



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL
Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

PAPEL DEL MESONEFROS EN EL
DESARROLLO DE LA GONADA
DEL RATON

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A :

BIOLOGA NORMA ANGELICA MORENO MENDOZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Horacio Merchant Larios.

**Revisores: Dra. Martha Romano Franco
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dr. Jesús Manuel León Cázares
Dr. Alejandro Zentella Dehesa**

A mis Padres:

JORGE Y MARIA ELENA

A mis Hermanos:

**FRANCISCO JAVIER
JORGE
VICTOR MANUEL
ALFONSO**

Con cariño:

**ANGELES
BETTY
TERE
VICKY**

Con mucho amor para mi FANTASMA

Mi agradecimiento especial al Dr. Horacio Merchant Larlos por su excelente asesoramiento, apoyo y facilidades otorgadas para la realización del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Joaquín Herrera, por la realización de los análisis de Biotransformación. Asimismo, hago partícipe de los agradecimientos al Biol. Alejandro Marmolejo Valencia y al Sr. José Guadalupe Baltazar por el apoyo técnico brindado.

CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCION.....	3
1.1 Determinación del sexo en mamíferos.....	3
1.2 Morfogénesis gonadal.....	3
1.2.1 Migración y colonización de las CGP.....	4
1.2.2 Establecimiento de la gónada indiferenciada.....	6
1.2.3 Diferenciación sexual de la gónada: Diferenciación testicular.....	10
1.3 Interacciones y asociaciones celulares en la morfogénesis embrionaria.....	14
2 OBJETIVO.....	16
2.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
3 METODOS Y RESULTADOS PUBLICADOS.....	17
4 RESULTADOS ADICIONALES.....	18
4.1 Disgregados-Reagregados.....	18
4.2 Metodos.....	18
4.3 Resultados.....	20
4.3.1 Disgregación Celular.....	20
4.3.2 Disgregación-Reagregación.....	20

4.3.2.1 Gónadas con mesonefros.....	21
4.3.2.2 Gónadas aisladas.....	21
4.4 FIGURAS.....	22
5 DISCUSION GENERAL.....	28
6 CONCLUSIONES.....	33
7 BIBLIOGRAFIA.....	34

I. RESUMEN

Se ha propuesto que el mesonefros juega un papel importante en el desarrollo de la gónada. Además de postular la existencia de un factor mesonéfrico, algunos autores proponen que al inicio del desarrollo gonadal, las células del mesonefros participan sustancialmente, por lo que se ha atribuido un origen mesonéfrico a las células somáticas de la gónada. Sin embargo, hasta ahora la mayoría de los estudios han sido puramente descriptivos. La reciente identificación del *SRY* en humanos (*Sry* en ratón) como el factor determinante del testículo en los mamíferos, da la oportunidad para estudiar los mecanismos moleculares y celulares que participan en la diferenciación testicular.

En el ratón el *Sry* se expresa entre los 10.5 y 12.5 *días postcoito (dpc)* y desencadena una serie de interacciones celulares que llevan a la diferenciación de un testículo, a partir de la gónada indiferenciada. Durante estos procesos de diferenciación gonadal, las gónadas de ambos sexos se encuentran en íntima asociación con el mesonefros, de manera que en el presente proyecto nos propusimos investigar el papel de las células mesonéfricas en la diferenciación del testículo fetal, así como, los mecanismos celulares que controlan su morfogénesis a partir de la expresión del *Sry*.

Mediante el empleando de la técnica de cultivo de órganos, en una primera etapa, se estudió la diferenciación sexual de la gónada indiferenciada (11.5 *dpc*) con y sin el mesonefros adyacente. En nuestras condiciones de cultivo, el tiempo de diferenciación tanto de las células de Sertoli como de las de Leydig, así como la formación de los cordones seminíferos, es similar al requerido *in vivo*. Se observó que la diferenciación de las células de Sertoli y Leydig es independiente de la presencia de células mesonéfricas, sin embargo, la formación de los cordones seminíferos requiere la presencia de células provenientes de la región mesonéfrica. Se identificaron células endoteliales y mioides pericordonaes, ambas de origen mesonéfrico, como las responsables de la organización de los cordones seminíferos. Estos resultados nos sugirieron que la migración de las células del estroma desde la región mesonéfrica, puede deberse a una señal que viene de las células de la región de la gónada, probablemente controladas por el *Sry*. De manera que nos preguntamos si únicamente las células del estroma mesonéfrico responden específicamente a esta señal.

Cultivando gónadas aisladas junto con el esbozo de la extremidad anterior (EEA) del mismo embrión, se observó que las células estromáticas del EEA migraron también hacia la región de la gónada, y se llevó a cabo la formación de los cordones seminíferos. Estos resultados sugieren que las células del estroma mesonéfrico no son específicas para llevar a cabo la diferenciación histológica del testículo. Un hallazgo inesperado en este estudio, fue que encontramos que la cantidad de testosterona producida *in vitro* por los injertos difiere, dependiendo del sexo y del tejido injertado. Lo que sugiere que la producción de testosterona puede deberse a la presencia de genes en el cromosoma Y, necesarios para la actividad esteroideogénica de las células de Leydig fetales. Alternativamente, la presencia de células XX podría inhibir la producción de testosterona y metabolizarla hacia estradiol.

En otra serie de experimentos, utilizamos la técnica de disgregación-reagregación de gónadas embrionarias. Encontramos que aunque en gónadas aisladas de 11 *dpc*, mantenidas en cultivo individualmente, no se forman cordones seminíferos, en los reagregados de seis o más gónadas sí lo hacen.

Concluimos entonces que la formación de cordones seminíferos en los reagregados, se debe a la suma de células del estroma mesonéfrico presente en las gónadas disgregadas. En gónadas de esta edad, cultivadas individualmente, el estroma parece ser insuficiente para permitir la organización de los cordones.

1 INTRODUCCION

1.1 Determinación del sexo en mamíferos

El sexo de un embrión es determinado en el momento de la fecundación por el mecanismo XX-XY, pero al principio del desarrollo el embrión tiene potencial de diferenciación en macho o hembra, pues los primordios de los sistemas masculino y femenino están presentes.

Las observaciones de que la presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma de un individuo, hace evidente que en este cromosoma se encuentra el gen o los genes responsables de la diferenciación testicular a partir de la gónada indiferenciada. En humanos este gen se denominó *TDF* (Testis Determining Factor) y en el ratón *Tdy* (Testis determining gene-Y). El producto del *Tdy* o los productos resultantes de la acción de éste, deben ejercer su influencia sobre las células de la gónada indiferenciada y desencadenar el proceso de diferenciación testicular.

Recientemente se ha logrado un gran avance en la identificación de un gen localizado en el brazo corto del cromosoma Y, que parece contener al *TDF*. Este gen codifica para un transcrito específico del testículo con un "motivo" de unión al ADN. A este gen se le denominó *SRY* en humanos (Berta, *et al.* 1990) y *Sry* en ratón (Koopman *et al.* 1990).

Está bien establecido que el *Sry* actúa específicamente en células de la gónada indiferenciada donde lleva a cabo la diferenciación hacia testículo (Lovell-Badge, 1992; Koopman, *et al.* 1991). Para entender el papel del *Sry* en la determinación testicular, es necesario considerar su patrón de expresión en el contexto de cómo se desarrollan las gónadas.

1.2 Morfogénesis gonadal

El sexo gonadal es el conjunto de procesos de diferenciación tanto fisiológicos como morfológicos que lleva a cabo la gónada indiferenciada para transformarse en un ovario o en un testículo.

Durante la morfogénesis de las gónadas de mamíferos, existe una interacción entre dos líneas celulares que componen la gónada: las células germinales (de origen extragonadal) y las células somáticas. De esta manera las gónadas presentan un modelo de morfogénesis diferente al resto de los organismos, ya que en este caso existe la presencia de un componente celular que proviene del exterior y que juega un papel determinante en las dos principales etapas por las cuales pasan las gónadas durante su desarrollo: la etapa indiferenciada y la etapa de diferenciación sexual.

Durante los procesos de morfogénesis de la gónada se pueden observar tres etapas: La primera corresponde a la colonización del primordio gonadal por las células germinales primordiales (CGP). La segunda corresponde a la organización del primordio gonadal como gónada indiferenciada. Y la tercera corresponde a la diferenciación de la gónada en un testículo o en un ovario.

1.2.1 Migración y colonización de las CGP

El establecimiento de las distintas líneas celulares durante el desarrollo se lleva a cabo a diferentes tiempos. En el caso de la línea germinal su determinación parece ser uno de los más tempranos. Aunque el sexo del individuo y con esto el sexo de las gametas, se establece en el momento de la fertilización, existe un período inicial en el cual no es posible detectar diferencias morfofuncionales entre las células precursoras de los ovocitos y los espermatozoides. Este período es el que corresponde al de las células germinales primordiales (CGP).

Las CGP se pueden identificar porque contienen enzimas específicas, como: la fosfatasa alcalina, el glucógeno y las estereasas, así como, con anticuerpos específicos (Hannel y Eddy, 1986).

Se ha reportado que las CGP, predecesoras de las células germinales (CG) en el adulto son de origen extragonadal (Brambell y Parkes, 1927; Everett, 1945; Merchant-Larios, 1975).

En los mamíferos y en particular en el ratón, se sabe que las células germinales derivan del ectodermo embrionario. La etapa más temprana en la que se ha podido detectar a las CGP es en la formación del pliegue cefálico entre los 7.5 y 8 *dpc* (Chiquoine, 1954). Estas se localizan en el endodermo del saco

vitelino y el mesodermo del alantoides, de donde migran hacia la región de las crestas gonadales.

A los 9.5 *dpc* se forma el intestino por invaginación del endodermo, debido a movimientos morfogénéticos; dicho fenómeno lleva consigo primero a las CGP en un desplazamiento caudal por la parte ventral del intestino hasta la parte dorsal. A los 10 *dpc*, en la región ventral del mesonefros, se forma la cresta gonadal por un engrosamiento del epitelio celómico. Este evento coincide con la salida de las CGP del intestino y la migración de éstas por el mesenterio dorsal hacia la región de las crestas gonadales. Las CGP emigran desde su sitio de determinación inicial, hasta la región urogenital por dos tipos de movimientos: pasivo y activo. El primero tiene lugar por una translocación de estas células, localizadas en el endodermo y mesénquima del saco vitelino y el alantoides. De estas formaciones extraembrionarias, las CGP pasan al interior del embrión, junto con el endodermo y mesénquima que formarán al intestino primitivo posterior y al primordio del mesenterio intestinal. A partir de aquí se inicia la migración activa de las CGP.

Se ha tratado de explicar el mecanismo por el cual las CGP llegan a su destino, la cresta genital. Witschi (1948) propuso que las CGP eran guiadas por un gradiente de concentración de algún factor secretado por las células del epitelio celómico situado en la región urogenital, por el cual las células se encaminarían por un proceso de quimiotaxis. Existen evidencias que indican que estas células se guían por agentes o factores difusibles producidos por las crestas genitales (Kuwana, *et al.* 1986; Godin, *et al.* 1990); sin embargo, no se han podido caracterizar dichos factores. Otra hipótesis denominada "guía por contacto" (Weiss, 1945) propone la existencia de caminos preestablecidos por tejidos circundantes, lo cual señala la existencia de receptores específicos en la superficie de las CGP, capaces de adherirse selectivamente a moléculas presentes en la superficie de las células mesenquimáticas y en la matriz extracelular.

Otro mecanismo propuesto para la migración de las CGP, se refiere a la organización topográfica de las células somáticas del embrión, en el momento del desplazamiento de las CGP, donde estarían dispuestas en tal forma que no podrían salirse de la trayectoria que mecánicamente las dirigiría hacia la cresta genital. Alvarez-Buylla y Merchant-Larios (1986) observaron que la fibronectina, glucoproteína abundante en la matriz extracelular, es utilizada por las CGP para su migración.

Durante su migración, las CGP presentan moléculas de superficie, que se modifican o desaparecen gradualmente en diferentes etapas del desarrollo, lo que sugiere que las propiedades de la superficie de las células germinales depende de su ubicación en el embrión (Donovan, *et al.* 1986; Fazel, *et al.* 1987).

1.2.2 Establecimiento de la gónada indiferenciada

El estado indiferenciado de la gónada corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las CGP, y a la proliferación de células somáticas de la región urogenital, que darán origen tanto a los cordones sexuales, como al tejido estromático que constituyen a su vez los elementos histológicos precursores del ovario o del testículo en hembras o machos respectivamente.

El origen de los componentes somáticos de la gónada ha sido motivo de gran controversia. Brambell y Parkes en 1927, al estudiar el desarrollo de la gónada del ratón, propusieron que las células somáticas se originan por proliferación del epitelio celómico. Witschi (1951), con base en sus estudios en anfibios, llegó a la conclusión de que la gónada está compuesta por dos territorios: la corteza derivada del epitelio superficial y la médula derivada del mesonefros. Gillman (1948) y Burns (1961) describen un modelo de doble proliferación del epitelio superficial. Proponen que el testículo se diferencia por proliferación del epitelio celómico que origina a los cordones testiculares y en el caso del ovario, éste se diferencia por una segunda proliferación del epitelio celómico, lo que da origen a los cordones ováricos; paralelamente con esta segunda proliferación debe ocurrir una desaparición de los cordones producto de la primera.

Por otro lado, Zamboni, *et al.* (1979), en ovejas, Upadhyay y Zamboni (1981), con el ratón, y Wartenberg (1981) con embriones de conejo y humano, sugieren que durante los procesos de diferenciación gonadal las células del mesonefros contribuyen sustancialmente a la estructura del ovario o del testículo. Postulan que la gran mayoría, si no es que en su totalidad, las células epiteliales de los cordones sexuales, son derivadas del epitelio de túbulos mesonéfricos. Esta idea se desarrolló con base en evidencias morfológicas, por lo que son necesarias evidencias experimentales para reforzar esta hipótesis.

Otros autores mencionan que no existen evidencias claras para soportar la hipótesis de un origen mesonéfrico de las células somáticas (Deanesly, 1975; Dang

y Fouquet 1979; Merchant-Larios, 1979). Si se aceptara el origen mesonéfrico de estas células, también se tendría que aceptar que las células epiteliales mesonéfricas, con función excretora, tendrían que desdiferenciarse para pasar a formar parte de una estructura con funciones completamente diferentes. Por su parte Wartenberg (1981), sostiene que el origen es por contribución de ambas partes, epitelio celómico y mesonefros.

Las diferencias en los patrones y mecanismos del desarrollo gonadal han sido atribuidas a diferencias específicas en la complejidad estructural, funcionalidad y estado de diferenciación-involución del mesonefros en los diferentes grupos estudiados (Yoshinaga *et al.* 1988). Cabe señalar, que durante el desarrollo embrionario, no en todos los mamíferos el mesonefros es funcional. En trabajos realizados con embriones de pollo, Merchant-Larios, *et al.* (1984) provocaron agénesis unilateral del mesonefros y sugieren que no hay participación de las células epiteliales de este órgano para el establecimiento de los cordones sexuales de la gónada indiferenciada. Sin embargo, las células mesenquimáticas y vasos sanguíneos de la región mesonéfrica invaden la gónada.

Dado que algunas observaciones en una misma especie son contradictorias, es probable que exista un patrón único en la formación del tejido gonadal, pero que las diferencias en interpretación hayan producido esta diversidad de hipótesis sobre el origen de las células y forma en la que se establece la gónada.

