células que formaron las ETCO de origen bovino y murino (Datos no mostrados). En resumen se encontró que la tendencia en el número de células de ratón que migran del tejido al interior de la matriz de colágena es muy parecida a la tendencia

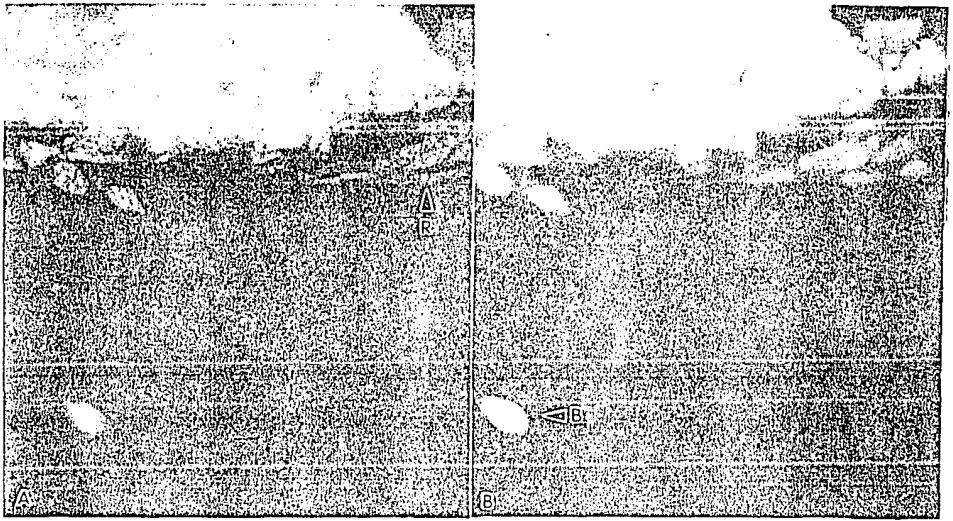


Figura 11- Ensayo de angiogénesis teñido con Hoechst. A) ETCO formadas por células de ratón (R), caracterizadas por los numerosos gránulos de cromatina. B) El mismo campo que A. Se distingue una célula de bovino (B) con el núcleo teñido homogéneamente, 40X.

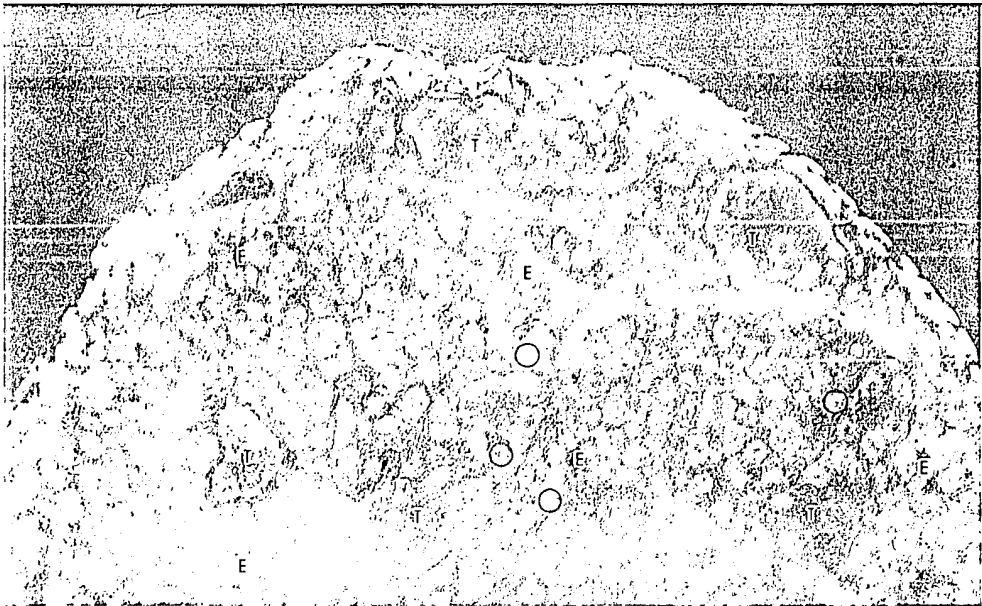


Figura 12- Quimera testículo de rata 13 dpe, ovario de ratón 11 dpe. Inmunohistoquímica para la detección de laminina y posteriormente teñido con Hoechst. Doble exposición luz-epifluorescencia. Se distinguen claramente las células de ratón (Círculos) fuera de los tubulos seminiferos (T). Estroma (E), 20X.

de las células endoteliales a orientarse a los explantes para formar estructuras tipo capilar orientadas .

F. QUIMERAS
RATA-RATON.

Se estudió la diferenciación sexual *in vitro* de gónadas aisladas de ratón o rata, unida a un mesonefros de la especie contraria (Quimeras).

Se encontró en estas quimeras que las gónadas y mesonefros se fusionaban en menos de 24 horas de cultivo. Además las células de ratón (11 dpc) llegaron a penetrar en el tejido de los testículos de rata (13 dpc), cultivadas por 96 horas (Figura 12), pero únicamente en zonas intersticiales.

Sin embargo, las gónadas aisladas de macho sólo fueron capaces de formar cordones individualizados típicos de testículos; si la gónada en cultivo estaba contaminada con mesonefros de su propia especie al momento de unirse a un mesonefros de la especie contraria (Figura 13A). Si por el contrario la gónada indiferenciada de rata (12 dpc estadio 5) o de ratón (11 dpc estadio 5), estaba bien aislada, al unirse con el mesonefros de la especie contraria (de estadio equivalente), se formaron cordones marginales, esto quiere decir que no se separaban del epitelio celómico (Figura 14 A y B) pero ocasionalmente se formaron cordones internos (Figura 14B). Es importante señalar que el estroma del testículo y de los ovarios proliferó abundantemente (Figura 15). Al estudiar la actividad esteroideogénica cualitativamente con la enzima $\Delta 5-3\beta$ -HSD se observó reacción positiva tanto en las regiones epiteliales como en la estromática del testículo correspondiente al ratón (Figura 14B).

G. MORFOMETRIA DE
GONADAS DE RATON
DE 11, 12 Y 13 DPC

Con ayuda de un sistema de análisis de imágenes (BIOCOM, Francia), en colaboración con el Dr Corkidi del Centro de Instrumentos de la UNAM, se cuantificaron diferentes componentes de las gónadas de embriones de ratón, en cortes seriados de tejidos incluidos en EPON.



Figura 13- Quimera testículo (A) u ovario (B) de rata 15 dpc (contaminados con su propio mesonefros (M) unido a mesonefros de ratón 11 dpc. Inmunohistoquímica para la detección de laminina (L). Se distinguen claramente los cordones epiteliales (T). Estroma (E). 20X.



Figura 14- Quimera testículo de rata 13 dpc (sin contaminación de su propio mesonefros) unido a mesonefros de ratón 11 dpc. A) Inmunohistoquímica para la detección de laminina. Cordones epiteliales marginales (EM). Estroma (E). B) Reacción $\Delta 5$ (S). Cordones epiteliales internos (CI). Túbulos mesonefricos (TM). 10X.

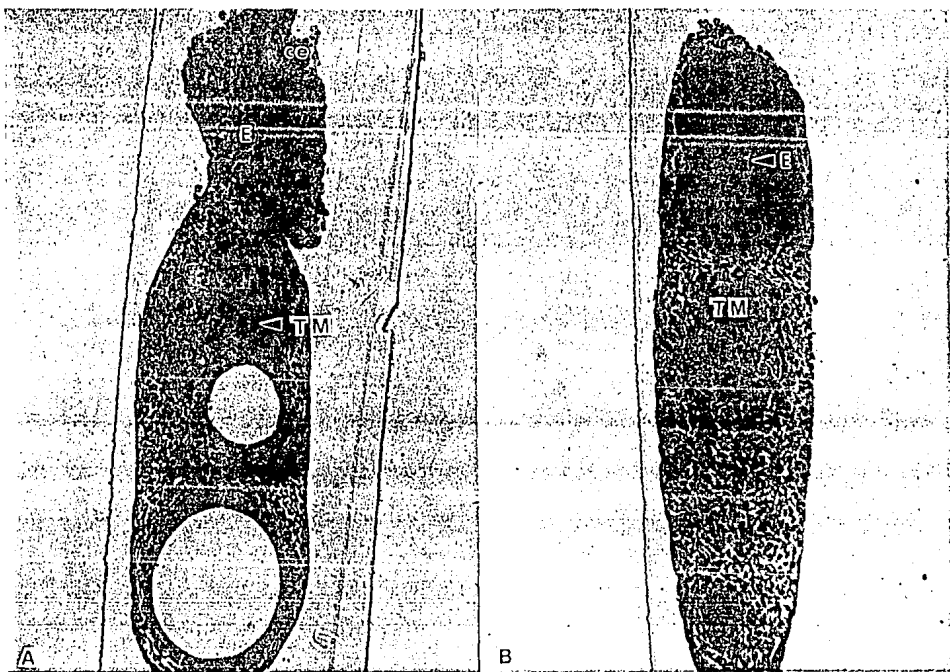


Figura 15- Cortes semifinos de quimeras mesonefros de ratón 11 dpc, gónada de rata 12 dpc, cultivadas por 96 hrs *in vitro*. A) Machos. B) Hembras. Cordones epiteliales (ce). Estroma (E). Túbulos mesonéfricos (TM). 10X.

Se obtuvieron cuatro complejos urogenitales de cada sexo, de embriones de ratón de 11 (estadio 4), 12 (estadio 6) y 13 dpc (fuera del intervalo de estadios según McLaren y Buher, 1990). Se incluyeron en EPON, por la técnica descrita anteriormente, y se obtuvieron cortes longitudinales, semifinos y seriados de 1.5 μm . Se cuantificaron diferentes estructuras de acuerdo a la edad de los embriones.

En complejos de 11 dpc se midió el volumen total de la gónada tomando en cuenta únicamente el componente epitelial (Figura 16A y B), (epitelio celómico e interno conjuntamente), sin analizar el componente estromático, debido a la dificultad para determinar los límites de este tejido. También se cuantificó el volumen ocupado por los endotelios (Figura 16A y B). Es importante señalar que la vascularización a esta edad, está comprendida casi en su totalidad por cordones endoteliales compactos, que no presentan luz, por lo que se consideró que se

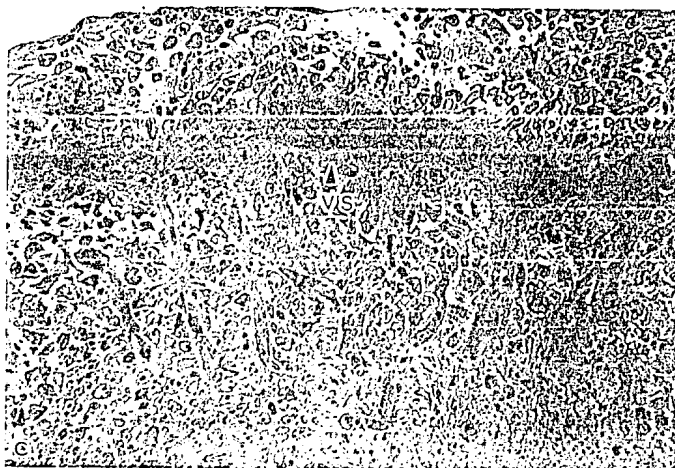


Figura 16- Complejos urogenitales de ratón 11 dpc. A) Machos. B) Hembras. C) Detalle de la región mesonéfrica en donde se observan vasos sanguíneos en formación. Gónada (G), Vasos Sanguíneos (VS), Túbulos mesonéfricos (TM), Mesénquima (M).

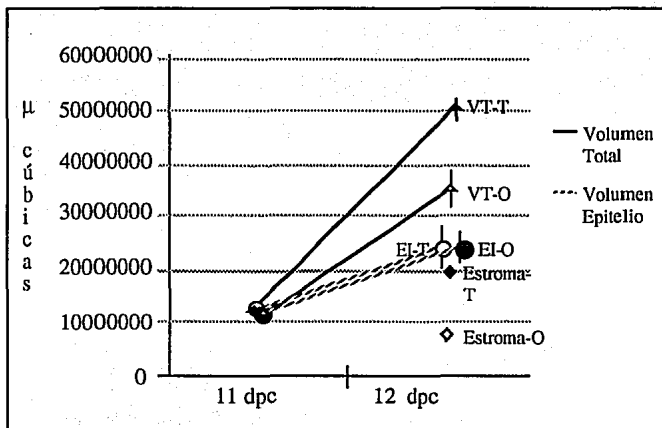


Figura 17.- Morfometría de gónadas de ratón de 11 y 12 dpc. Volumen total (VT). Volumen epitelio (EI). Volumen Estroma (Estroma). Macho (-T). Hembra (-O).

encuentran en las primeras etapas de la angiogénesis (Figura 16C).

En gónadas de 12 y 13 dpc, se cuantificaron el epitelio celómico y el epitelio interno por separado, debido a que en esta edad estos tejidos se separan por la invasión/proliferación de estroma.

En resumen se encontró que en las gónadas de machos y hembras de 11 dpc, el componente epitelial ocupan el mismo volumen. El componente estromático no fue cuantificado y no se puede descartar la posibilidad de que en el componente epitelial se encuentren contenidos precursores del componente estromático. El aumento en volumen total observado a los doce días de los testículos con respecto a los ovarios, se debe a un aumento en el componente estromático. El componente epitelial ocupa un volumen igual si se comparan testículos y ovarios de esta edad (Figura 17).