En estudios morfológicos a nivel de microscopía electrónica, se puede observar la formación de la lámina basal, lo cual puede servir como un criterio para evidenciar la presencia de células somáticas en diferentes sitios. Se ha visto que la lámina basal en el epitelio celómico es interrumpida en una región localizada en la cresta gonadal. En esta región, estas células son ultraestructuralmente idénticas al epitelio, pero diferentes del blastema mesonéfrico. Este proceso se ha descrito en el desarrollo gonadal de *Xenopus laevis* y *Rana pipiens* (Merchant-Larios y Villalpando, 1981).

En mamíferos, no es claro que existan cambios en la lámina basal como ocurre en anfibios, esto se debe a que no han sido establecidas diferencias ultraestructurales entre las células mesoteliales, mesenquimáticas y mesonéfricas. Los nombres de estas células se derivan exclusivamente de su localización.

Un criterio para identificar a las células mesonéfricas es la presencia de lisosomas autofágicos. Este fenómeno podría deberse a la intensa actividad degenerativa, resultante de una muerte celular programada común en otros órganos en desarrollo.

En las células de los túbulos mesonéfricos de la rata y el ratón se observan formas mitóticas con apariencia degenerativa, lo cual sugiere la desorganización y organización simultánea del mesonefros que nunca es funcional en estas especies. Sin embargo, forma parte integral del desarrollo del sistema excretor y juega un papel importante en la inducción del metanefros.

Las observaciones realizadas durante el inicio de la formación de la cresta urogenital en mamíferos, con períodos cortos de gestación revelan una condensación de células mesenquimáticas. Esta condensación lleva a la organización de los túbulos mesonéfricos. La lámina basal del mesotelio es interrumpida en la región de la futura cresta genital, la cual es más densa debido a la estratificación de células mesoteliales. Esta es una región de gran actividad proliferativa y movimiento celular, lo que representa un alto consumo de energía. Debido a la gran invasión de vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica, junto con la migración de las CGP hacia la cresta genital, da la impresión de que el crecimiento de las crestas genitales se lleva a cabo por la migración de células provenientes del mesonefros.

Si las células de la región mesonéfrica están participando en el desarrollo gonadal, una pregunta importante sería ¿qué tipo de células?. Para responder a esta pregunta, primero es necesario considerar si el mesonefros funciona como un órgano de excreción en las especies estudiadas. En rata y ratón, en el mesonefros encontramos el conducto mesonéfrico o conducto de Wolff y los túbulos mesonéfricos; la mayoría de los túbulos aún no se han formado cuando las crestas genitales inician su crecimiento.

Los túbulos mesonéfricos se localizan cerca de las crestas genitales, y no hay lámina basal. Las células en la región ventral de los túbulos mesonéfricos se encuentran laxamente distribuidas. Todas estas características darían la impresión de que los túbulos están mandando células hacia la región de el epitelio celómico. Aquí la lámina basal es interrumpida y se observa una gran actividad de proliferación.

Merchant-Larios (1979), en un estudio de autoradiografía de la región urogenital de embriones de rata, demostró que hay una gran actividad de proliferación en tres compartimentos; los túbulos mesonéfricos, mesénquima y mesotelio. Debido a que existe una gran cantidad de muerte celular en el primer

compartimento, propone que la morfogénesis de la región urogenital en mamíferos con períodos cortos de gestación, como el ratón y la rata, se lleva a cabo de la siguiente manera: el canal mesonéfrico induce la organización de los túbulos mesonéfricos de células mesenquimáticas de la región urogenital. Al mismo tiempo, se da una condensación de células epiteliales y mesenquimáticas en el epitelio celómico. Al utilizar un marcador radioactivo encontró que las células de este "blastema gonadal" tienen un ciclo más prolongado que las células mesenquimáticas y mesoteliales, lo que se interpreta como una señal de diferenciación temprana.

Las células mesenquimáticas de la región del mesonefros podrían ser inducidas a participar en la formación de la gónada. Este hecho, junto con la invasión de vasos sanguíneos y las CGP, desde la región mesonéfrica, podría sugerir un origen mesonéfrico de las células somáticas. Sin embargo, estas células son parte del mesénquima urogenital y su diferenciación ocurre simultáneamente a la formación del mesonefros.

Los estudios de Humphrey (1933) en *Rana sylvatica* y de Cambar y Mesnage (1963) en otras ranas y sapos, demostraron que el mesonefros no es necesario para la formación de la gónada. Bishop-Calamé (1966), al trabajar con embriones de pollo, en los cuales inhibió la diferenciación del mesonefros, reportó la formación de una gónada, aunque más pequeña que las normales.

En mamíferos, la contribución del mesonefros durante el desarrollo de la gónada aún no es claro (Wartenberg, *et al.* 1991). Al estudiar el desarrollo de testículos fetales de rata *in vitro*, algunos autores proponen que la diferenciación de células de Sertoli y de Leydig, así como la formación de los cordones seminíferos en testículos fetales de mamíferos, es controlada por mecanismos independientes (Magre y Jost, 1984; Patsavoudi *et al.* 1985).

Algunos estudios experimentales recientes en el ratón han demostrado que las células del estroma (mioides, vasos sanguíneos, fibroblastos) tienen un origen mesonéfrico y que el testículo fetal en el ratón se desarrolla mejor cuando es cultivado junto con el mesonefros adyacente (Buehr, *et al.* 1993).

1.2.3 Diferenciación sexual de la gónada: diferenciación testicular

La primera hipótesis para explicar la diferenciación sexual de la gónada de los vertebrados fue propuesta por E. Witschi en 1951. Se conoció como la hipótesis del antagonismo corticomedular. Supone la existencia de dos sustancias: una producida por la corteza (cortexina) y otra producida por la médula (medularina). Una de éstas, según el sexo genético, se sobreproduce y origina una

proliferación del territorio correspondiente y una inhibición de la proliferación del territorio contrario. De tal manera que se diferenciará un ovario si la corteza tiene una proliferación más abundante o un testículo si la proliferación es mayor en la zona medular.

Esta hipótesis prevaleció por más de 20 años y fue hasta 1975 cuando Wachtel *et al.* propusieron al antígeno de histocompatibilidad H-Y como el responsable de la inducción de la diferenciación testicular. Se observó que los individuos que presentaban testículos eran antígeno H-Y positivos independientemente de su cariotipo (Silver y Wachtel, 1977; Ohno *et al.*, 1979). Sin embargo, al ampliar el número de casos se observó que existen individuos que presentan testículos y son antígeno H-Y negativo, y que mujeres con H-Y positivo presentan ovarios normales. Esto llevó a pensar que el papel de dicho antígeno en la morfogénesis de la gónada no es claro, por lo que finalmente se descartó a este factor como el responsable de la diferenciación gonadal.

El gene *Sry*, recientemente identificado, reúne todas las propiedades biológicas y genéticas esperadas del gene determinante del testículo. En el caso del ratón su identidad se confirmó plenamente al transferir el gene hacia animales transgénicos (Koopman *et al.* 1991). Aunque el *Sry* consiste de una secuencia de 35 Kb en humanos, un fragmento de sólo 14 Kb del *Sry* del ratón, fue capaz de inducir la formación de testículos en hembras XX. Como se sabe que el gene *Sry* codifica para una proteína que se asocia al ADN, se supone que su acción es intracelular y que no se difunde. Por lo tanto, es probable que controle la expresión de otros genes en la misma célula, modificando así su comportamiento fisiológico. Dicha modificación pudiera ser la producción de un factor o factores responsables de los diversos cambios morfogénéticos necesarios para la diferenciación del testículo a partir de la gónada indiferenciada.

En el ratón el *Sry* se expresa entre los 10.5 y 12.5 *dpc* cuando las gónadas de ambos sexos son morfológicamente idénticas (Koopman *et al.* 1990).

En los mamíferos, el testículo es el primero en diferenciarse histológicamente, mientras que el ovario permanece un tiempo con la apariencia de gónada indiferenciada. En el caso del ratón, los primeros indicios de diferenciación ovárica se registran un par de días después de la diferenciación testicular, que en esta especie es a los 12 *dpc*.

La diferenciación del testículo se inicia cuando los cordones epiteliales que contienen a las células germinales se separan del epitelio celómico como consecuencia de los arreglos producidos por una invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que provoca la compactación de los cordones testiculares (formados por células del epitelio interno o células de Sertoli y las CG) y separación de estos del epitelio superficial lo que da lugar a la túnica albugínea.

Las células que rodean a los cordones testiculares se aplanan en forma paralela a la lámina basal. Estas células al diferenciarse se les denomina células mioides, que son las encargadas de la formación de las membranas basales. Ultraestructuralmente se caracterizan por tener un retículo endoplásmico rugoso muy desarrollado y en el espacio extracelular adyacente a éstas, se observa gran cantidad de material fibrilar como colágena y fibronectina (Paranko *et al.* 1983).

Las células del epitelio interno, es decir, las células de Sertoli, tienen dos funciones principales: el empaquetamiento de las CG y la síntesis de la hormona antimulleriana (Josso *et al.* 1977), responsable de la regresión de los conductos Mullerianos. Probablemente, las células de Sertoli intervengan en la producción de un factor inhibidor de la meiosis (Byskov, 1978). Las células de Sertoli forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplásmicas que rodean a las CG. En el ratón, en etapa fetal, entre las células de Sertoli se encuentran uniones estrechas incompletas; éstas en el adulto se completan y forman las uniones intersertolianas que originan la barrera hematotesticular (Nagano y Zuzuki, 1976). Estas células sólo proliferan durante la etapa fetal y por un corto tiempo en el período postnatal. En la rata este lapso abarca hasta dos semanas después del nacimiento (Nagy, 1972).

La síntesis de la hormona inhibidora de los conductos mullerianos o sustancia inhibidora de los conductos Mullerianos (MIS), es secretada específicamente por las células de Sertoli en testículos fetales y adultos y por células de la granulosa en ovarios postnatales (Cate *et al.*, 1990). La citodiferenciación endócrina de estas células parece ser independiente de la formación de los cordones testiculares; lo anterior se desprende de los estudios realizados por Magre y Jost (1984), donde muestran que en testículos de rata, con ausencia de organización testicular, provocada por el cultivo en un medio suplementado con suero bovino fetal (Magre *et al.* 1981), las células de Sertoli desarrollan y conservan la capacidad de síntesis de la hormona antimulleriana.

En el ratón, MIS es primero detectado por hibridación *in situ* en testículos fetales a los 12.5 *dpc* y en el ovario a los 6 días después del nacimiento (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991). Después del nacimiento y en el adulto el MIS se continúa expresando en las células de Sertoli, aunque los niveles decrecen inmediatamente después del nacimiento (Josso *et al.* 1993). Este decremento coincide con la diferenciación terminal de las células de Sertoli y el inicio de la espermatogénesis (Cate y Wilson, 1993). La especificidad del tipo celular y el tiempo de expresión del MIS sugieren que esta sustancia podría estar regulando la espermatogénesis (Jost *et al.* 1972).

Durante el desarrollo fetal en machos, los testículos descienden desde el abdomen hasta la región inguinal y posteriormente hacia el escroto. Se ha observado que cuando los testículos no descienden, se detectan niveles bajos de MIS (Donahoe *et al.*, 1977 -ratón-; Hutson y Donahoe, 1986 -humano-). Los ratones transgénicos que presentan muy bajos niveles de MIS humano circulante, no presentan descenso testicular (Behringer *et al.* 1990). Estos estudios sugieren que el MIS juega un papel importante en estos procesos.

Burgoyne (1988) propone que el Tdy (ahora *Sry*) actúa en las células de Sertoli para llevar a cabo su diferenciación, y todos los demás eventos del desarrollo del testículo son dirigidos por las células de Sertoli.

Behringer *et al.* (1994), investigaron el papel de MIS en ratones transgénicos deficientes de esta hormona y encontraron que el MIS es importante para que se lleve a cabo la regresión de los conductos Mullerianos durante el desarrollo fetal del macho. Además, el MIS no es necesario para la gametogénesis

en machos y hembras, pero funciona en los testículos para regular la proliferación de las células de Leydig.

Las células de Leydig se diferencian a partir del tejido intersticial y son las encargadas de la síntesis de andrógenos en el testículo. Estas células se diferencian poco tiempo después de la diferenciación de los cordones testiculares. Al igual que en las células de Sertoli, parece que la diferenciación endócrina de las células de Leydig es independiente de la organización del testículo. Patsavoudi *et al.* (1985), al inhibir el desarrollo del testículo, observaron que las células de Leydig desarrollan y conservan la capacidad de sintetizar esteroides. En el ratón, la diferenciación de las células de Leydig se hace evidente a partir de los 14 *dpc*; se caracterizan por presentar gran cantidad de mitocondrias de crestas tubulares, orgánulos característicos de células productoras de esteroides. También se observa a partir de este momento, un gran desarrollo del retículo endoplásmico liso, aparición de gotitas de lípidos e inclusiones de glucógeno en el citoplasma (Russo y De Rosas, 1971). El origen de este tipo celular es muy controvertido, algunos autores proponen que su diferenciación es a partir del tejido mesenquimático, pero otros sustentan que tienen el mismo origen que las células del epitelio interno e inclusive se ha llegado a postular un doble origen. La función principal de este tipo celular, durante el período prenatal, es la producción de testosterona, que induce el desarrollo de los conductos de Wolf, que darán origen a los genitales internos. Para la formación de los genitales externos, sólo se requiere de la testosterona, la cual es biotransformada en 5-alfa-dihidrotestosterona por células del seno urogenital.

Las células germinales en el testículo temprano reciben el nombre de proespermatozonias (Hillscher y Hillscher 1978). Estas presentan características que indican que entraron a otra etapa de diferenciación, representada por un período de proliferación activa seguida por un período de reposo mitótico que mantienen hasta la pubertad. El inicio del reposo mitótico coincide con el inicio de la meiosis en el ovario. Se ha observado que en ocasiones, algunas CG en posición cercana al mesonefros, parecen entrar a la profase de la primera división meiótica (Byskov, 1978); lo mismo se observó en algunas células germinales en posición extracordal y cercanas al mesonefros. Con base en las observaciones anteriores, Byskov propuso la existencia de un factor inhibidor de la meiosis sintetizado por componentes epiteliales mesonefricos.

Upadhyay y Zamboni (1982) encontraron que las CG, que quedan atrapadas en la región de la glándula suprarrenal, entran en meiosis sin importar el sexo genético del individuo, e incluso que éstas llegan a presentar características morfológicas muy similares a ovocitos primordiales. Con base en lo anterior, postularon que en la gónada debe existir algún factor inhibidor de la meiosis; sin embargo, tal como lo sugieren sus resultados, están en contra del factor inductor de la meiosis de origen mesonéfrico.

Los mecanismos que regulan el comportamiento proliferativo de las proespermatogonias se desconocen, sin embargo se ha postulado que las células de Sertoli sintetizan un factor inhibidor del inicio de la meiosis embrionaria que parece coincidir con la entrada en reposo mitótico (Byskov y Saxen, 1976; Evans *et al.* 1982; Upadhyay y Zamboni, 1982; Dolci y De Felici, 1990).

Otra característica importante que presentan las CG es la presencia de puentes citoplásmicos, producto de citocinesis incompletas. Estos puentes son conservados por las CG hasta su diferenciación en espermátidas y desaparecen cuando se diferencian en espermatozoides. Se postula que estos puentes participan en la sincronización de la maduración de las CG, divisiones mitóticas y regulación genética (Gondos, 1984).

Finalmente, se sabe que la diferenciación testicular puede ocurrir en ausencia de CG (Merchant-Larios, 1975). Lo anterior indica que los fenómenos morfogenéticos que ocurren durante la diferenciación testicular están controlados por los componentes somáticos de la gónada.