La mayoría de los vasos observados a los 12 dpc están asociados al estroma, y presentan luz (Figuras 18C y D), a diferencia de lo observado a los 11 dpc, aun cuando algunos se observan como cordones compactos, posiblemente estos son vasos generados de novo (Figura 18), o bien están asociados al componente epitelial (Figura 18 D). Los vasos sanguíneos

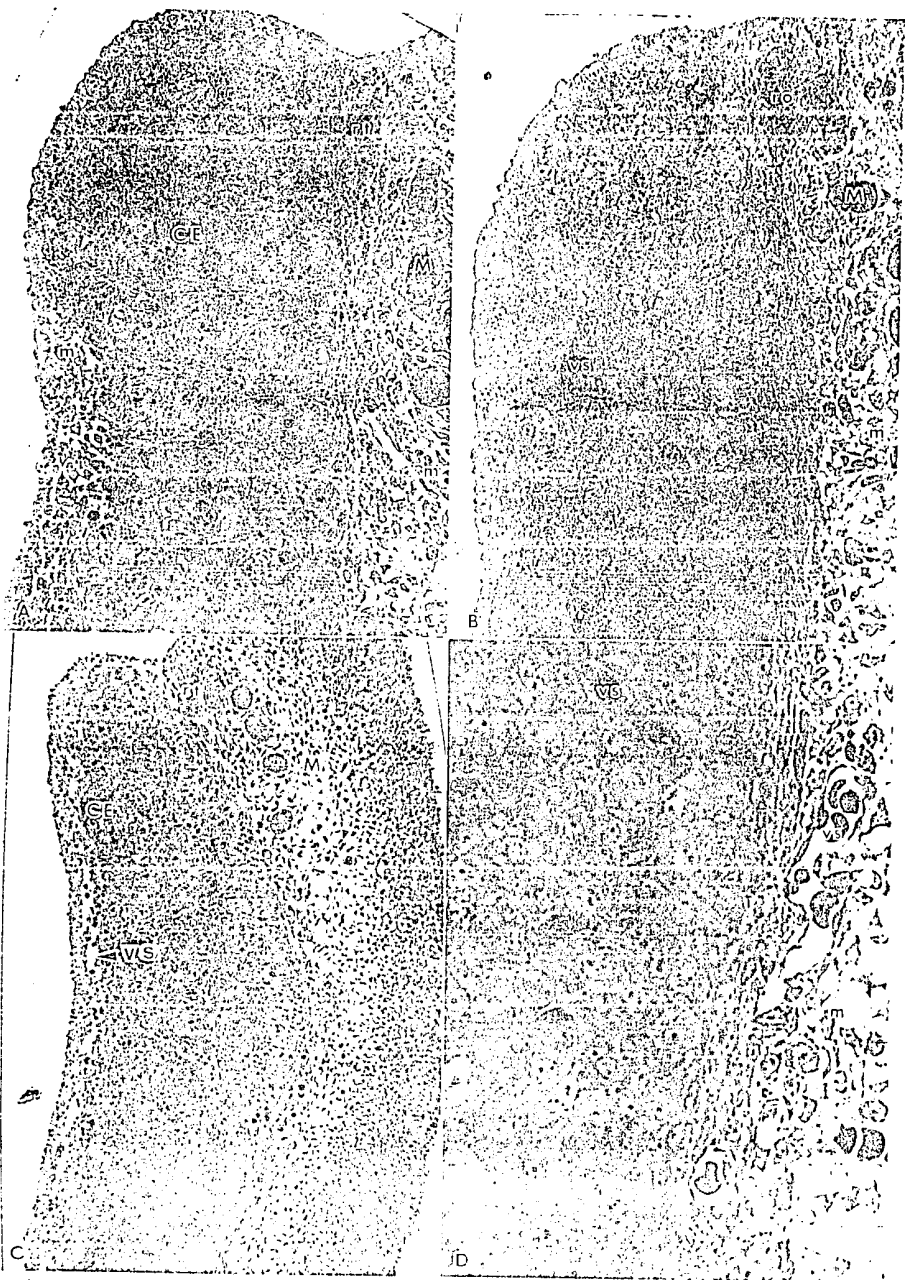


Figura 18- Corte semifino de complejos urogenitales de ratón de 12 dpc. A) Testículo (20X). B) Ovario (20X). C) Testículo (10X). D)Detalle del ovario (40X). Cordones epiteliales (CE). Estroma (E). Vasos Sanguíneos (VS). Mesonefros (M). Mesénquima (m). *Rete testis* (trt). *Rete ovari* (ovo).

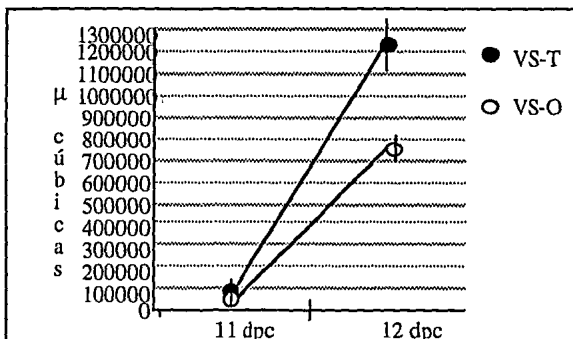


Figura 19- Morfometría de vasos sanguíneos (VS) de gónadas de ratón de 11 y 12 dpc. Macho (T). Hembra (O).

presentaron una tendencia a tener un número mayor en los testículos que en los ovarios. Pero si comparamos el volumen ocupado la diferencia es todavía más marcada (Figura 19).

La formación de cordones epiteliales fue en un plano perpendicular al eje del mesonefros (a los 12 dpc), esto quiere decir en dirección dorso ventral y ventro dorsal, observándose numerosas interdigitaciones de estroma que va separando a los futuros cordones (Figura 18A y C). Las regiones menos diferenciadas fueron la cefálica y la caudal (Figuras 18A y C), ya que en estas zonas se separan totalmente el epitelio celómico y los cordones internos, hasta el día trece (Figura 20).

Es importante recalcar el hecho de que en los cortes más laterales del testículo, se observa claramente la orientación dorso ventral de los túbulos seminíferos en formación (Figura 18 A). En cambio en los cortes más centrales del testículo se pierde este arreglo, lo cual da la impresión de un desarrollo en "red" sin organización (Figura 18C).

Los ovarios en cambio permanecen compactos. Incluso los vasos sanguíneos no presentan hipertrófia en su luz, al compararlos con los testículos, sólo las regiones asociadas al estroma presentan una luz muy desarrollada (Figuras 18 C y D).

A los trece dpc, los cordones epiteliales del testículo ya se encuentran individualizados (Figura 20A), formando arcos, con

zonas centrales ricas en estroma (Figura 20B). Estos arcos se unen en ambos extremos al blastema del *rete testis* que está en formación (Figura 20 A y C).

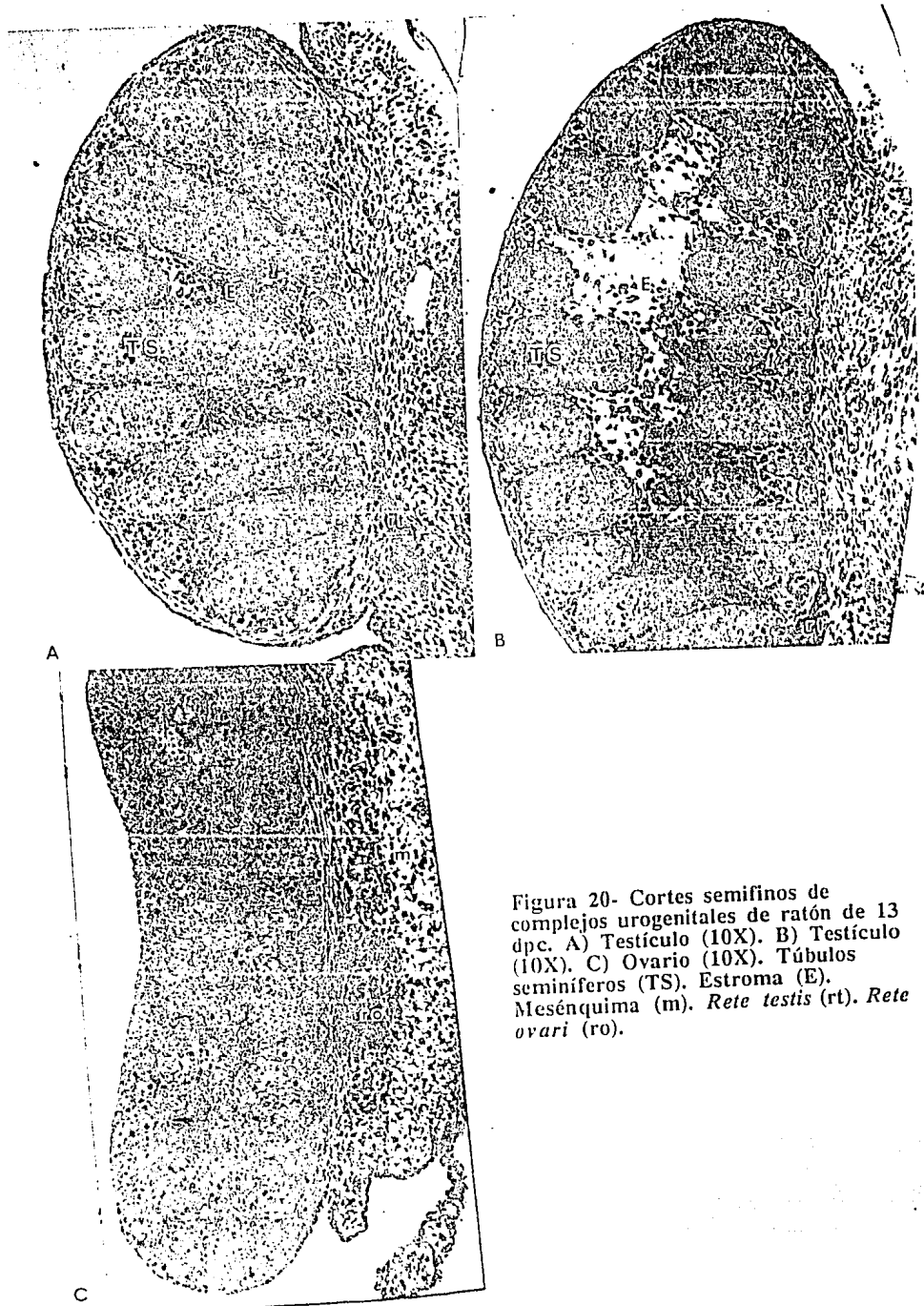


Figura 20- Cortes semifinos de complejos urogenitales de ratón de 13 dpc. A) Testículo (10X). B) Testículo (10X). C) Ovario (10X). Túbulos seminíferos (TS). Estroma (E). Mesénquima (m). Rete testis (rt). Rete ovarii (ro).

VI. DISCUSION

A. ANGIOGENESIS

En el presente trabajo se logró realizar el cultivo de celulas endoteliales. Su identidad fue verificada por dos criterios diferentes: Fisiológicamente, por su gran capacidad de captar lipoproteínas de baja densidad acopladas al fluorógeno DiI (Figura 4B) y por criterios morfológicos, tales como la capacidad de estas células, al cultivarlas en monocapa, de formar colonias en forma de remolino (Folkman *et al*, 1979). Además, al utilizar matrices de colágena (Wood y Keech, 1960; Elsdale y Bard 1972; Kleinman *et al*, 1981), para el cultivo de las celulas endoteliales se observó que tenían la capacidad de reorganizarse en redes de capilares, similares a las descritas por otros grupos (Delvos *et al*, 1982; Montesano *et al*, 1983; Nicosia y Ottinetti, 1990). Adicionalmente en estas condiciones llegaron a formar lumen (Madri *et al*, 1983; Schor *et al*, 1983).

En el ensayo de angiogénesis, se utilizaron diferentes cultivos primarios de celulas endoteliales para cada experimento; para así asegurar que la población de células era predominantemente endotelial. Lo anterior podría afectar los resultados de los bioensayos debido a la heterogeneidad de las poblaciones utilizadas. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron consistentes, acorde con el comportamiento descrito por otros grupos (Canfield *et al*, 1992).

Al analizar los experimentos de angiogénesis, se encontró que la capacidad angiogénica varía dependiendo del tamaño del órgano en cultivo y no parece estar relacionada con el sexo o la edad del explante. Esto quiere decir que la invasión de vasos sanguíneos observada en los testículos a partir de los 12 dpc, se debe principalmente al aumento de tamaño del órgano, y sugiere que el proceso de angiogénesis, como lo propuso Merchant-Larios *et al* en 1993, no es uno de los mecanismos que promueve la morfogénesis de los túbulos seminíferos en el testículo. La angiogénesis parece ser una consecuencia de su

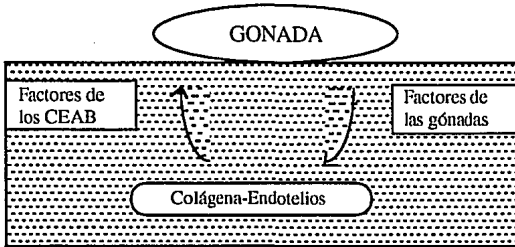


Figura 20- Efecto de los factores secretados por las gónadas sobre las CEAB para la formación de ETCO. Efecto de las CEAB sobre la migración de células y formación de ETCO gonadales.

crecimiento acelerado y se da al inicio de la diferenciación como una hipertrófia de los vasos sanguíneos.

Por otro lado, se observó que gran cantidad de células (tanto de complejos urogenitales, como de gónadas y mesonefros aislados) migraron hacia el interior de la matriz de colágena (Figuras 7, 8 y 9). Esto se debe probablemente a dos factores: En primer lugar se ha reportado que diferentes tipos celulares (HeLa, notocorda, ectodermo de apéndices y córnea) tienen la capacidad de migrar en matrices de colágena en cultivos *in vitro* (Schor, 1980; Greenburg y Hay, 1982). Se encontró incluso la formación de estructuras tipo capilar orientadas provenientes del explante, de gónadas aisladas indiferenciadas de ambos sexos, las cuales están compuestas principalmente por células epiteliales (Figura 11). Se ha reportado cómo es que células epiteliales cultivadas en matrices de colágena, adquieren características de células tipo mesénquimático, evidenciado principalmente por que en estas condiciones migran a través de la matriz (Greenburg y Hay, 1982) y adicionalmente presenta un patrón de expresión de filamentos intermedios típicos de las células mesenquimáticas (Fröjdman *et al*, 1992).