1.3 Interacciones y asociaciones celulares en la morfogénesis embrionaria

En la secuencia de acontecimientos que se llevan a cabo durante el desarrollo embrionario (morfogénesis, proliferación y diferenciación celular), la superficie celular juega un papel importante. Es la estructura mediante la cual las células reconocen su ambiente, se comunican, reconocen a otras células y se unen para formar tejidos. Estos eventos recíprocos entre el interior y el exterior de las células, mediados por la superficie celular, dirigen a las células embrionarias en los procesos de morfogénesis y diferenciación celular.

El arreglo espacial, el cambio de sitio de las células migratorias, el

ensamblaje y la agregación celular selectiva, son fenómenos muy importantes en los procesos morfogénéticos. Las células embrionarias son capaces de identificar a otras por medio del contacto y de asociarse selectivamente y así desarrollar tejidos y órganos. Los experimentos de reagregación de suspensiones celulares han demostrado que las células embrionarias poseen la capacidad propia de autoensamblarse en tejidos. La mayoría de las evidencias que apoyan lo anterior provienen de estudios de reagregación de suspensiones celulares de embriones de ratón y pollo. Sin embargo, este enfoque experimental se remonta hasta estudios realizados con esponjas y embriones de equinodermos a principios de este siglo (Faure-Fremient, 1932; Brien, 1937).

Este modelo experimental se ha utilizado para tratar de entender los mecanismos de regulación que participan en la diferenciación sexual de las gónadas de aves y mamíferos (Muller, *et al.* 1982; Zenzes y Engel, 1981; Grund, *et al.* 1986), en función de que los fenómenos que ocurren durante la reagregación de suspensiones celulares recapitulan los que ocurren durante la morfogénesis normal de la gónada.

Escalante y Merchant-Larios (1992), realizaron un estudio de los patrones de agregación histotípica de testículos embrionarios de ratón partiendo de los 12.5 *dpc*. Utilizaron el método de agregación en cultivo de órganos, y observaron que las células somáticas formaron patrones histotípicos semejantes a los de gónadas intactas, es decir, la estructuración de cordones seminíferos segregados del compartimento estromático. Con este modelo de disgregación-reagregación es posible analizar varios tipos de interacciones celulares durante el desarrollo gonadal temprano, al partir de etapas indiferenciadas de la gónada, cuando el *Sry* se está expresando (10.5-12.5 *dpc*), hasta etapas de diferenciación gonadal.

2 OBJETIVO

Estudiar el papel del mesonefros en el desarrollo de la gónada indiferenciada

Objetivos particulares:

- A) Analizar el efecto del mesonefros en el testículo:**
 - Sobre la diferenciación de las células de Sertoli
 - Sobre la diferenciación de las células de Leydig
 - Sobre la formación de los cordones seminíferos

- B) Estudiar la especificidad del estroma mesonéfrico comparandolo con el proveniente de otros órganos en la diferenciación del testículo.**

- C) Analizar el comportamiento de las células gonadales en etapa indiferenciada disgregando-reagregando.**

3 METODOS Y RESULTADOS PUBLICADOS

The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis

HORACIO MERCHANT-LARIOS¹*, NORMA MORENO-MENDOZA¹ and MIA BUEHR²

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional de México, México D.F., Mexico and

²MRC Mammalian Development Unit, London, United Kingdom

ABSTRACT In mouse fetal gonads, the adjacent mesonephros is required for seminiferous cord formation *in vitro* (Buehr *et al.*, *Development* 117: 273-281, 1993). Here, we have investigated the role of mesonephric cells in seminiferous cord formation and in differentiation of Sertoli and Leydig cells. Undifferentiated male gonads with and without mesonephros at 11.5 dpc were cultured and immunocytochemical staining of Müllerian-inhibiting substance (MIS) was used as the criterion for Sertoli cell differentiation. For Leydig cells, testosterone (T) radioimmunoassay and cytochemical detection of $\Delta 5$ -3 β -hydroxysteroid-dehydrogenase (HSD) were undertaken. An ultrastructural study was also performed. In our culture conditions, the timing of differentiation of both Sertoli and Leydig cells was similar to that in the fetus. Although mesonephros is required for seminiferous cord formation, differentiation of Sertoli and Leydig cells proceeds in its absence at 11.5 dpc. Moreover, when 3H-thymidine labeled mesonephroi were grafted to unlabeled gonads, endothelial and peritubular myoid-like cells migrated into the gonad. We propose that these cells might be the mesonephric cells required for seminiferous cord formation.

KEY WORDS: mouse fetal testis, mesonephros, Sertoli cells, Leydig cells, endothelial cells

Introduction

The recent demonstration of *Sry* as the testis-determining factor (*Tdy*) (Koopman *et al.*, 1991), and that its encoded product is likely a DNA-binding protein (Harley *et al.*, 1992) which cannot function as a diffusible morphogen, emphasizes the importance of short range cell interactions at the onset of male gonad differentiation. *Sry* is expressed at 10.5 and 11.5 days post coitum (dpc), when gonads of both XX and XY embryos are morphologically alike (Koopman *et al.*, 1990). Two main processes characterize the onset of testis differentiation: seminiferous cord formation, and differentiation of Sertoli and Leydig cells. Since these processes immediately follow *Sry* expression, knowing the relationship between the two processes is required for an understanding of the cascade of events switched on by *Sry*.

At the sexually undifferentiated stage, the mammalian gonad is already a complex structure formed by diverse cell lineages (see Wartenberg *et al.*, 1991 for a recent review). Briefly, most primordial germ cells (PGCs) appear closely associated with epithelial-like cells which begin to deposit basal lamina leading to the segregation of two tissue compartments: epithelial and stromal, (Merchant-Larios and Taketo, 1991).

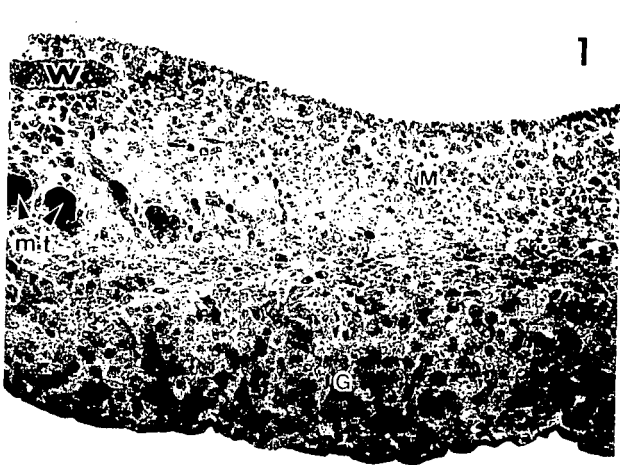
At the onset of testis differentiation, the epithelial compartment becomes organized as seminiferous cords, due mainly to an

increased amount of stromal tissue. Mesenchymal, endothelial and myoid cells form the latter tissue at this stage of development. Since *Sry* is expressed at the undifferentiated stage, it might be responsible for these changes. Burgoyne (1988) has proposed that *Tdy* (now *Sry*) acts cell-autonomously to bring about Sertoli cell differentiation and that all other aspects of fetal testicular development are directed by Sertoli cells. Experimental evidence obtained from rat fetal gonad in organ culture, however, has led other authors to the concept that cell differentiation and morphogenesis in the mammalian gonad might follow separate control mechanisms (Magre and Jost, 1984; Jost and Magre, 1988).

Although the mesonephric contribution to preSertoli cells in the gonad still remains controversial (Wartenberg *et al.*, 1991), a recent experimental study in the mouse has demonstrated that at least some stromal cells (myoid, fibroblast-like cells) have a mesonephric origin (Buehr *et al.*, 1993). Moreover, in this work, it was found that seminiferous cord formation *in vitro* apparently requires the attached mesonephros, since isolated male gonads at 11.5 dpc fail to differentiate cords.

Abbreviations used in this paper: dpc, days post coitum; HSD, $\Delta 5$ -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; MIS, Müllerian-inhibiting substance; PGCs, primordial germ cells; RIA, radioimmunoassay; T, testosterone; *Tdy*, Testis determining factor.

*Address for reprints: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apdo. Post. 70220, México D.F., México 04510. Fax: 525-550-0048.



In the work presented here, we have extended the analysis of the role played by the mesonephros in testis differentiation. Three criteria were considered: formation of seminiferous cords and differentiation of Sertoli and Leydig cells. After undifferentiated gonads with or without mesonephroi were placed in organ culture, immunohistochemical staining for Müllerian-inhibiting substance (MIS) and laminin were used to assess Sertoli cell differentiation and cord formation, respectively. For Leydig cell differentiation, both cytochemical detection of $\Delta 5\text{-}3\beta\text{-hydroxysteroid dehydrogenase}$ (HSD) activity and radioimmunoassay (RIA) of testosterone (T) were undertaken. Moreover, cells in the isolated mesonephros were labeled with H3-thymidine, and their penetration into grafted testis was studied by autoradiography.

We found that although the mesonephros is required for seminiferous cord formation, Sertoli and Leydig cells differentiate in the gonads without mesonephros. Moreover, since labeled endothelial and myoid cells were detected around the seminiferous cords in grafted gonads, we postulate an active role of these mesonephric cells in normal seminiferous cord formation. Furthermore, since no labeled Leydig cells were found in isolated gonads, we suggest that their precursors are present in the gonadal anlage at 11.5 dpc when the *Sry* is still being expressed.

Results

Morphology of urogenital complexes at 11.5 dpc

When male urogenital complexes were isolated from embryos at 11.5 dpc, when the hindlimb was at stages 4 and 5 (McLaren and Buehr, 1990), the mesonephric and gonadal regions were already clearly distinguishable (Fig. 1). In the former, the Wolffian duct, mesonephric tubules, loose mesenchymal cells and blood vessels were the most conspicuous tissues. On the other hand, the gonadal anlage was formed by a heterogeneous population of densely packaged cells through which some blood vessels from the mesonephric region penetrated (Fig. 2). For cultures of isolated testes, they were separated from the mesonephros and only the densely packaged gonadal tissue was cultured. Observation of this region under the electron microscope revealed that epithelial-like cells closely attached to primordial germ cells began to deposit thin basal lamina which separated them from a densely arranged stromal tissue (data not shown). In the latter, blood vessels and spindle shaped cells were beginning to delineate the epithelial cords.

Time course of gonadal development in culture

Table 1 summarizes the time course of development from mouse testes at 11.5 dpc with or without mesonephros. Seminiferous cord formation detected in semithin sections was clearly defined in the testis with mesonephros after 24 h *in vitro* (Fig. 3). Thereafter, seminiferous cords became completely surrounded by basal lamina

TABLE 1
DEVELOPMENT OF FETAL MOUSE TESTIS AT 11.5 dpc
IN ORGAN CULTURE

Time in culture (hours)	Condition	MIS	$\Delta 53\beta\text{-HSD}$	Seminiferous cords
12	MG	(+) n = 4	(-) n = 2	(+) n = 4
	G	-	-	-
24	MG	(+) n = 5	(-) n = 2	(+) n = 5
	G	(+) n = 5	(-) n = 2	(+) n = 5
48	MG	(+) n = 3	(-) n = 2	(+) n = 3
	G	(+) n = 2	(-) n = 2	(-) n = 2
72	MG	(+) n = 4	(+) n = 4	(+) n = 3
	G	(+) n = 4	(+) n = 4	(-) n = 3
96	MG	(+) n = 8	(+) n = 8	(+) n = 6
	G	(+) n = 5	(+) n = 5	(-) n = 4

MG, urogenital complexes; G, isolated gonad; n, number of testes.

to which early myoid-like cells were attached. Blood vessels, fibroblasts and mesenchymal cells in the stromal compartment made the seminiferous cords more conspicuous (Fig. 4). Laminin was strongly detected in basement membranes around the seminiferous cords and irregularly distributed in the stromal compartment (Fig. 5).

On the other hand, in the testis without the mesonephros, cord-like formation was rarely found. When it occurred, the presence of stromal tissue was evident (probably due to mesonephric contamination). Observations under the light microscope revealed that although some prospermatogonia remained among somatic cells of different shape and density, neither endothelial nor myoid-like cells could be identified (Fig. 6). Laminin was detected in random distribution and no signs of epithelial formation were present (Fig. 7).

Although immunocytochemical staining for MIS was negative in testes at 11.5 dpc before culture and after the first 4 h *in vitro*, low intensity of MIS staining was first detected in Sertoli cells after 12 h of culture (Fig. 8). Thereafter, from 24 h onwards, MIS staining intensity increased and remained intense until 96 h, the time limit in which fetal testes were maintained in culture (Fig. 9).

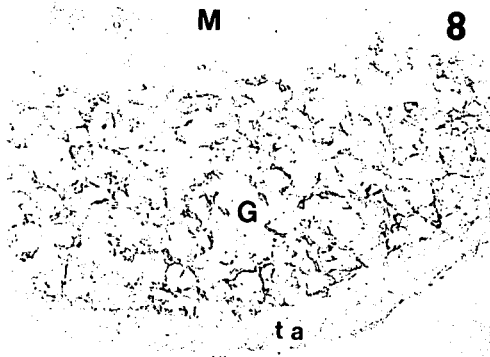
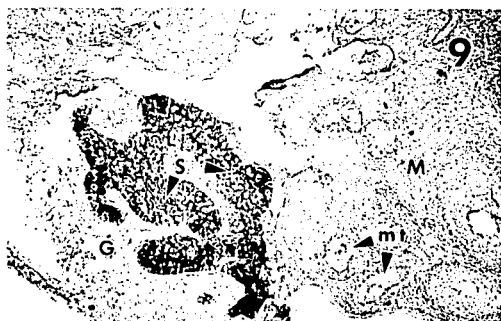
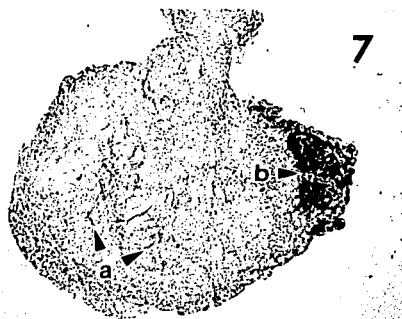
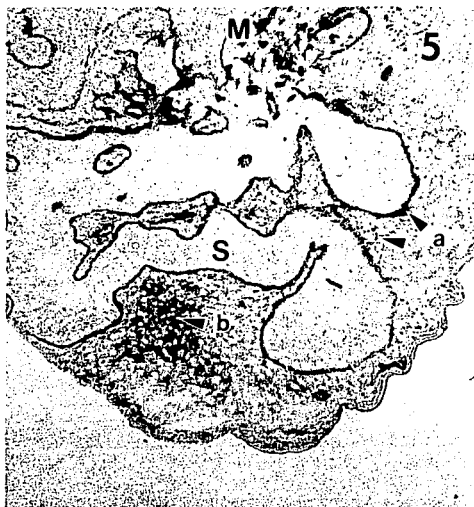
As indicated in Table 1, the ontogeny of MIS stained cells was similar between the testes cultured with or without the adjacent mesonephros. Distribution of MIS positive cells, however, was different depending upon the presence of mesonephros. In urogenital complexes, MIS positive cells were organized regularly into cord-like formations in the gonadal region (Fig. 9). In isolated testes, by contrast, MIS positive cells appeared as irregular clusters in random distribution (Fig. 10).

Fig. 1. Longitudinal section of the urogenital ridge at 11.5 dpc before culture. Part of the Wolffian duct (W) and some mesonephric tubules (mt) among loose mesenchymal cells are seen in the mesonephric region (M). The gonadal anlage (G) appears as a compact arrangement of somatic and germ cells. (x200).

Fig. 2. A blood vessel (bv) penetrating into the gonad (G) from the mesonephric region (M). Part of two mesonephric tubules (mt) can be seen. (x600).

Fig. 3. Urogenital ridge after 24 h of culture. Seminiferous cords (S) start to be evident by the presence of stromal tissue (st) around them. The tunica albuginea (ta) and several mesonephric tubules (mt) are also shown. (x200).

Fig. 4. Well-formed seminiferous cords (SC) in a testis cultured 96 h with the adjacent mesonephros. Germ cells (g), Sertoli cells (Se), myoid-like cells (mi) and Leydig cells (L) are shown. (x750).



$\Delta 5$ - 3β -HSD activity was first histochemically detected after 48 h of culture in both urogenital complexes and isolated testes. This enzymatic activity remained positive in all organs cultured for 72 and 96 h (Table 1). As in the case of MIS, distribution of $\Delta 5$ - 3β -HSD activity differed between testes cultured with or without mesonephros. In the former, $\Delta 5$ - 3β -HSD positive cells were localized in stromal cells among the seminiferous cords (Fig. 5). In isolated testes, $\Delta 5$ - 3β -HSD positive cells appeared to be randomly localized and often formed a cluster on one side of the explant (Fig. 7).

Examinations of the explants at the electron microscope level reaffirmed and extended the observation at the light microscope. Although deposition of basement membrane components around the seminiferous cords began by 11.5 dpc (stages 4-5), its completion occurred *in vitro* only when the adjacent mesonephros was left in the explant (Fig. 11). Otherwise, only uncompleted basement membrane or irregular deposits of its components appeared between somatic cells (Fig. 12). In the explants of urogenital complexes, Sertoli and myoid-like cells were well differentiated after 96 h in culture (Fig. 11). In the isolated testes maintained for the same period *in vitro*, only Sertoli-like and Leydig cells distributed among undifferentiated stromal cells were seen, endothelial and myoid-like cells were not found (data not shown).

Testis-mesonephros grafts

After 4 h exposure to ^3H -thymidine in the culture medium, around 30% of cells in the isolated mesonephros were labeled. The least number of labeled cells was found among the epithelial cells of mesonephric tubules (around 10%). Nuclei of mesenchymal and endothelial cells appeared densely labeled (Fig. 13). After 4-6 days of culture, less than 5% cells remained labeled in the grafted explants. Some stayed in the mesonephros and others penetrated into the grafted gonad (Figs. 14 and 15).

The labeled cells were distributed in the stromal compartment and identified as mesenchymal, peritubular myoid-like cells and endothelial cells. The peritubular myoid cells were identified by their attachment to the basement membrane of the seminiferous cords (Fig. 14). Endothelial cells were identified as elongated cells forming blood vessels with a cavity sometimes filled with erythroblasts (Fig. 15).

Radioimmunoassay of testosterone

The levels of T accumulated in culture media steadily increased during incubation from 48 to 96 h (Fig. 16). The effect of mesonephros on testosterone production statistically was not significant (F ratio = 2.86; d.f. = 5,64; $P < 0.05$).

Discussion

Studying the development of rat fetal testis *in vitro*, some authors have proposed that differentiation of Sertoli cells, Leydig cells and seminiferous cords in mammalian fetal testis might be controlled by independent mechanisms (Magre and Jost, 1984; Patsavoudi *et al.*, 1985). When rat fetal gonads were cultured in the presence of fetal calf serum, Sertoli and Leydig cell differentiated but seminiferous cords failed to form (Magre *et al.*, 1981). In the mouse fetal gonads cultured in presence of the alpha globin fraction of human serum, Sertoli cells differentiated, but Leydig cells and seminiferous cords were not formed (Jost and Magre, 1988). Furthermore, Taketo *et al.* (1984), studying mouse fetal gonad development in organ culture, found that addition of dibutyryl-cAMP prevents seminiferous cord formation without affecting the physiological differentiation of Leydig cells. Although these observations suggest that differentiation of Sertoli cells, Leydig cells and seminiferous cords can be inhibited independently *in vitro*, the role of the adjacent mesonephros was not considered.

On the other hand, it has been recently found that mouse fetal testes develop better when they are cultured with the adjacent mesonephros than without. It was suggested that this organ may play an important role in differentiation of the male gonad, since isolated male gonads fail to form seminiferous cords in the absence of the attached mesonephros (Buehr *et al.*, 1993).

In the present study it was confirmed that the adjacent mesonephric region is required for the morphogenetic process leading to formation of seminiferous cords in the mouse gonad *in vitro*. Moreover, our autoradiographic analysis demonstrates that at least two kinds of stromal cells penetrate the testis from the mesonephric region: peritubular myoid-like and endothelial cells. Therefore it is reasonable to postulate that these cells and/or their extracellular products are the mesonephric contribution to seminiferous cord formation and indicate why at the onset of testis differentiation this region is required for normal segregation of epithelial and stromal compartments *in vitro*. It would be interesting to see if factors such as alpha globin (Jost and Magre, 1988) and dibutyryl-cAMP (Taketo *et al.*, 1984), which prevent seminiferous cord organization in mouse fetal testis, also disturb the migration of mesonephric stromal cells onto the gonad. Moreover, it has been observed that seminiferous cords form *in vitro* even after dissociation-aggregation of isolated testis at 12.5 dpc (Escalante-Alcalde and Merchant-Larios, 1992). Therefore, the presence of mesonephric cells in the male gonad necessary for cord formation appears to be critical at 11.5 dpc.

Fig. 5. Testis cultured 96 h with the adjacent mesonephros (M). Detection of laminin (a) and $\Delta 5$ 3β -HSD (b) were performed in the same section. Laminin appears around the seminiferous cords (S) and in some regions of the stromal compartment. Formazan deposits reveal the presence of Leydig cells in the stroma. ($\times 200$).

Fig. 6. Semithin section of a gonad cultured 96 h without the adjacent mesonephros. Some germ cells (g) randomly distributed among a heterogeneous mass of somatic cells are shown. ($\times 600$).

Fig. 7. Detection of laminin (a) and $\Delta 5$ 3β -HSD activity (b) in an isolated gonad after 96 h of culture. Irregular deposits of both laminin and steroidogenic cells can be seen. ($\times 200$).

Fig. 8. MIS detection in a male gonad cultured 12 h. Positive Sertoli cells are in the gonadal region (G) between the mesonephros (M) and the forming tunica albuginea (ta). ($\times 200$).

Fig. 9. Urogenital complex cultured 96 h. Immunohistochemical staining for MIS reveals well-organized seminiferous cords (S) in the gonadal region (G). In the mesonephric region (M) some mesonephric tubules (mt) can be seen. ($\times 100$).

Fig. 10. Immunohistochemical staining for MIS in an isolated testis cultured 96 h. Positive cells appear irregularly distributed. ($\times 100$).

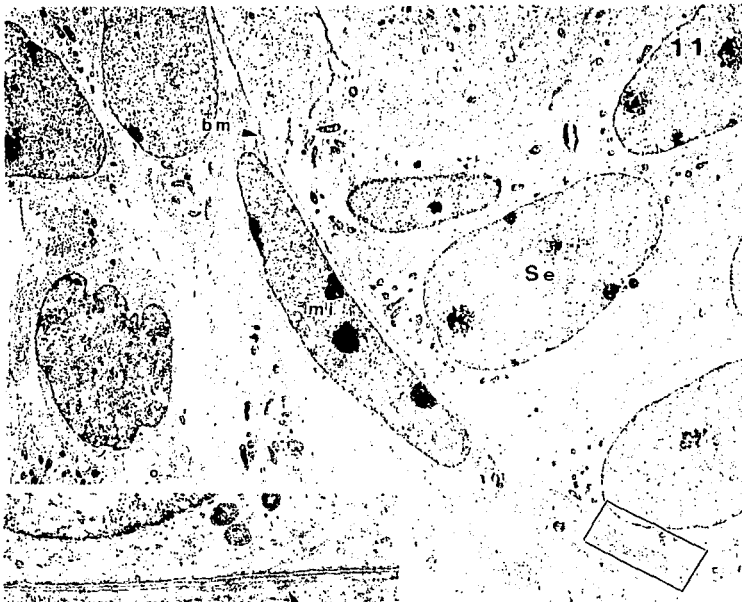


Fig. 11. Electron micrograph taken from a testis cultured 96 h with the adjacent mesonephros. The deposit of basement membrane (bm) between well-differentiated Sertoli cells (Se) and a peritubular myoid-like cell (mi) is shown. ($\times 7500$). The inset is a higher magnification of the area labeled by a rectangle in the lower left corner. It shows the deposit of microfilaments (mf) in the cytoplasm of the myoid-like cell. ($\times 25,000$).

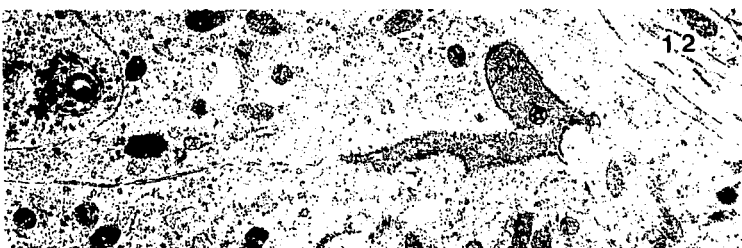


Fig. 12. Electron micrograph showing an irregular deposit of basement membrane material (star) between the cytoplasm of somatic cells. Isolated gonad cultured 96 h. ($\times 24,000$).

In the present study it was found that around 35% of cells in the isolated mesonephros were labeled with 3H-thymidine in culture. Only a few cells remained labeled (less than 5%) in the grafts after 4-6 days of culture, probably because either most labeled cells died or the label was diluted by cell proliferation. In any case, the fact that the majority of cells that remained labeled in the graft were endothelial indicates that their proliferation occurred in the mesonephric region and that after they penetrated into the gonad they divided less frequently than other labeled mesonephric cells. This interpretation is in line with the concept that the angiogenic process involves at least two major independent components: locomotion and proliferation of endothelial cells (Folkman and Klagsbrun, 1987). Thus, at the onset of testis differentiation, a

signal from the as yet morphologically undifferentiated male gonad might induce penetration of blood vessels, which in turn might guide other cells such as myoid precursors from the mesonephros into the gonad in order to shape the seminiferous cords. Two other lines of circumstantial evidence support our interpretation: i) At the onset of sex differentiation (12.5 dpc), a male gonad is first distinguished from a female by its higher vascularisation (Merchant-Larios and Taketo, 1991). ii) Endothelial and myoid cells were absent in cultures of isolated gonads which failed to form seminiferous cords (Buehr *et al.*, 1993; and present observations).

In the rat testis, it has been found that the basement membrane surrounding the seminiferous tubules is probably produced in concert by the Sertoli and peritubular myoid cells (Skinner *et al.*,

1985). Under culture conditions peritubular myoid cells produce both laminin and fibronectin, whereas Sertoli cells produce only laminin (Davis *et al.*, 1990). In the present study we found that although laminin was produced in isolated testis, formation of a basement membrane was impaired. Therefore, this failure might be due to the absence of peritubular myoid cells from the mesonephric region.

Our time course study has shown that Sertoli cells and Leydig cells differentiated *in vitro* almost at the same age as in the embryo. Moreover, the presence of the adjacent mesonephros did not have any influence on either the timing or differentiation of these two important cell lineages. In our study, in the urogenital complexes or isolated gonads at 11.5 dpc (stages 4-5; McLaren and Buehr, 1990), the first Sertoli cells detected by immunohistochemical staining for MIS appeared very soon, after 12 h in culture. This time course appears to be comparable to that of the male gonads *in vivo*. Intensity of the staining increased after 24 h both *in vivo* and *in vitro*, the only remarkable difference being that in isolated gonads, Sertoli cells were distributed as irregular clusters of different sizes and cord-like formations were rarely found.

Using *in situ* hybridization, Münsterberg and Lovell-Badge (1991) have shown that MIS transcripts are present in Sertoli cells of mouse fetal testis at 12.5 dpc. Taketo (1991) using immunocytochemical staining also has demonstrated that MIS is first detected at 12.5 dpc. Hence, it appears that translation of MIS closely follows transcription of its gene. Taking MIS expression as evidence of Sertoli cell differentiation, our present study demonstrates that seminiferous cord organization is not required for Sertoli cell differentiation.

Leydig cell differentiation in mouse fetal testis has been studied by several criteria: cytochemical (Hitzemann, 1962), ultrastructural (Russo and de Rosas, 1971) and morphological (Vergouwen *et al.*, 1991). In all these reports, Leydig cells appear in the stromal compartment after seminiferous cord formation. Moreover, although Taketo *et al.* (1991a) have reported that mouse fetal testis secrete significant amounts of testosterone at 12.5 dpc, a correlation between morphological and physiological differentiation of Leydig cells during ontogeny of mouse testes has not been made.

Although Leydig cells appear in the stromal compartment, our present observations suggest that their precursors did not enter the gonad from the mesonephric region after 11.5 dpc as other stromal cell precursors do. Thus, Leydig cell precursors are among the densely packaged cells of the gonadal anlage at 11.5 dpc, when *Sry* is still being expressed (Koopman *et al.*, 1990).

It has been established that «*Sry* acts specifically within cells of the developing indifferent gonads to cause their differentiation along the testicular pathway» (Lovell-Badge, 1992). PreSertoli cells

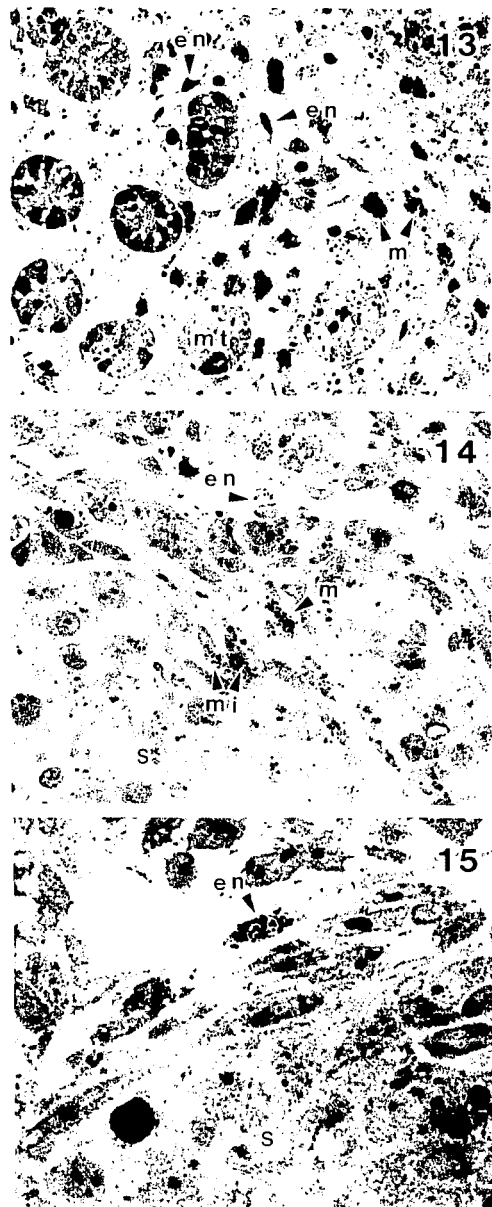


Fig. 13. Autoradiography of an isolated mesonephros cultured 6 h with ³H-thymidine. A high percentage of cells are labeled. Some endothelial cells in the mesonephric tubules (mt), mesenchymal cells (m) and endothelial cells (en) can be identified. (x200).