La alta migración de células del explante al interior de la matriz de colágena, fue promovida posiblemente por el condicionamiento del medio de cultivo, por los diferentes

factores de crecimiento que secretan las células endoteliales *in vitro* (Schor *et al*, 1983; DiCorleto, 1984, McNeil *et al*, 1989). En los bioensayos de angiogénesis presentados en este trabajo, no sólo se observó el efecto que ejercen las gónadas sobre las células endoteliales en la formación de las estructuras capilares. Adicionalmente se encontró que también las células endoteliales afectan el comportamiento de las células embrionarias del ratón (Figura 20).

B. QUIMERAS

El uso de quimeras interespecies ha permitido el estudio detallado de las interacciones entre diferentes tejidos, principalmente para detectar la migración de células, que ocurren normalmente durante los movimientos morfogénicos en el desarrollo embrionario (Le Douarin y Teillet, 1974; Cunha y Vanderslice, 1984).

Por otro lado, algunos estudios previos demuestran que las células de la región mesoneférica migran al interior del testículo y contribuyen con células para la formación del componente estromático gonadal, aportando células mioides, endoteliales y mesenquimáticas, durante la formación de los cordones seminíferos (Merchant-Larios *et al*, 1993; Buehr *et al*, 1993).

Con base en lo anterior se realizaron cultivos *in vitro* de quimeras rata-ratón, para el estudio de la interacción mesonefros-gónada en la diferenciación temprana del testículo, con el objetivo original de determinar el porcentaje de células que aporta la región mesoneférica al componente estromático gonadal. Sin embargo, se encontró que los testículos no diferencian cordones típicos, al cultivar mesonefros de ratón con gónadas de rata. Los testículos en su mayoría formaron cordones marginales que no llegaron a separarse del epitelio celómico (Figura 14A). Adicionalmente la invasión de células mesoneféricas a la gónada fue muy escasa (Figura 12). A pesar de lo anterior, el componente estromático de la gónada proliferó intensamente (Figura 14 y 15).

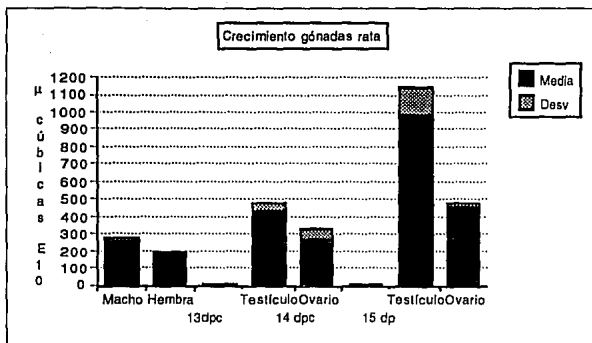


Figura 21 - Morfometría de gónadas de rata, durante las etapas críticas de su diferenciación. 13, 14 y 15 dpc en rata, equivalentes a 11, 12 y 13 dpc en ratón (Modificado de Mittwoch y Delhanty, 1960).

Los resultados anteriores muestran que en las quimeras rata-ratón no se forman cordones seminíferos típicos, esto parece que no está relacionado con las condiciones de cultivo puesto que en los controles en los cuales se cultivaron complejos urogenitales de rata o de ratón su morfogénesis fue muy parecida a la que ocurre *in vivo*, parece que las alteraciones observadas se deben a una forma de incompatibilidad entre los tejidos de rata y de ratón. Sin embargo, estos cultivos tienen la capacidad de promover la proliferación del componente estromático contenido en la gónada indiferenciada, el cual normalmente no prolifera en cultivos de gónada indiferenciada aislada (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Adicionalmente se encontró que la proliferación del estroma se estimula tanto en testículos como en ovarios (Figura 15).

C. MORFOMETRIA

Mittwoch y Delhanty en 1969, propusieron que los testículos se diferencian, debido a que el cromosoma Y, acelera la tasa de crecimiento de las gónadas indiferenciadas macho, lo que provoca que tengan un volumen mayor a su contraparte hembra, aún en etapas indiferenciadas (Figura 21).

Merchant-Larios en 1978, propuso que el volumen que ocupan las gónadas indiferenciadas, es similar en ambos sexos, y el aumento observado en el testículo durante su diferenciación temprana, se debe principalmente al incremento del componente

estromático. Por su parte el componente epitelial permanece con un volumen similar en los dos sexos, por lo que la diferencia observada en el crecimiento entre testículos y ovarios, no se debe al incremento indiscriminado de todos los tejidos que componen a los testículos, como lo propone Mittwoch y Delhanty en 1969.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo corroboran la propuesta hecha por Merchant-Larios en 1978. Difieren con los datos de Mittwoch y Delhanty, en primer lugar por que el volumen total de las gónadas indiferenciadas es igual en los dos sexos, acorde con lo descrito anteriormente en el ratón (Palmer y Burgoyne, 1991). En el presente trabajo se encontró que el crecimiento observado en los testículos a los 12 dpc se debe principalmente al aumento del componente estromático (Figura 17).

Las diferencias observadas pueden deberse en primer lugar, a que Mittwoch y Delhanty, midieron por un método indirecto los diferentes componentes (epitelial y estromático) de las gónadas, así como el volumen total. En el presente trabajo se midieron con un método semiautomático, directamente sobre los cortes seriados, lo que posiblemente disminuyó el error en la estimación de volúmenes. Otra posibilidad es que existan diferencias entre especies.

Por otro lado Wartenberg *et al* en 1991, reportaron que la morfogénesis temprana de los cordones seminíferos, es de manera irregular, en forma de “redes” y posteriormente se reorganizan en cordones típicos semejjando “arcos”, con orientación perpendicular al plano del mesonefros, similar a lo reportado por Roosen-Runge en 1961. En el presente trabajo se observó que la mayoría de los cordones se forman de manera organizada desde el inicio de su morfogénesis (12 dpc), por medio de interdigitaciones del mesénquima, en orientación dorso ventral y ventro dorsal con respecto al eje del mesonefros. Las discrepancias observadas pueden deberse a

diferencias entre especies, ya que el grupo de Wartenberg reporta sus resultados en conejos. Otra posibilidad es que estudiaron únicamente una porción limitada del testículo, por lo que tuvieron una impresión incompleta, de la formación de una "red irregular". En el presente trabajo si se toma como referencia la figura 18C, se puede decir que los cordones seminíferos tienen un arreglo irregular. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que esta es una zona "medular" del testículo que dará origen a la zona rica en estroma que se observa a los trece días de gestación (Figura 19B). Es muy probable que esta zona a los 12 dpc, sea una zona de alta proliferación del componente estromático, en la cual se están formando la separación de los arcos epiteliales. Lo irregular que se observa se debe a que aún es incompleta la separación de los tubulos seminíferos, por lo que es una zona con numerosos puntos de contacto entre los extremos de los túbulos o "arcos" seminíferos. En los extremos de los "arcos" en formación se aprecia claramente su orientación dorsoventral (Figura 18A). Lo antes expuesto quiere decir que sólo si se toma al órgano completo, se puede considerar que la morfogénesis de los túbulos seminíferos sigue un patrón organizado, desde el inicio.

Con respecto a la angiogénesis, desde 1951 Witschi reportó como el mejor índice de medularización o diferenciación testicular, su prominente vascularización, comparada con la observada en los ovarios de la misma edad. Con base en esto Merchant-Larios *et al* en 1993, proponen que las gónadas macho secretan factores tipo angiogénicos, los cuales promueven la invasión de células del mesénquima y de los vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica, durante la formación de la túnica albugínea. Para probar esta hipótesis se realizaron ensayos de angiogénesis, en los cuales se encontró que la capacidad de promover la formación de ETCO, no dependía del sexo o la edad sino del tamaño del explante. Esto indica que el epitelio de la gónada indiferenciada macho,

no tiene una capacidad de inducción angiogénica mayor que el epitelio de la gónada hembra indiferenciada. La capacidad de inducción de estructuras capilares parece depender del tamaño de la gónada en cultivo (Gráfica 3).

En los estudios de morfometría de gónadas de 11 y 12 dpc, se esperaba encontrar un mayor número de vasos en los machos que en las hembras. Sin embargo, se observó en los testículos de 12 dpc, que los vasos sanguíneos ocupan un volumen mayor que en los ovarios y en menor medida se observaron diferencias en el número de ramificaciones. Se consideró que el aumento en volumen observado en los testículos *in vivo* a los 12 dpc, está relacionado con el aumento del mesénquima que es parte del componente estromático y no depende del componente epitelial, ya que este último se mantiene similar en ambos sexos (Figura 17). Incluso algunos estudios de marcaje con timidina tritiada de gónadas, indican que el componente estromático prolifera con mayor velocidad que el epitelial (Merchant-Larios, 1979).

Lo anterior quiere decir que la angiogénesis que se observa en los testículos durante su morfogénesis, es inducida de manera indirecta por la invasión/proliferación del mesénquima, y no por la secreción de factores provenientes del componente epitelial en la gónada macho a los 11 dpc. Se propone que en el testículo hay una respuesta tipo fibrótica durante su morfogénesis, esto quiere decir que el testículo atrae y promueve la proliferación del mesénquima, el cual a su vez es el responsable de atraer vasos sanguíneos así como el de provocar su hipertrofia principalmente. Esto significa que la angiogénesis no es la causa de la diferenciación del testículo, sino que ocurre como consecuencia de su morfogénesis.

Cabe señalar que en ovarios de 12 dpc los vasos sanguíneos asociados al componente epitelial, se mantienen como cordones compactos o con un lumen casi imperceptible (Figura 18 B), y sólo los vasos asociados a regiones ricas en mesénquima,

presentan un lumen bien desarrollado (Figura 18 D). Incluso en los testículos sólo las regiones de la túnica albugínea ricas en estroma, presentan vasos hipertrofiados (Figura 18 A y C). Esto sugiere que el mesénquima contenido en los testículos promueve la diferenciación de los vasos sanguíneos, tomando como punto de referencia a la secuencia que sigue el proceso de la angiogénesis propuesta por Folkman en 1985 y la clasificación de Rhodin de 1968.

Por otro lado, se sabe que el mesénquima embrionario es capaz de provocar la neovascularización durante la morfogénesis fállica en ratón, por el proceso de vasculogénesis, que es la diferenciación de células endoteliales a partir de precursores mesenquimáticos (Hara *et al*, 1994). En el caso particular del testículo, es posible que el mesénquima que invade y prolifera, no sólo sea capaz de atraer vasos sanguíneos y de promover su diferenciación en una respuesta tipo fibrótica (Roberts *et al*, 1986; Peáo *et al*, 1994), probablemente también aporta precursores mesenquimáticos que se diferencian como células endoteliales dentro del componente estromático intratesticular.

Es posible que la respuesta fibrótica sea promovida por un factor de crecimiento tipo TGF- β , ya que se ha observado que *in vivo* este factor de crecimiento promueve angiogénesis de manera indirecta a través de respuestas fibróticas (Roberts *et al*, 1986). En gónadas de ratón Behringer *et al* en 1990, reportaron cómo en hembras transgénicas que expresan crónicamente la substancia inhibidora de los conductos de Müller (MIS) el cual es miembro de la familia de factores tipo TGF- β , desarrollan túbulos seminíferos. Posiblemente la sobreexpresión de MIS, interactúa con los receptores del TGF- β , ya que se ha sugerido que otros miembros de esta familia pueden interactuar con su receptor (Baarends *et al*, 1994). Es interesante el hecho que en los embriones el tipo celular que predominantemente expresa receptores para TGF- β son las células mesenquimáticas, en

zonas de fuerte interacción epitelio-mesénquima (Lawler *et al.*, 1994). Incluso es posible que la propia hormona antimülleriana participe en la morfogénesis de los túbulos seminíferos.

Auncuando se ha demostrado que el factor determinante del testículo (FDT) es el gene *Sry*, se desconoce la (s) respuesta (s) que desencadena su expresión para promover la morfogénesis del testículo. Una de las posibles respuestas que desencadena la expresión de *Sry* es la invasión de tejido estromático proveniente de la región mesonéfrica (Merchant-Larios, 1978 y 1984; Merchant-Larios *et al.*, 1993; Buehr *et al.*, 1993). Sin embargo, parece que el mesonefros no sólo aporta células al componente estromático del testículo, es posible que también induzca la proliferación de precursores de células estromáticas las cuales se encuentran dentro de la gónada aún en la etapa indiferenciada. Los experimentos de quimeras apuntan a favor de esta suposición ya que se observó proliferación del estroma gonadal, aún cuando no se observó una invasión masiva de células provenientes de la región mesonéfrica (Figuras 12, 14 y 15). Aunado a lo anterior, recientemente, en el laboratorio se cultivaron reagregados de gónadas indiferenciadas de macho *in vitro*, en los cuales se observó la diferenciación de cordones seminíferos aún en ausencia de mesonefros, esto puede indicar que en la gónada indiferenciada de ratón existen precursores de estroma, que solo proliferan si llegan a una densidad crítica en la cual pueda ocurrir un efecto de comunidad (Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, comunicación personal).

Además se sabe que a nivel molecular la gónada indiferenciada, tiene un patrón de expresión de filamentos intermediarios típico de células mesenquimáticas (Fröjdman *et al.*, 1992). Por lo que es posible que los precursores del componente estromático sean inducidos a proliferar, o bien a sufrir una transición epitelio-mesenquimática, al ocurrir la invasión de los diferentes tipos celulares provenientes de la región mesonéfrica.

VII. CONCLUSIONES

1- De acuerdo con el objetivo general se concluye que la angiogénesis prominente del testículo es una consecuencia de su morfogénesis y no una causa. Además el aumento de volumen en el testículo al inicio de su diferenciación se debe al aumento del componente estromático (mesénquima y vasos sanguíneos) y no al aumento generalizado de sus tejidos.

2-Respecto a los objetivos particulares se concluye que:

A- La respuesta angiogénica parece estar correlacionada con el tamaño del órgano en cultivo y no con el sexo o la edad de los complejos urogenitales o gónadas aisladas.