Fig. 14. This graft shows several labeled cells in the stromal tissue. Endothelial (en), mesenchymal (m) and peritubular myoid-like cells (mi) can be identified. Seminiferous cord (S). (x750).

Fig. 15. Autoradiography of a male gonad grafted to a ³H-thymidine labeled mesonephros and cultured 96 h. A labeled endothelial-like cell (en) appears as an elongated cell facing a cavity. (x900).

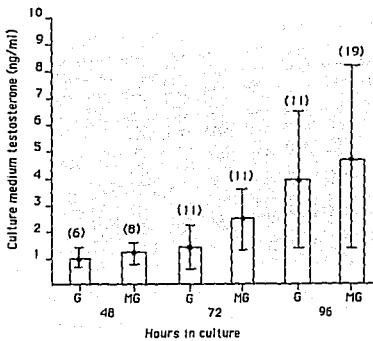


Fig. 16. T production from testicular explants at 11.5 dpc. G= isolated gonad. MG= gonad+mesonephros. Each column indicates the mean value+SD. The number in parenthesis indicates the number of explants examined. Statistical parameters: F. ratio= 2.86; d. f. = 5.64; P<0.05.

have been proposed as the gonadal cells in which Sry is expressed and regulates the production of factors (ligand or receptor) required for differentiation of Sertoli cells. According to the present results, expression of angiogenic factors in male undifferentiated gonads may be an important event in the cascade initiated by the Sry gene.

Materials and Methods

Animals

Two mouse strains, CD-1 and MF1 were used in this study. The latter strain was used only for the grafting experiments. Females were sacrificed at midday of the 11th day after the vaginal plug was found (the day of the vaginal plug was defined as day postconception, dpc) and so the embryos were considered to be at 11.5 dpc. The hind-limb bud was used as a criterion of developmental stage according to McLaren and Buehr (1990), and only embryos at stages 4 and 5 were used (stage 19 of Theiler, 1989). Since at 11.5 dpc mouse gonads were as yet morphologically undifferentiated, sex was determined by the presence or absence of the sex chromatin in amniotic cells, following the method of Burgoyne *et al.* (1983).

Organ culture

Each gonadal explant from male embryos was cultured with or without the adjacent mesonephros on a Nucleopore filter floating on 0.5 ml culture medium as described previously (Taketo and Koide, 1981). The basic culture medium was McCoy 5A modified (Microbal, México) containing 10% fetal calf serum (Sigma, USA), 200 U/ml penicillin G sodium, and 200 µg/ml streptomycin sulfate.

Cultures were maintained for intervals of 12, 24, 48, 72 and 96 h at 37°C in 0.5% CO₂/95% air. The number of explants used for the different determinations is shown in Table 1.

Light and electron microscopy

At the end of the culture the explants were fixed in Karnovsky's aldehyde solution (1965) without Ca⁺⁺ (pH 7.4), postfixed with 1% OsO₄ in Zetterqvist's buffer (1956), and embedded in Epon 812. Semithin (1 µm) and thin (60–90 nm) sections were stained with toluidine blue and uranyl acetate and lead citrate, respectively.

Histochemistry and immunocytochemistry

Cultured explants were embedded in O.C.T. medium (Tissue-Tek), frozen at -70°C (dry-ice/acetone), and serial sections of 7 µm thickness were cut

with a cryostat. After air-drying on microscope slides (covered with Vectabond, Vector, USA) overnight, sections were incubated at 37°C with dehydroepiandrosterone as a substrate (Levy *et al.*, 1959). After washing in PBS, the slides were mounted in glycerol and examined by light microscope. To verify the formation of seminiferous cords in the same sections, the coverslide was carefully removed and then processed for immunohistochemical detection of laminin, as follows: the sections were incubated for 30 min in 0.3% H₂O₂ in methanol and transferred to the reagents for immunocytochemistry according to the instructions of Vectastain ABC Kit (Vector, USA). The primary antibody against laminin was diluted 1:500 with bovine serum albumin in PBS.

For MIS detection, the explants were fixed in Zamboni's solution (Zamboni and DeMartino, 1967) and processed according to the method of Taketo *et al.* (1991b). Briefly, after fixation, tissues were washed and stored in 7% sucrose in PBS (0.1 M, pH 7.4) at 4°C overnight. The tissues were then incubated in increasing concentrations of polyethyleneglycol (PEG, mol wt, 400) at room temperature. After four changes in PEG (mol wt, 1000) at 47°C, the explants were embedded in PEG (mol wt, 1450). Five to eight sections (7 µm thick) from each sample were floated on distilled water and treated with 0.1% Triton X-100 in water for 5 min, and then transferred to the reagents for immunocytochemistry according to the instructions of Vectastain ABC Kit (Vectastain Lab, USA). As negative controls, sections were incubated in non-immune rabbit serum instead of primary antiserum.

Antibodies

Polyclonal anti-laminin antibody was purchased from Sigma (USA). Rabbit polyclonal antibody against MIS was prepared from human recombinant MIS, according to the method previously described (Ueno *et al.*, 1989).

Grafting experiments and autoradiography

The mesonephric region was cut away from the gonadal region with a fine needle, following the method described by Buehr *et al.* (1993).

Care was taken to cut sufficiently proximal to ensure that no gonadal tissue remained attached to the mesonephros. For labeling the mesonephric cells, isolated mesonephroi were placed in 2.5 µCi/ml of 5'-³H-thymidine (Amersham, UK) in culture medium for 4.6 h. After washing twice with culture medium containing 0.1 ng/ml of cold thymidine, the mesonephroi were grafted to unlabeled isolated gonads. The two organs were laid side by side and pressed gently into a narrow groove cut in the agar block on which the tissue rested. Any graft pair that had not fused after 24 h in culture was discarded. Grafts were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air for 4–6 days, and then fixed and embedded for high resolution microscopy as the cultured explants described above.

For autoradiography, semithin sections (1.5 µm) were placed on slides, and then covered with Ilford K5D liquid emulsion. After exposure for three weeks, they were developed with Kodak D-19 and stained after fixation (Kodak rapid fixative). Geimsa stain diluted 10% in PBS at 50°C for 20 sec was used to stain the sections through the photographic emulsion.

Radioimmunoassay for T

Testosterone secreted for each explant into culture medium was determined by radioimmunoassay using a kit from Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (USA). The limit of sensitivity of testosterone assay was 0.01 ng/ml. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance. Tukey test was used to compare individual mean differences.

Acknowledgments

We sincerely thank Dr. Patricia Donahue for providing us the antibody against MIS and Dr. Teruko Taketo for useful comments and review of the manuscript. Mr. Alejandro Mamolejo and José Guadalupe Baltazar for technical assistance. We also thank Mrs. Amida Baez for RIA of testosterone. This work was partially supported by a Grant from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Docente, DGAPA-UNAM.

References

- BUEHR, M., SUBIN, G.U. and McLAREN, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117: 273–281.

- BURGOYNE, P.S. (1988). Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 322: 63-72.
- BURGOYNE, P.S., EVANS, E.P. and HOLLAND, K. (1983). XO monosomy is associated with reduced birth weight and lowered weight gain in the mouse. *J. Reprod. Fertil.* 68: 381.
- DAVIS, M.C., PAPADOPOULOS, V., SOMMERS, H.K. and DYM, M. (1990). Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 43: 860-869.
- ESCALANTE-ALCALDE, D. and MERCHANT-LARIOS, H. (1992). Somatic and germ cell interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. *Exp. Cell. Res.* 198: 150-158.
- FOLKMAN, J. and KLAGSBRUN, M. (1987). Angiogenic Factors. *Science* 235: 442-447.
- HARLEY, V.R., JACKSON, D., HEXTALL, P., HAWKINS, J.R., BERKOVITZ, G.D., SOCKANATHAN, S., LOVELL-BADGE, R. and GOODFELLOW, P.N. (1992). DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255: 453-456.
- HITZEMAN, S.J.W. (1962). Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. *Anat. Rec.* 143: 351-362.
- JOST, A. and MAGRE, S. (1988). Control mechanisms of testicular differentiation. *Philos. 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: 137 A.
- KOOPMAN, P., GUBBAY, J., VIVIAN, N., GOODFELLOW, P. and LOVELL-BADGE, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
- 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.
- LEVY, H., DEANE, H.W. and RUBIN, B.L. (1959). Visualization of Steroid 3 α -Dehydrogenase activity in tissue of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 65: 932-943.
- LOVELL-BADGE, R. (1992). Testis determination: soft talk and kinky sex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2: 596-601.
- MAGRE, S. and JOST, A. (1984). Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7831-7834.
- MAGRE, S., AGELOPOULOU, R. and JOST, A. (1981). Action du sérum de fœtus de Veau sur la différenciation *in vitro* ou le maintien des cordons séminifères du testicule du fœtus de Rat. *C. R. Acad. Sci. Paris* 292: 85-89.
- McLAREN, A. and BUEHR, M. (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ. Dev.* 31: 185-195.
- MERCHANT-LARIOS, H. and TAKETO, T. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J. Electron Microsc. Tech.* 19: 158-171.
- MÜNSTERBERG, A. and LOVELL-BADGE, R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.
- PATSAVOUDI, E., MAGRE, S., CASTANIER, M., SCHOLLER, R. and JOST, A. (1985). Dissociation between testicular morphogenesis and functional differentiation of Leydig cells. *J. Endocrinol.* 105: 235-238.
- RUSSO, J. and DE ROSAS, J.C. (1971). Differentiation of Leydig cell of the mouse testis during the fetal period. An ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 130: 461-480.
- SKINNER, M.K., TUHG, P.S. and FRITZ, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production of extracellular components. *J. Cell Biol.* 100: 1941-1947.
- TAKETO, T. and KOIDE, S.S. (1981). *In vitro* development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Dev. Biol.* 84: 61-66.
- TAKETO, T. (1991). Production of Müllerian Inhibiting Substance (MIS) and Sulfated Glycoprotein-2 (SGP 2) associated with testicular differentiation in the XX mouse gonadal graft. *Ann. NY Acad. Sci.* 637: 74-88.
- TAKETO, T., SAEED, J., ROBERGE, S., MATSUO, N. and KOIDE, S.S. (1991a). Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad *in vitro*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38(4): 523-531.
- TAKETO, T., THAU, B.R., ADEYEMO, O. and KOIDE, S.S. (1984). Influence of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate analogues on testicular organization of fetal mouse gonads *in vitro*. *Biol. Reprod.* 30: 189-198.
- TAKETO, T., SAEED, J., NISHIOKA, Y. and DONAHOE, P.K. (1991b). Delay of testicular differentiation in the B6.Y DOM oolestis demonstrated by immunocytochemical staining for Müllerian Inhibiting Substance. *Dev. Biol.* 146: 386-395.
- THEILER, K. (Ed). (1989). *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. Springer-Verlag, New York.
- UENO, S., TAKAHASHI, M., MANGANARO, T.F., RAGIN, R.C. and DONAHOE, K.P. (1989). Cellular localization of Müllerian Inhibiting Substance in the developing rat ovary. *Endocrinology* 124(2): 1000-1006.
- VERGOUWEN, R.P.F., JACOBS, S.G.P.M., HUISKAMP, R., DAVIDS, J.A.G. and de ROOIJ, D.G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fertil.* 93: 233-243.
- WARTENBERG, H., KINSKY, I., VIEBAHN, C. and SCHMOLKE, C. (1991). Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J. Electron Microsc. Tech.* 19: 133-157.
- ZAMBONI, L. and DEMARTINO, C. (1967). Buffered picric acid-formaldehyde: A new rapid fixative for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 35: 148A.
- ZETTERQVIST, H. (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph.D. Thesis, Karolinska Institute, Stockholm.

Limb Bud Mesenchyme Permits Seminiferous Cord Formation in the Mouse Fetal Testis but Subsequent Testosterone Output Is Markedly Affected by the Sex of the Donor Stromal Tissue

NORMA MORENO-MENDOZA,* JOAQUIN HERRERA-MUÑOZ,† AND HORACIO MERCHANT-LARIOS*¹

**Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70228, México, D. F., México 04510; and*
 †*Laboratorio de Andrología, Hospital Luis Castelazo Ayala IMSS, México, D. F.*

Accepted December 23, 1994

Mesonephric stromal cells have previously been shown to migrate into the genital ridge and to be necessary for seminiferous cord formation in organ culture. Here, we asked whether there is a specific requirement for mesonephric stromal cells or whether another source of mesonephric stromal cells can be substituted. Hindlimb buds were immersed in a vital stain and then grafted to male gonad primordia and cultured for 96 hr. Immunocytochemical staining of laminin was used to identify seminiferous cord formation. For Sertoli and Leydig cell differentiation, Müllerian inhibiting substance and $\Delta 5-3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase were used, respectively. Testosterone secreted into the culture medium was assessed by radioimmunoanalysis. It was found that hindlimb stromal cells, like mesonephric stromal cells, migrate into the genital ridge and allow seminiferous cord formation. These results indicate that mesonephric stromal cells are not specifically required for seminiferous cord formation in the mouse fetal gonad. Furthermore, although Sertoli and Leydig cells differentiate in the gonads grafted to hindlimbs from either male or female embryos, testosterone production was considerably higher with hindlimbs from males. A similar stromal sex effect on subsequent testosterone output was also seen with mesonephric stromal cells. © 1995 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

In eutherian mammals, the process of sex differentiation is a model for a genetic switch between alternative programs during development. The master gene that initiates the morphogenetic events leading to testicular differentiation in the mouse has been identified as *Sry* (Koopman *et al.*, 1990, 1991). At the histological level, seminiferous cord formation and Sertoli and Leydig cell differentiation are the most evident consequences of *Sry* expression in normal XY gonads. Although this gene appears to be expressed in the morphologically undifferentiated gonad, the molecular mechanisms underlying

the histological differentiation of the male gonad remain unclear. Germ cells are not required for primary sex determination (Merchant, 1975; reviewed by McLaren, 1985), implying a role of the gonadal somatic cells in histological testis differentiation.

Recently, it was found that in the isolated gonad primordia in organ culture, Sertoli and Leydig cells differentiate, but they fail to form seminiferous cords (Merchant-Larios *et al.*, 1993). However, when the gonad primordia were cultured with the adjacent mesonephros, seminiferous cords were formed (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993). Moreover, it was observed that stromal cells from the adjacent mesonephros penetrate the genital ridge, suggesting that a signal from the gonadal cells may induce the migration of mesonephric cells into the gonad. This putative signal may be a step subsequent to *Sry* expression. These results suggest that seminiferous cord formation requires interaction between epithelial and stromal cells and that the latter originate from the mesonephros. In the present study we ask whether stromal cells from the limb bud are also able to respond to the putative signal and to participate in testis cord formation.

MATERIALS AND METHODS

Animals. CD1 strain of mice from Charles River (Wilmington, MA) was used in this study. Urogenital complexes and hindlimb buds were dissected from embryos at 11.5 days postcoitum (dpc). The day of vaginal plug was taken to be 0.5 dpc, and the hindlimb bud at stages 4 and 5 was assessed as a further criterion of developmental stage according to McLaren and Buehr (1990). Sex was determined by detection of sex chromatin in amnion cells (Palmer and Burgoyne, 1991a).

Organ culture. Morphologically undifferentiated gonads were separated from the mesonephros with a fine needle, following the technique described by Buehr *et al.* (1993). The tissues were dissected under a stereomicroscope in medium L15 (Gifco) and processed as described

¹ To whom correspondence should be addressed.

below. When individual gonads and hindlimb buds or mesonephroi were to be grafted together, they were laid side by side and pressed to each other gently on the surface of a Nucleopore filter (Costar, Co.) floating on 0.5 ml of McCoy 5a modified culture medium (Micolab, Mexico), containing 10% fetal calf serum (FCS) (Sigma, St. Louis, MO), 200 $\mu\text{m}/\text{ml}$ penicillin G sodium, and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin sulfate. Cultures were maintained for intervals of 24, 48, 72, and 96 hr at 37°C in 5% $\text{CO}_2/95\%$ air. The total cultures under different conditions were: male hindlimb + gonad, 66; female hindlimb + gonad, 54; male mesonephros + gonad, 24; female mesonephros + gonad, 24; and isolated gonad, 26.

Cell labeling. To demonstrate the migration of cells from the hindlimb bud into the gonad, the former was split along the proximodistal axis and incubated for 15 min in PKH26 red using the fluorescent Sigma staining kit for general labeling. Thereafter, the tissues were washed once in FCS, then in McCoy medium plus 10% FCS, grafted to unlabeled gonads, and cultured as explained above. After 18–48 hr in culture, the grafts were embedded in Tissue Tek and frozen, and 10- μm sections were observed in a fluorescence microscope using a G-2A filter from Nikon.

Electron microscopy, histochemistry, and immunohistochemistry. After culture, organs were processed for microscopic examination according to the techniques described previously (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Briefly, for electron microscopy, samples were fixed in Karnovsky solution (1965) without Ca^{2+} , postfixed in 1% OsO_4 in Zetterqvist's buffer (1956), and embedded in Epon. For histochemical detection of $\Delta 5\text{-}\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ($\Delta 5\text{-}\beta$ -HSDH) activity and immunohistochemical staining of laminin, the samples were embedded in Tissue Tek and frozen at -70°C , and sections of 7 μm were air-dried on microscope slides. After incubation in a reaction mixture (Levy *et al.*, 1959) for $\Delta 5\text{-}\beta$ -HSDH histochemical detection, laminin was immunocytochemically detected with a primary antibody (Sigma) diluted 1:500 in PBS. The Vectastain ABC kit (Vector) was used for color development according to the instructions of the manufacturer.

For Müllerian inhibiting substance (MIS) detection, the explants were fixed in Zamboni's solution (Zamboni and DeMartino, 1967) and embedded in polyethylene glycol following the technique described by Taketo *et al.* (1991). Rabbit polyclonal antibody against MIS prepared from human recombinant MIS (Ueno *et al.*, 1989) was a gift from Dr. P. Donahoe.

Radioimmunoassay (RIA) for testosterone (T_2). Isolated male gonads, male gonads grafted to male or female mesonephros, and male gonads grafted to male or female hindlimbs were cultured for 96 hr to compare testosterone production. Ten cultures from each experimental condition were assessed. Testosterone secreted

from each explant into culture medium was determined by radioimmunoassay using a specific RIA (Herrera *et al.*, 1983). Briefly, 1000 cpm $\text{H}_3\text{-T}_2$ (tracer) was added to each sample and extracted with 2 \times 5 ml of diethyl ether. The organic phase was separated and evaporated until dry and the extract was applied to silica gel chromatoplates and separated with the solvent benzene, benzene-ethyl acetate, and benzene-methanol. The purified extract was analyzed using a highly specific antibody. The percentage of bound radioactivity was interpolated in a standard curve and tracer recovery was corrected for each sample. Intra-assay coefficient of variation was less than 10% for all samples. Student's *t* test was used for statistical analysis.

RESULTS

Isolated gonads grafted to hindlimb buds appeared to be fused together after 24 hr of culture. Although care was taken to place the two primordia in contact on the cut open surface, in some explants, however, the contact was established between their surface epithelia. In these cases (around 10%) the fusion was considerably delayed or did not occur at all. Two morphological criteria were used to consider that genital ridge and hindlimb were fused: a common surface epithelium surrounding the two primordia and continuity between the mesenchyme of the two organs. When pieces of hindlimb buds to be grafted were labeled with PKH26, several layers of cells on the surface appeared evenly stained (data not shown). After 24 hr of culture labeled cells either in clusters or scattered had moved further into deeper locations (Fig. 1). On the surface where the gonad was grafted, migration of labeled hindlimb cells into the gonad was clearly detected (Figs. 1 and 2).

Laminin staining revealed the basement membrane of blood vessels distributed among the hindlimb cells (Fig. 3). In the grafted gonads, the basement membrane surrounding the seminiferous cords was clearly seen at 24 hr of culture and thereafter (Figs. 3 and 4). Immunohistochemical detection of MIS was positive only in clusters of cells in the grafted gonads, corresponding to Sertoli cells located within seminiferous cords (Fig. 5).

After 96 hr in organ culture, the histochemical activity of $\beta 3\text{-HSDH}$ was detected in clusters of cells in the grafted gonads (Fig. 6). In serial sections of the same grafted gonads, it was evident that positive cells were among stromal tissue, located between the seminiferous cords (Figs. 6 and 7). In plastic-embedded sections, well-differentiated Sertoli cells and a few germ cells formed the seminiferous cords. Differentiated chondrocytes embedded in a metachromic matrix were present within the hindlimb tissue (Fig. 8). Although in gonads grafted to female hindlimbs seminiferous cord formation was somewhat delayed, they were well organized at 96 hr of

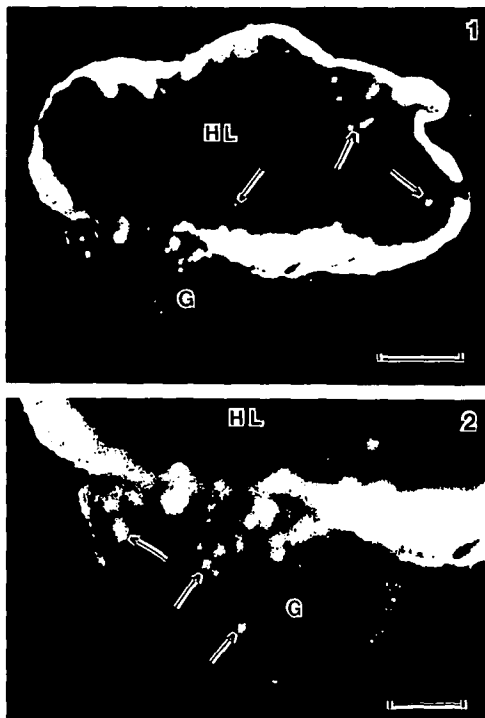


FIG. 1. A labeled hindlimb bud (HL) grafted to an unlabeled gonad (G) after 24 hr of culture. Although the former remains intensely stained on the periphery, several fluorescent cells either in clusters or scattered have moved into deeper locations (arrows). Bar, 100 μ m.

FIG. 2. Higher magnification of the same tissue section shown in Fig. 1. Several labeled cells have moved from the hindlimb bud (HL) into the gonadal region (G). Bar, 50 μ m.

culture (Fig. 9). It is worth noting that in these few grafts where the hindlimb bud and the genital ridge maintained their own surface epithelium, they did not fuse: Sertoli and Leydig cells differentiated but seminiferous cords were not formed (data not shown).

Secretion of testosterone into the culture medium from different cultures is summarized in Fig. 10. There was a higher amount of testosterone secreted into the culture medium when the gonadal primordium was grafted to either mesonephroi or hindlimb buds from male embryos than those fused to mesonephroi or hindlimb buds from females. Although the grafts with female hindlimbs secreted an amount of testosterone comparable to that produced by isolated gonads, grafts with female mesonephroi secreted less than half that in isolated gonads.

DISCUSSION

Organ culture studies have established that from Day 11.5 pc, the control of testicular differentiation is an inherent property of the urogenital ridge (McLaren and Buehr, 1990). When isolated genital ridges are cultured without the adjacent mesonephros, Sertoli and Leydig cells differentiate but seminiferous cords are not formed (Merchant-Larios *et al.*, 1993). It was concluded that the stromal cells which migrate from the mesonephric region into the genital ridge are necessary for morphogenesis of seminiferous cords (Buehr *et al.*, 1993). Since migration of mesonephric cells may be tissue specific, that is, a diffusible seminiferous-organizing molecule locally produced by the genital ridge acts on receptors present only in mesonephric cells, we asked if stromal cells from other organs, such as the hindlimb bud, were also able to support seminiferous cord formation.

Here, we found that, like mesonephric cells, stromal cells from the hindlimb bud also migrate into the genital

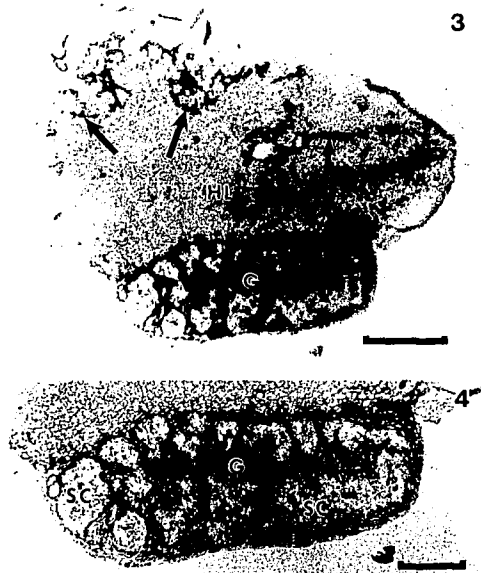


FIG. 3. Immunohistochemical staining of laminin in a section from a hindlimb-gonad graft. In the hindlimb region (HL) blood vessels (arrows) appear stained in a clear stromal background whereas in the gonadal region (G), laminin is detected in the stromal tissue. Bar, 100 μ m.

FIG. 4. Seminiferous cords (SC) are delineated by a basement membrane stained for laminin. Magnification of the gonad (G) shown in Fig. 3. Bar, 50 μ m.

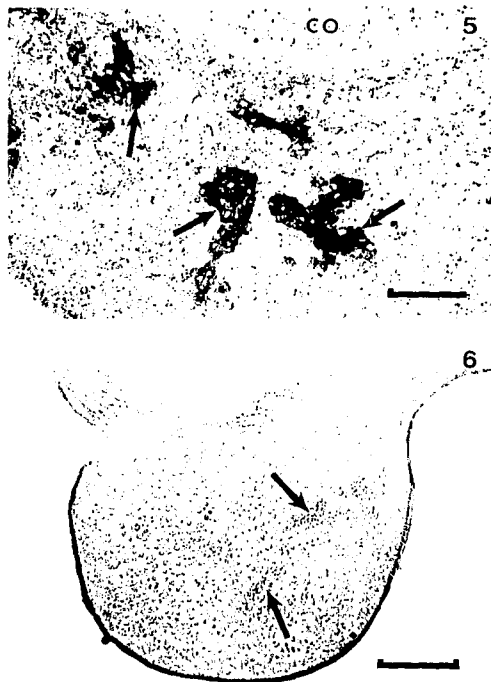


FIG. 5. Immunohistochemical staining of MIS showing seminiferous cords (arrows) near differentiating chondrocytes (CO) in a graft after 96 hr in culture. Bar, 50 μ m.

FIG. 6. Cytochemical detection of $\Delta 5$ - β -HSDH (arrows) in a gonad grafted to a hindlimb bud. Spatial distribution of formazan deposits corresponds to Leydig cells located between seminiferous cords. Bar, 50 μ m.

ridge, and seminiferous cords are formed as well. It is conceivable that stromal cells from both embryonic primordial tissues are able to respond to the same putative signal produced by the genital ridge at 11.5 dpc. Moreover, it was observed that differentiation of Sertoli and Leydig cells in the hindlimb bud-gonad grafts proceeds normally and is not affected by "foreign" factors involved in the processes of morphogenesis of the hindlimb (Dolle *et al.*, 1990).

Our present results differ from the previous report in which fragments of limb bud or heart grafted to male genital ridges did not succeed in supporting seminiferous cord formation (Buehr *et al.*, 1993). An explanation may be found in the different culture medium and substrate used or, more importantly, the length of culture. Buehr *et al.* (1993) observed the grafted tissues after cul-

ture for 7 days. Under our culture conditions, we found in both mesonephros-gonad (Merchant-Larios *et al.*, 1993) and hindlimb-gonad grafts (present results), seminiferous cords start to form at 24 hr. In the hindlimb-gonad grafts, however, although they remain well organized up to 96 hr, 3 days later, the genital ridge was incorporated into the hindlimb and the seminiferous cords outgrown by cells of the hindlimb tend to desintegrate (data not shown). This may explain why Buehr *et al.* (1993) failed to detect testis cords in the limb bud-gonad graft after 7 days of culture.

Whether the interaction between the stromal cells and the supporting cells of the gonad involves cell-cell contact or a diffusible factor(s) is not yet known. However, two lines of evidence support the former possibility. When a permeable filter was placed between the

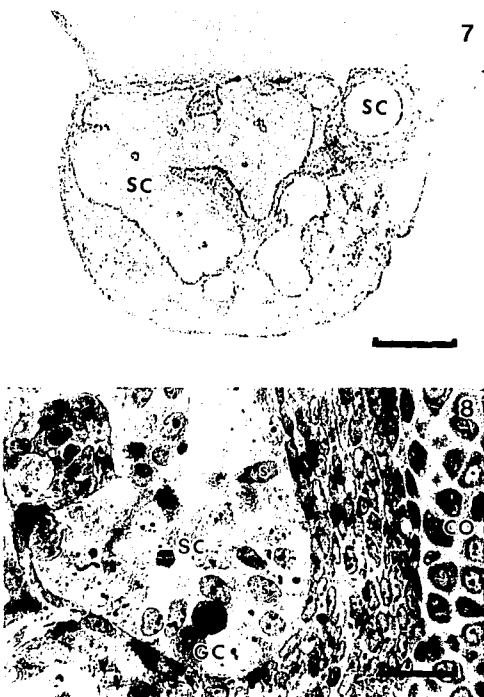


FIG. 7. Immunohistochemical detection of laminin in a serial section of the sample shown in Fig. 6. Seminiferous cords (SC) are evident. Bar, 50 μ m.

FIG. 8. Semithin section of a male gonad grafted to a male hindlimb. Part of a seminiferous cord (SC) formed by Sertoli (s) and germ cells (GC) is shown. Mesenchymal cells surrounding the seminiferous cord and chondrocytes (CO) are evident to the right. Bar, 15 μ m.

mesonephroi, on the other hand, secrete similar or lower amounts of testosterone than isolated gonads, respectively. These unexpected observations suggest that the difference in testosterone production between grafts of different sexes may be due to the presence in the Y chromosome of genes required for correct Leydig cell function (Jutley and Stewart, 1985; Patek *et al.*, 1991).

In the present study, it has been found that migration of stromal cells into the genital ridge occurs regardless of the sex of the graft; however, a direct demonstration that some of the entering cells become Leydig cells still has to be made. Therefore, it remains to be seen whether XX cells are able to differentiate into Leydig cells and, if they can, are they less efficient for testosterone production? A study using a transgenic strain carrying β -galactosidase as a ubiquitously expressed marker is in progress in our laboratory.

Finally, the inhibitory effect on testosterone production shown by the female mesonephroi suggests that female mesonephros may play a role in regulation of steroidogenesis in the ovary at the onset of gonadal sex differentiation.

We are grateful to Dr. Patricia Donahue for the antibody against MIS and to Dr. Teruko Taketo for her helpful comments on the manuscript. Special mention should be given to one reviewer who made a good appraisal of the present results and greatly contributed to the improvement of the quality of the manuscript. We thank other members of our group, in particular Alejandro Marmolejo and José G. Baltazar, whose work has contributed to this effort. This investigation was partially supported by Project Grant IN209694 from DGAPA-UNAM.