B- Entre los 11 y 12 dpc el componente epitelial ocupa un volumen comparable entre ambos sexos. En cambio el componente estromático aumenta más rápidamente en los testículos que en los ovarios y es el que provoca el aumento del tamaño de los primeros.

C- Al inicio de la diferenciación testicular el aumento de la vascularización se debe principalmente a una hipertrofia de los vasos sanguíneos y en menor medida al aumento en su número.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Buylla, A. y D.S. Vicario. 1988. Simple Microcomputer System for Mapping Tissue Sections with the Light Microscope. J. NeuroSci. Methods. 25: 165-173.
- Baarends, W.M.; van Helmond, M.J.L.; Post, M.; van der Schoot, P.J.C.M.; Hoogerbrugge, J.W.; de Winter, J.P.; Uilenbroek, J.T.J; Karels, B.; Wilming, L.G.; Meijers, J.H.C.; Themmen, A.P.N. y Grootegoed, J.A. 1994. A Novel Member of the Transmembrane Serine/Threonine Kinase receptor Family is Specifically Expressed in the Gonads and in Mesenchymal Cells Adjacent to the Müllerian Duct. Development. 120:189-197.
- Behringer, R.R.; Cate, R.L.; Froelick, G.J.; Palmitier, R.D. y R.L. Brinster. 1990. Abnormal Sexual Development in Transgenic Mice Chronically Expressing Müllerian Inhibiting Substance. Nature. 345: 167-170.
- Buehr, M.; Gu, S. y A. McLaren. 1993. Mesonephric Contribution to Testis Differentiation in the Fetal Mouse. Development. 117: 273-281.
- Canfield, A.E.; Wren, F.E.; Schor, S.L.; Grant, M.E. y A. M. Schor. 1992. Aortic Endothelial Cell Heterogeneity *In Vitro*. J. Cell Sci. 102: 807-814.
- Corkidi-Blanco, G. 1989. Système d'Analyse de Préparations Histologiques par Imagerie Numérique Histo 2000. Thèse de Doctorat, Université Paris XII.
- Cunha, G.R. y K.D. Vanderslice. 1984. Identification in Histological Sections of Species Origin of Cells from Mouse, Rat and Human. Stain Technology 59: 7-12.
- Delvos, U.; Gajdusek, C.; Sage, H.; Harker, L.A. y S.M. Schwartz. 1982. Interactions of Vascular Wall Cells With Collagen Gels. Lab. Invest. 46: 61-72.
- DiCorleto, P. E. 1984. Cultured Endothelial Cells Produce Multiple Growth Factors for Connective Tissue Cells. Exp. Cell Res. 153: 167-172.
- Elsdale, T. y J. Bard. 1972. Collagen Substrata for Studies on Cell Behavior. J. Cell Biol. 54: 626-637.
- Folkman, J. 1985. Tumor Angiogenesis. Adv. Canc. Res. 43:175-203.

- Folkman, J.; Haudenschild, C.C. y B.R. Zetter. 1979. Long Term Culture of Capillary Endothelial Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5217-5221
- Folkman, J.; Watson, K.; Ingber, D. y D. Hanahan. 1989. Induction of Angiogenesis During the Transition from Hyperplasia to Neoplasia. Nature. 339: 58-61.
- Freshney, R.I. 1988. Culture of Animal Cells. Allan R. Liss, Inc., NY, USA. 397 pp.
- Fröjdman, K; Paranko, J; Virtanen, I. y L.J. Pelliniemi. 1992. Intermediate Filaments and Epithelial Differentiation of Male Rat Embryonic Gonad. Differentiation. 50:113-123.
- Gillman, J. 1948. The Development of Gonads in Man, With a Consideration of the Role of Fetal Endocrines and the Histogenesis of Ovarian Tumors. Contr. Embryol. Carneg. Inst. 32: 81-131.
- Greenburg, G. y E.D. Hay. 1982. Epithelia Suspended in Collagen Gels Can Lose Polarity and Express Characteristics of Migrating Mesenchymal Cells. J. Cell Biol. 95: 333-339.
- Gruenwald, P. 1942 The Development of the Sex Cords in the Gonads of Man and Mammals. Amer. J. Anat. 70: 359-368.
- Hara, K.; Doi, Y.; Nagata, N.; Furukawa, H.; Sagara, T.; Yamamoto, K.; Yokoyama, M; Yoshizuka, M. y Fujimoto S. 1994. Role of Mesenchymal Cells in the Neovascularization of the Rabbit Phallus. Anat. Rec. 238:15-22.
- Hirsh, E.C.; Lejeune, O.; Colliot, G.; Corkidi, G. y M. Tajani. 1992. Methods in Neuroscience. 10: 62-79.
- Jäger, R.J.; Anvret, M.; Hall, K. y G. Scherer. 1990. A Human Female with a Frame Shift Mutation in the Candidate Testis-Determining Gene *SRY*. Nature. 348: 452.
- Jaffe, E.A.; Nachman, R.L.; Becker, C. G. y C.R. Minick. 1973. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. J. Clin. Invest. 52: 2745-2756.
- Jones, H.W. y W.W. Scott. 1971. Hermaphroditism, Genital Anomalies and Related Disorders. The Williams and Wilkins Co. Baltimore USA. pp. 76-96.
- Jost, A.; Vigier, B.; Prépin, J. y Perchellet, J. P. 1973. Studies on Sex Differentiation in Mammals. Recent. Prog. Horm. Res. 29:1-41.

- Jost, A. y Magre, S. 1988. Control Mechanisms of Testicular Differentiation. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 322: 55-61.
- Karnovsky, M.J. 1965. A Formaldehyde-glutaraldehyde fixative of High Osmolality for use in Electron Microscopy. J. Cell Biol. 27: 137A.
- Kleinman, H.K.; Klebe, R.J. y G.R. Martin. 1981. Role of Collagenous Matrices in the Adhesion and Growth of Cells. J. Cell Biol. 88: 473-485.
- Kofman, S. Merchant-Larios, H. y G. Pérez. 1982. Diferenciación Sexual. I. Bases Biológicas del Dimorfismo Sexual. Rev. Invest. Clin. (Mex.) 34: 349-359.
- Koopman, P.; Münsterberg, A.; Capel, B.; Vivian, N. y R. Lovell-Badge. 1990. Expression of a Candidate Sex-determining Gene During Mouse Testis Differentiation. Nature. 348: 450-452.
- Koopman, P.; Gubbay, P.; Vivian, N.; Goodfellow, P. y R. Lovell-Badge. 1991. Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry. Nature. 351: 117-121.
- Lawler, S.; Candia, A.F; Ebner, R.; Shum, L.; López, A.R.; Moses, H.L.; Wright, C.V.E. y Derynck, R. 1994. The Murine Type II TGB- β Receptor has a Coincident Embryonic Expression and Binding Preference for TGF- β 1. Development. 120: 165-175.
- Le Douarin, N. y M.A. Teillet. 1974. Experimental Analysis of the Migration and Differentiation of Neuroblasts of the Autonomic Nervous System and of Neuroectodermal Mesenchymal Derivatives, Using a Biological Cell Marking Technique. Dev. Biol. 41: 162-184.
- Levy, H. Deane, H.W. y B.L. Rubin. 1959. Visualization of Steroid 3- α -Dehydrogenase Activity in Tissue of intact Hypophysectomized rats. Endocrinology. 65: 932-943.
- Lovell-Badge, R. 1992. Testis Determination: Soft Talk and Kinky Sex. Curr Op. Gen. Dev. 2: 596-601.
- Madri, J. A. y S.K. Williams. 1983. Capillary Endothelial Cell Cultures: Phenotypic Modulation by Matrix Components. J. Cell Biol. 97: 153-165.
- Madri, J.A.; Pratt, B. M. y A. M. Tucker. 1988. Phenotypic Modulation of Endothelial Cells by Transforming Growth Factor- β Depends Upon the Composition and Organization of the Extracellular Matrix. J. Cell Biol. 106: 1375-1384.