REFERENCES

- Behringer, R. R., Finegold, J. M., and Cate, L. R. (1994). Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415-425.
- Buehr, M., Subin, G., and McLaren, A. (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117, 273-281.
- Burgoyne, P. S. (1988). Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 322, 63-72.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245-250.
- Dolle, P., Ruberte, E., Leroy, P., Morris-Kay, G., and Chambon, P. (1990). Retinoic acid receptors and cellular binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development* 110, 1133-1151.
- Herrera, J., Sosa, M., Ayala, F., Galina, C., Hernández-Jauregui, and Bermudez, J. A. (1983). Morphophysiological correlation of boar Leydig cell development during postnatal stage. *Cornell Vet.* 73, 67-75.
- Jutley, J. K., and Stewart, A. D. (1985). Genetic analysis of the Y-chromosome of the mouse: Evidence for two loci affecting androgen metabolism. *Genet. Res.* 47, 29-34.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137.
- 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, 459-462.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351, 117-121.
- Levy, H., Deane, H. W., and Rubin, B. L. (1959). Visualization of steroid 3- α -dehydrogenase activity in tissue of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 65, 932-943.
- McLaren, A. (1985). Relation of germ cell sex to gonadal differentiation. In "The Origin and Evolution of Sex" (H. O. Halvorson and A. Monroy Eds.), pp. 289-300, A. R. Liss, New York.
- McLaren, A. (1991). Development of the mammalian gonad: The fate of the supporting cell lineage. *BioEssays* 13, 151-156.
- McLaren, A., and Buehr, M. (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ. Dev.* 31, 185-195.
- Merchant, H. (1975). Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev. Biol.* 44, 1-21.
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., and Buehr, M. (1983). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* 37, 407-415.
- Merchant-Larios, H., and Taketo, T. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J. Electron Microsc. Tech.* 19, 158-171.
- Münsterberg, A., and Love-Badge, R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113, 613-624.
- Nilsen-Hamilton, M. (Ed.) (1990). "Growth Factors and Development." Academic Press, New York.
- Palmer, S. J., and Burgoyne, P. S. (1991a). *In situ* analysis of fetal, prepubertal and adult XX-XY chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112, 265-268.
- Palmer, S. J., and Burgoyne, P. S. (1991b). The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: A basis for XY sex-reversal in C57BL/6-Ypus mice. *Development* 113, 709-714.
- Patek, C. E., Kerr, J. B., Gosden, R. G., Jones, K. W., Hardy, K., Muggleton-Harris, A. L., Handyside, A. H., Whittingham, D. G., and Hooper, M. L. (1991). Sex chimerism, fertility and sex determination in the mouse. *Development* 113, 311-325.
- Taketo, T., Suedel, J., Nishioka, Y., and Donahoe, P. K. (1991). Delay of testicular differentiation in the B6.Y¹⁰⁹⁸ ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for Müllerian inhibiting substance. *Dev. Biol.* 146, 386-395.
- Ueno, S., Takahashi, M., Manganaro, T. F., Ruzin, C. R., and Donahoe, K. P. (1989). Cellular localization of Müllerian inhibiting substance in the developing rat ovary. *Endocrinology* 124(2), 1000-1006.
- Zamboni, I., and DeMartino, C. (1967). Buffered pieric acid-formaldehyde: A new rapid fixative for electron microscopy. *J. Cell Biol.* 35, 148.
- Zetterqvist, H. (1956). "The Ultrastructural Organization of the Columnar Absorbing Cells of the Mouse Jejunum." Ph.D. Thesis, Karolinska Institute, Stockholm.



FIG. 9. Part of a male gonad grafted to the hindlimb taken from a female embryo. Abundant stroma (st) surrounds the seminiferous cords (SC) formed by Sertoli (s) and germ (GC) cells. Bar, 25 μ m.

mesonephros and the gonad, formation of seminiferous cords was prevented (Buehr *et al.*, 1993). In the present study, when both the hindlimb bud and the genital ridge kept their own surface epithelia and did not share stromal cells, no seminiferous cords were formed even if the two primordia were in contact (data not shown).

At the onset of sex differentiation, male gonads show higher vascularization and more abundant stromal tissue than female gonads *in vivo* (review Merchant-Larios and Taketo, 1991). This observation makes it reasonable to postulate a diffusible factor from the male genital ridge involved in the migration and proliferation of blood vessels and mesenchymal cells. Since *Sry* sequence analysis suggests that it encodes a DNA-binding protein and therefore acts cell autonomously (Gubbay *et al.*, 1990), the production of a diffusible factor required for mesenchymal migration and proliferation may be a step subsequent to *Sry* expression.

The onset of seminiferous cord formation closely follows MIS expression in Sertoli cells (Münsterberg and Lovell-Badge, 1991; Taketo *et al.*, 1991), suggesting that this molecule might be involved in this morphogenetic process. Recently, however, it was found that male mice deleted for MIS (by gene targeting) have unperturbed testis development (Behringer *et al.*, 1994). Other factors required for migration and/or proliferation of stromal cells may be controlled directly by *Sry*. Several ubiquitous growth factors may be involved in the observed migration of blood vessels and mesenchymal cells into the male gonad (Nilsen-Hamilton, 1990). Since in the female gonad the amount of stromal tissue increases until the

perinatal stage, it is possible that sex differences depend upon an expression timing of the same factor(s). A time course study of expression of various growth factors comparing male and female gonads during the perinatal period may clarify these possibilities.

It is interesting to know whether the cell type that produces the putative diffusible factor is the same as the somatic cells that express *Sry*. Electron microscope studies have shown that at 11.5 dpc the genital ridge contains, in addition to germ cells, epithelial-like cells, endothelial cells, and some mesenchymal cells, all tightly arranged. Since in cultures of isolated genital ridges Sertoli and Leydig cells differentiated, it was suggested that their cell precursors must be already present at 11.5 dpc and that the *Sry* gene may be expressed in both or either of them (Merchant-Larios *et al.*, 1993). Burgoyne (1988) has proposed that the Y-chromosomal testis determinant (now *Sry* gene) is expressed only in the Sertoli cell precursors of the embryonic gonad and that the commitment of all other gonadal cell types to testicular differentiation is directed by the Sertoli cells. This proposal is supported by a subsequent analysis of the sex chromosomal complement of the cell types XX-XY chimeric testis, which showed that only the Sertoli cell lineage has a bias in favor of XY cells (Palmer and Burgoyne, 1991b). If Burgoyne's theory is correct, determination of Leydig cells by Sertoli cells must occur between 10.5 and 11.5 dpc, when all the cells in the isolated genital ridge appear tightly arranged.

Here, we have found that the amount of testosterone produced differs depending upon the sex and the type of the grafted tissue. Testosterone production is significantly enhanced with male grafts from either mesonephroi or hindlimbs. Grafts from female hindlimbs or

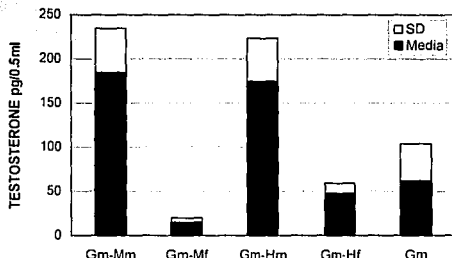


FIG. 10. Testosterone determination in 0.5 ml of culture medium from: male gonads grafted to male mesonephros (Gm-Mm), male gonads grafted to female mesonephros (Gm-Mf), male gonads grafted to male hindlimbs (Gm-Hm), male gonads grafted to female hindlimbs (Gm-Hf), and isolated male gonads (Gm). Mean values of 10 cultures under each experimental condition are shown by the black bars. SD, standard deviation. Statistical parameters: F ratio = 34.07; df = 2; p < 0.001.

4 METODOS Y RESULTADOS ADICIONALES

4.1 Disgregados-reagregados

Basados en los resultados obtenidos anteriormente al investigar los mecanismos celulares que controlan la morfogénesis del testículo, a partir de la expresión del gene *Sry*, se estableció que el mesonefros adyacente es necesario para la formación de los cordones seminíferos (Buehr, et al 1993) y la diferenciación de las células de Sertoli y de Leydig se lleva a cabo en gónadas aisladas (Merchant-Larios, et al. 1993). En otra serie de experimentos utilizamos la técnica de disgregación-regregación para establecer la capacidad histogénica de las células somáticas y germinales en presencia y ausencia del mesonefros adyacente en etapas anteriores de la diferenciación gonadal (11 *dpc*).

4.2 Metodos

Se sacrificaron hembras gestantes de la cepa CD-1 con 11.5 *dpc* (etapa indiferenciada) por dislocación cervical, se colocaron en un campo estéril y se les aplicó en el abdomen una solución antiséptica de benzal-cohool al 70% en una proporción de 1:1. Los productos se aislaron con el útero y se colocaron en una caja de Petri. Los fetos se aislaron del útero en una campana de flujo laminar, se dejó expuesto el conjunto placenta-feto y se colocaron en medio de Leibovitz's L-15 suplementado con 200 U/ml de penicilina y 200 g/ml de estreptomycin, ajustado a un pH de 7.4 y esterilizado por filtración, en un sistema Millipore (0.45 μ M).

La edad de los embriones se determinó de acuerdo a la etapa de desarrollo del esbozo de la extremidad anterior, propuesta por McLaren y Buehr (1990) y sólo se emplearon los embriones en etapas 4 y 5 correspondientes a 11 y 11.5 *dpc* respectivamente. El sexo de los embriones se estableció por presencia o ausencia de cromatina sexual en células amnióticas de acuerdo a la técnica de Palmer y Burgoyne (1991). Brevemente, se aislaron los amnios y se colocaron en una solución de ácido acético-metanol 1:1 (fijador), se centrifugaron a 1,000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante. Los tubos se invirtieron sobre una toalla de papel y se colocó el amnios a unos 2 cm de la base del tubo. Se aplicó una gota de ácido acético glacial al 60% en agua, directamente sobre el amnios, y

con ayuda de una pipeta Pasteur sellada por calor, se disociaron las células. Se bloqueó al ácido acético agregando aproximadamente 1 ml de fijador, y se centrifugó a 1,000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, y se dejaron aproximadamente 0.5 ml de medio para resuspender el botón de núcleos, los cuales se colocaron sobre un portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina al 1% en agua.

Los embriones ya sexados, se colocaron en una plancha de hule donde se les realizó un corte diagonal que abarcó la región media caudal del embrión y dejó expuesto el sistema urogenital. Ambas regiones urogenitales se disectaron y se dejaron con el mesonefros o se aisló la región de la gónada con ayuda de agujas de insulina. Los órganos se disgregaron de acuerdo a la técnica de Escalante y Merchant-Larios (1992). Tres complejos urogenitales o seis crestas genitales aisladas se colocaron en tripsina al 0.25% en solución de Rinaldini durante 10 minutos a 37°C. La enzima se inactivó con 10 % de suero bovino fetal en medio de cultivo McCoy 5a modificado. Las células gonadales se centrifugaron por 3 minutos a 1,500 rpm y se resuspendieron en medio de cultivo McCoy. Las células disociadas se centrifugaron por 7 minutos en un tubo Eppendorf de 400 ul. El botón celular se obtuvo cortando el extremo posterior del tubo y se colocó en cultivo de órganos sobre un filtro de policarbonatos flotando sobre 0.5 ml de medio de cultivo con los siguientes componentes: Medio 5a modificado, 10% de suero bovino fetal, 200 U/ml de penicilina y 200 ug/ml de estreptomycin. Los cultivos se mantuvieron por 96 h a 37°C con atmósfera húmeda y 5% de bióxido de carbono.

Para establecer el papel de las células del mesonefros en la diferenciación testicular, utilizamos los mismos criterios empleados en nuestro estudio de cultivo de órganos de gónadas aisladas y con mesonefros (Merchant-Larios *et al*, 1993), a saber:

1) Para la organización de los cordones seminíferos, los órganos se incluyeron en Epón para su análisis a nivel de microscopía de luz, o se evidenciaron por inmunohistoquímica de laminina.

2) Para determinar la diferenciación de las células de Sertoli, los órganos se incluyeron en Polietilenglicol (PEG) para la detección de la hormona antimülleriana (MIS).

3) Para la detectar las células de Leydig, los órganos se congelaron para la detección de la delta-5-3beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa, y testosterona se detectó en el medio de cultivo por Radioinmunoanálisis.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Disgregación celular

Los botones celulares procesados después de su disgregación y antes del cultivo en forma organotípica, mostraron que todas las células se encuentran separadas y distribuidas de una manera aleatoria. Se observaron los principales componentes celulares que constituyen al órgano en esta etapa del desarrollo de la gónada como las células germinales y las células somáticas (fig. 1).

A nivel del microscopio electrónico se observó que la superficie celular de las células somáticas presenta gran actividad, debido a la formación de múltiples prolongaciones citoplasmáticas de tipo filopodio, es decir, filamentosas. También se observaron pseudopodos gruesos de tipo lobopodio (fig. 2).

4.3.2 Disgregación-reagregación

4.3.2.1 Gónadas con mesonefros

Al realizar el análisis histológico de los reagregados, se observó que después de 96 h de cultivo en forma organotípica, se reconstituyeron las características principales que identifican a cada órgano en condiciones de desarrollo normal. De aquí se desprende que durante este tiempo de cultivo se lleva cabo un desplazamiento celular en el interior de los botones, que parecen recapitular la morfogénesis del tejido gonadal.

Se puede observar que se lleva a cabo la segregación del compartimento epitelial del compartimento estromático. Las células epiteliales de la región del mesonefros se reagregan formando los túbulos mesonefricos (fig.3). Las células germinales y de Sertoli se encuentran segregadas formando los cordones seminíferos, los cuales están rodeados por células mioideas y vasos sanguíneos (fig. 4).

Tanto la diferenciación de células de Sertoli como de Leydig se lleva a cabo en los reagregados. Las células de Sertoli se encuentran organizadas dentro de los cordones seminíferos (fig.5). Las células de Leydig se detectaron en el compartimento estromático rodeando a los cordones seminíferos evidenciados por

la detección de laminina (fig. 6), tal como se lleva cabo en la diferenciación testicular *in vivo*.

4.3.2.2 Gónadas Aisladas

En los reagregados de seis gónadas aisladas, después de 96 h de cultivo parece ser que las células se encuentran compactadas, semejante a lo que ocurre en cultivos de gónadas aisladas individualmente donde no hay formación de cordones seminíferos (fig. 7). Sin embargo, al emplear mayor resolución se puede detectar que las células germinales y de Sertoli se encuentran agrupadas dentro de cordones de tipo seminífero. Las células del estroma, a diferencia de los reagregados con mesonefros, mantienen un arreglo compacto (fig. 8).

La tinción inmunohistoquímica de MIS revela que la organización de los cordones seminíferos se lleva cabo, ya que las células de Sertoli se detectan bien organizadas dentro de estos. Sin embargo, la detección de MIS es más débil que en los reagregados de gónadas con mesonefros (fig. 9).

La detección inmunohistoquímica de laminina claramente confirma que en los reagregados de gónadas aisladas la formación de los cordones seminíferos se lleva a cabo. Las células de Leydig se localizaron en la región estromática rodeando a los cordones seminíferos (fig. 10).

Con los ensayos de radioinmunoanálisis se detectó que las células mesonéfricas en los reagregados, incrementan la producción de testosterona. Las pruebas estadísticas confirmaron que existen diferencias significativas en reagregados de gónadas con mesonefros con respecto a reagregados de gónadas aisladas (fig. 11).