- Madri, J.A.; Dreyer, B.; Pitlick, F.A. y H. Furthmayr. 1988. The Collagenous Components of the Subendothelium. Lab. Invest. 43: 303-315.
- McLaren, A. y M. Buehr. 1990. Development of Mouse Germ Cells in Cultures of Fetal Gonads. Cell Diff Dev. 31: 185-195.
- McLaren, A. 1990. What Makes Man a Man. Nature. 346: 216-217.
- McNeil, P.L.; Muthukrishnan, L.; Warder, E. y P.A. D'Amore. 1989. Growth Factors are Released by Mechanically Wounded Endothelial Cells. J. Cell Biol. 109: 811-822.
- 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. 1978. Ovarian Differentiation. In: The Vertebrate Ovary. (R.E. Jones ed.) pp. 47-81. Plenum Press. New York, USA.
- Merchant-Larios, H. 1979. Origin of the Somatic Cells in the Rat Gonad: An Autoradiographic Approach. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 19(4B): 1219-1229.
- Merchant-Larios, H. 1984. Germ and Somatic Cell Interactions During Gonadal Morphogenesis. In: Ultrastructure of Reproduction. (Blerkom, V. y P.M. Motta, eds.). Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, Netherlands.
- Merchant-Larios, H. y L. Zamboni. 1973. Fine Morphology of Extragonadal Germ Cells of the Mouse. In: The Development and Maturation of the Ovary and its Functions (H. Peters, ed.) Excerpta Medica, Amsterdam. 95-100.
- Merchant-Larios, H.; Popova, L. y M. Reiss-Brion. 1984. Early Morphogenesis of Chick Gonad in the Absence of Mesonephros. Dev. Growth Differ. 26: 403-417.
- Merchant-Larios, H y Taketo, T. 1991. Testicular Differentiation in Mammals Under Normal and Experimental Conditions. J. Electron Microsc. Tech. 19:158-171.
- Merchant-Larios, H.; Moreno-Mendoza, N. y M. Buehr. 1993. The Role of the Mesonephros in Cell Differentiation and Morphogenesis of the Mouse Fetal Testis. Int. J. Dev. Biol. 37:407-415.
- Mittwoch, U. y Delhanty J.D.A. 1969. Growth of Differentiating Testes and Ovaries. Nature. 224:1323-1325.
- Montesano, R.; Orci, L. y P. Vassalli. 1983. *In Vitro* Rapid Organization of Endothelial Cells into Capillary-Like Networks is Promoted by Collagen

Matrices. J. Cell Biol. 97: 1648-1652.

- Nicosia, R. F. y A. Ottinetti. 1990. Growth of Microvesels in Serum Free Matrix Culture of Rat Aorta. A Quantitative Assay of Angiogenesis *In Vitro*. Lab. Invest. 63: 115-122.
- Palmer, S. J. y P.S. Burgoyne. 1991. The *Mus musculus domesticus* Tdy Allele Acts Later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY Sex-Reversal in C57BL/6-YPOS Mice. Development. 113: 709-714.
- Peáó, M.N.D.; Águas, A.P; de SÁ, C.M. y Grande N. R. 1994. Neofornation of Blood Vessels in Association With Rat Lung Fibrosis Induced by Bleomycin. Anat. Rec. 238: 57-67.
- Pinkerton, J.H.M., McKay, D.G., Adams, E.C. y A.T. Hertig. 1961. Development of the Human Ovary. A Study Using Histochemical Techniques. Obstet. Gynec. 18: 152-181.
- Rhodin, J.A.G. 1968. Ultrastructure of Mammalian Venous Capillaries, Venules and Small Collecting Veins. J. Ultrastruct. Res. 25:452-500.
- Roberts, A.B.; Sporn, M.B.; Assoian, R.K.; Smith, J.M.; Roche, N.S.; Wakefield, L.M.; Heine, U.I.; Liotta, L.A.; Falanga, V.; Kehrl, J.H. y A.S. Fauci. 1986. Transforming Growth Factor Type β : Rapid Induction of Fibrosis and Angiogénesis *In Vivo* and Stimulation of Collagen Formation *In Vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4167-4171.
- Roosen-Runge, E.C. 1961. Rudimental "Genital Canals" of the Gonad in Rat Embryos. Acta Anat. 44: 1-11.
- Schor, A.M., Schor, S.L. y T.D. Allen. 1983. Effects of Culture Conditions on the Proliferation, Morphology and Migration of Bovine Aortic Endothelial Cells. J. Cell Sci. 62: 267-285.
- Schor, S. L. 1980. Cell Proliferation and Migration on Collagen Substrata *In Vitro*. J. Cell Sci. 41: 159-175.
- Upadhyay, S.; Luciani J.M. y L. Zamboni. 1979. The Role of the Mesonephros in the Development of the Indifferent Gonads and Ovaries of the Mouse. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 19: 1179-1196.
- Voyta, J.C.; Netland, P.A.; Via, D.P.; y B.R. Zetter. 1984. Specific Labelling of Endothelial Cells using Fluorescent Acetylated-Low Density Lipoprotein. J. Cell Biol. 99: 81A.
- Wartenberg, H.; Kinsky, I.; Viebahn, C. y Schmolke, C. 1991. Fine Structural

Characteristics of Testicular Cord Formation in the Developing Rabbit
Gonad. J. Electr. Mic. Tech. 19: 133-157.

Witschi, E. 1951. I. Gonad Development and Function. Embryogenesis of the
Adrenal and the Reproductive Glands. Rec. Progr. Horm. Res. 6: 1-27.

Wood, G.C. y M.K. Keech. 1960. The Formation of Fibrils from Collagen
Solutions. Biochem. J. 75: 588-598.

Zamboni, L.; Bézard, J.; y P. Mauléon. 1979. The Role of the Mesonephros in the
Development of the Sheep Fetal Ovary. Ann. Biol. Anim. Bioch.
Biophys. 19: 1153-1178.

Zetterqvist, H. 1956. The Ultrastructural Organization of the Columnar Absorbing
Cells of the Mouse Jejunum. Tesis Doctoral Karolinska Institutet.
Estocolmo, Suecia.

Zwingman, T.; Erickson, R.P.; Boyer, T. y A. Ao. 1993. Transcription of the Sex-
Determining Region Genes *Sry* and *Zfy* in the Mouse Preimplantation
Embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 814-817.