Figura 1

Micrografía de luz del botón celular obtenido de la disgregación de gónadas de 11.5 *dpc*. Las células germinales (gc) y las células somáticas (S) se encuentran separadas y distribuidas de una manera aleatoria (312x).

Figura 2

Micrografía electrónica de células disgregadas obtenidas de gónadas fetales de 11.5 *dpc*. Se observa la presencia de procesos citoplásmicos de tipo filopodio (f), y pseudopodos gruesos de tipo lobopodio (flechas) (7800x).

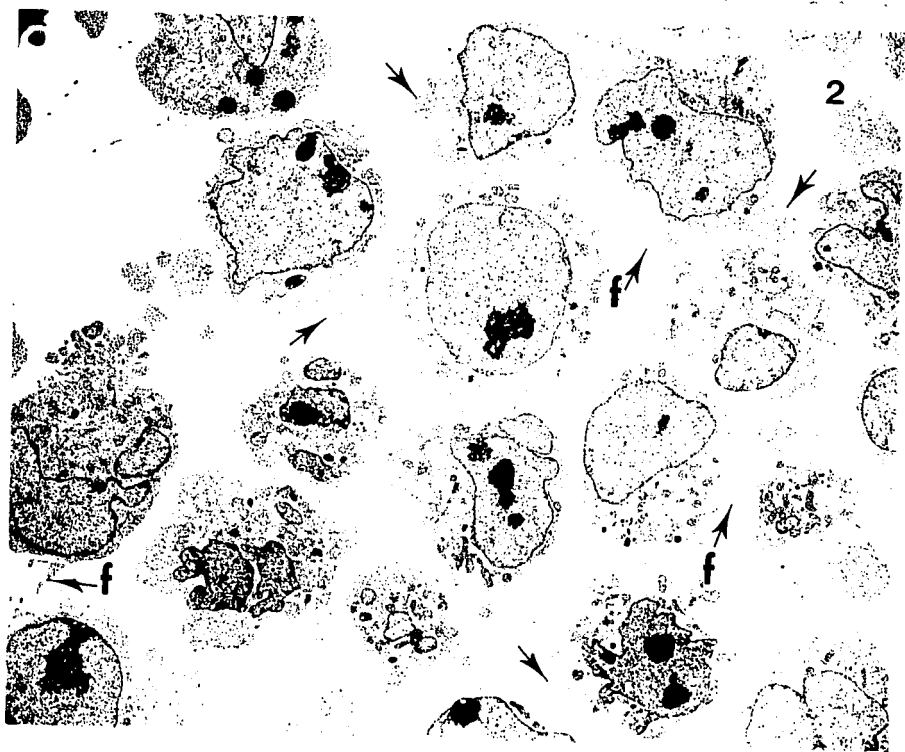
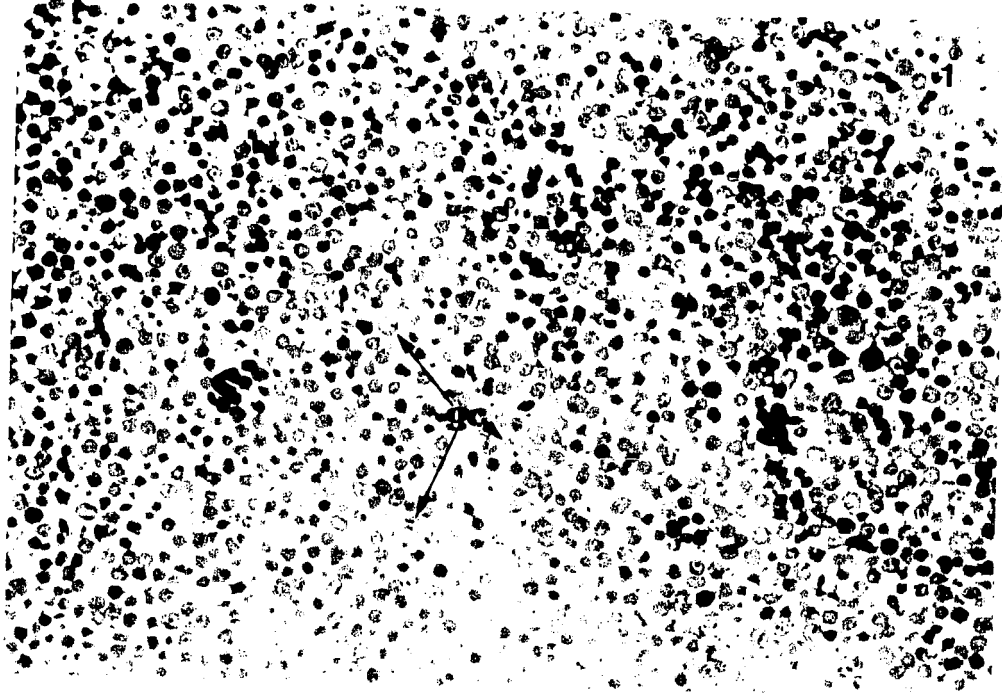


Figura 3

Disgregado-Reagregado de gónadas con mesonefros de machos de 11.5 dpc cultivados 96 h. Las células germinales y las células de Sertoli se incorporan dentro de los cordones seminíferos (sc). Las células epiteliales de la región mesonéfrica se reagregan como túbulos mesonéfricos (mt). Las células endoteliales reconstituyen a los vasos sanguíneos (bv) que se observan entre el tejido estromático (250x).

Figura 4

A un mayor aumento de la figura 3, se observan a las células germinales (gc) y a las células de Sertoli (S) dentro de los cordones seminíferos, los cuales se encuentran rodeados por células mioides (mc) y vasos sanguíneos (bv). (600x).

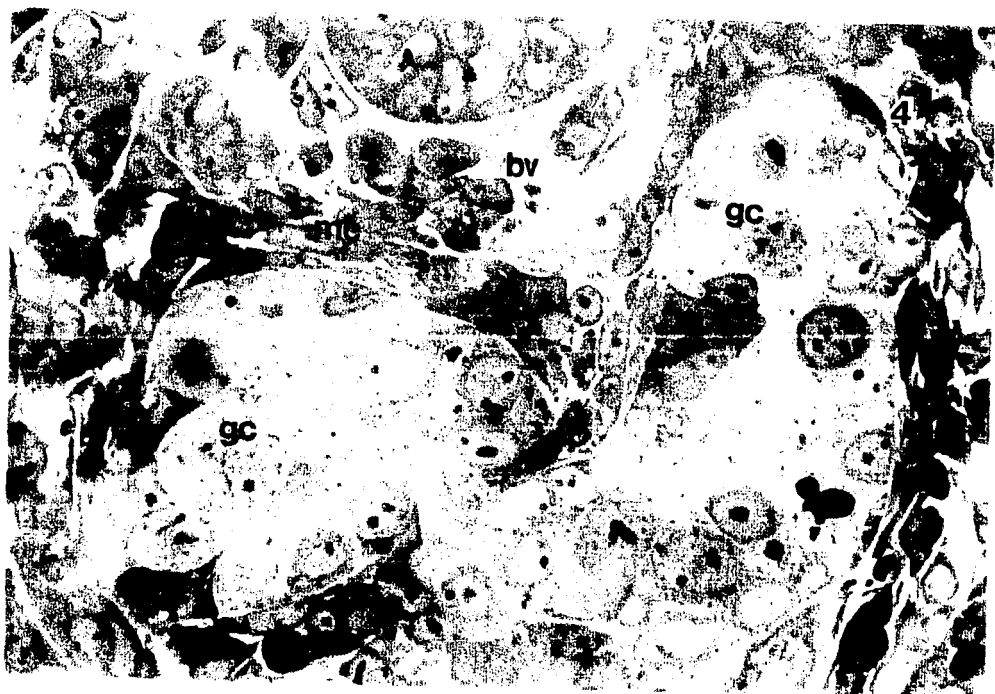
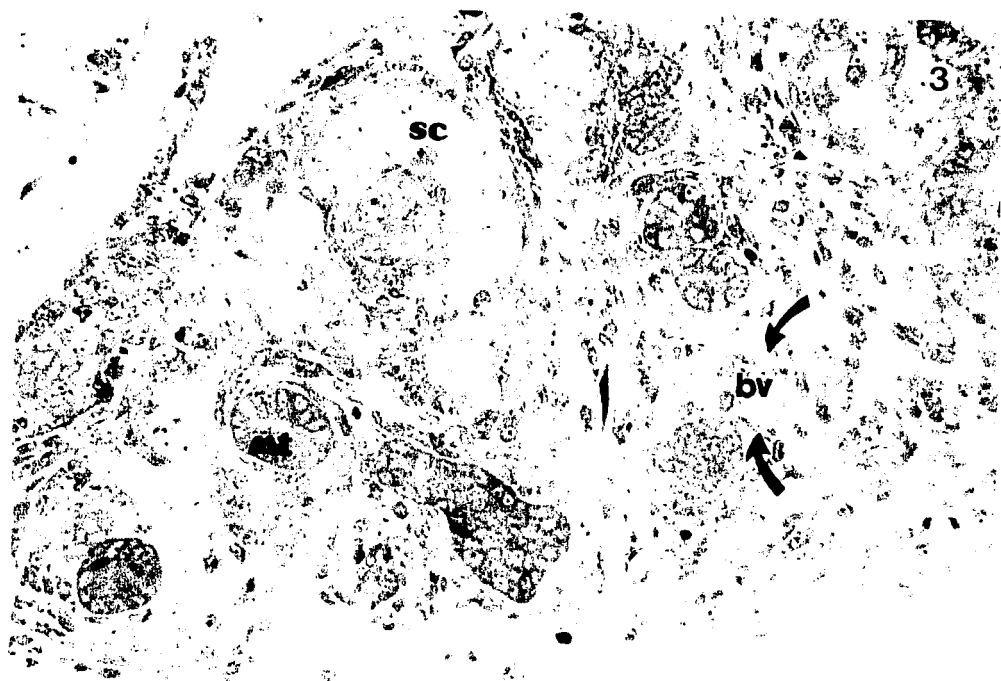


Figura 5

DetECCIÓN inmunohistoquímica de la hormona antimülleriana (MIS) en disgregados-reagregados de complejos urogenitales de machos de 11.5 *dpc* cultivados durante 96 h. La presencia de MIS hace evidente la organización de los cordones seminíferos (sc), así como la diferenciación de las células de Sertoli (S) (250x).

Figura 6

La detección inmunohistoquímica de laminina en disgregados-reagregados de complejos urogenitales de machos de 11.5 *dpc* y cultivados por 96 h, claramente demuestra la presencia de cordones seminíferos (sc). En el compartimento estromático, la reacción histoquímica de la delta-5-3beta-HSD revela la presencia de células de Leydig (lc), localizadas en la periferia del reagregado (600x).

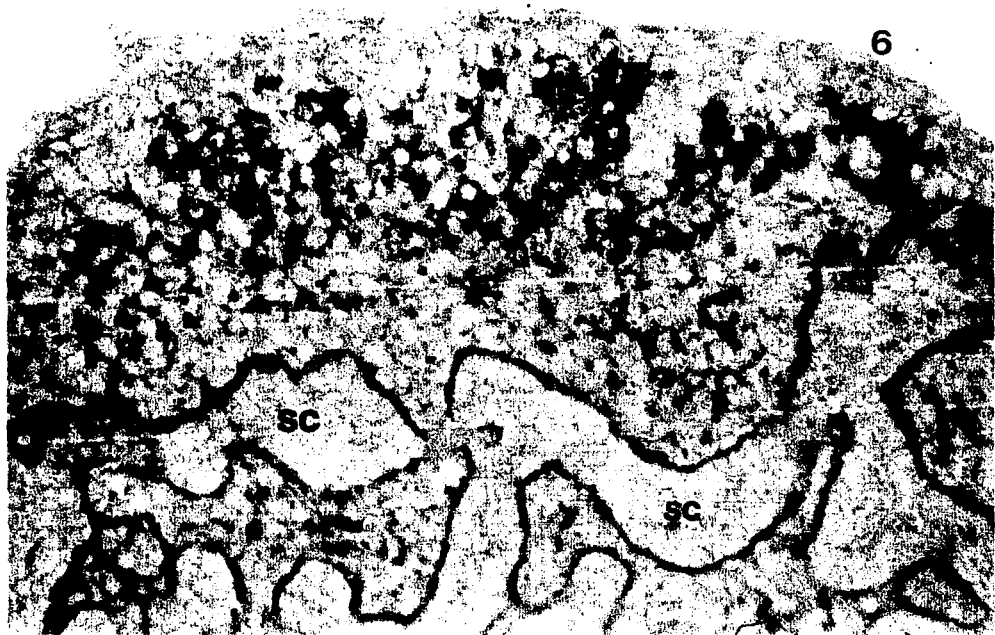
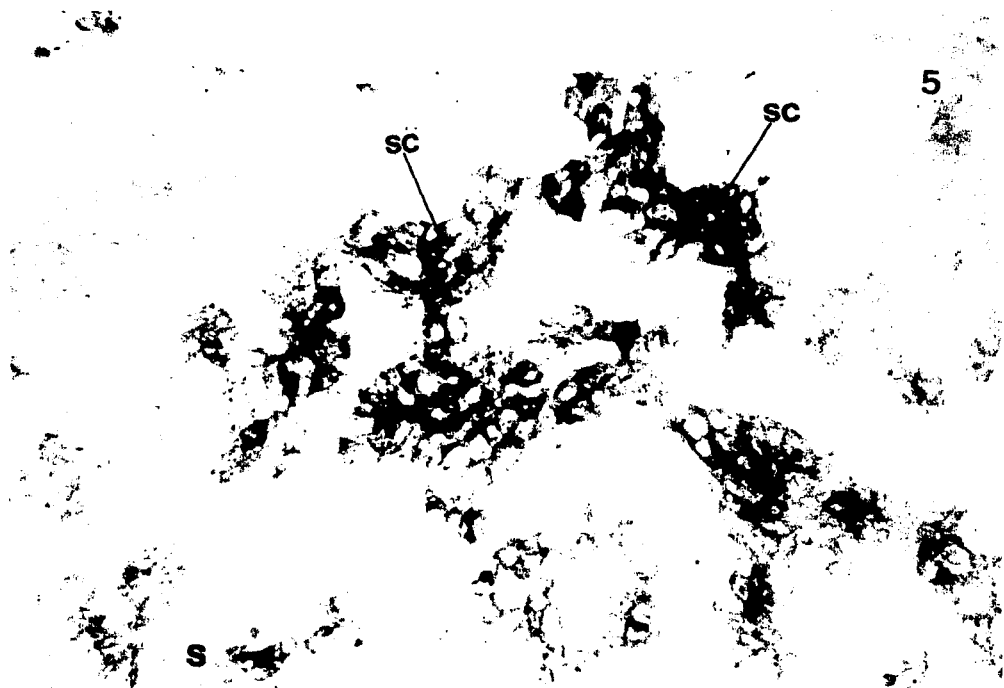


Figura 7

Disgregado-reagregado de gónadas aisladas machos de 11.5 *dpc* cultivado por 96 h. Las células se observan compactadas como se observó en cultivos de gónadas aisladas (250x).

Figura 8

A un mayor resolución de la figura 7 se puede observar que las células de Sertoli y las células germinales (gc) se encuentran incorporadas dentro de los cordones seminíferos. Las células del estroma, mioides (mc) y vasos sanguíneos (bv) mantienen un arreglo compacto (600x).

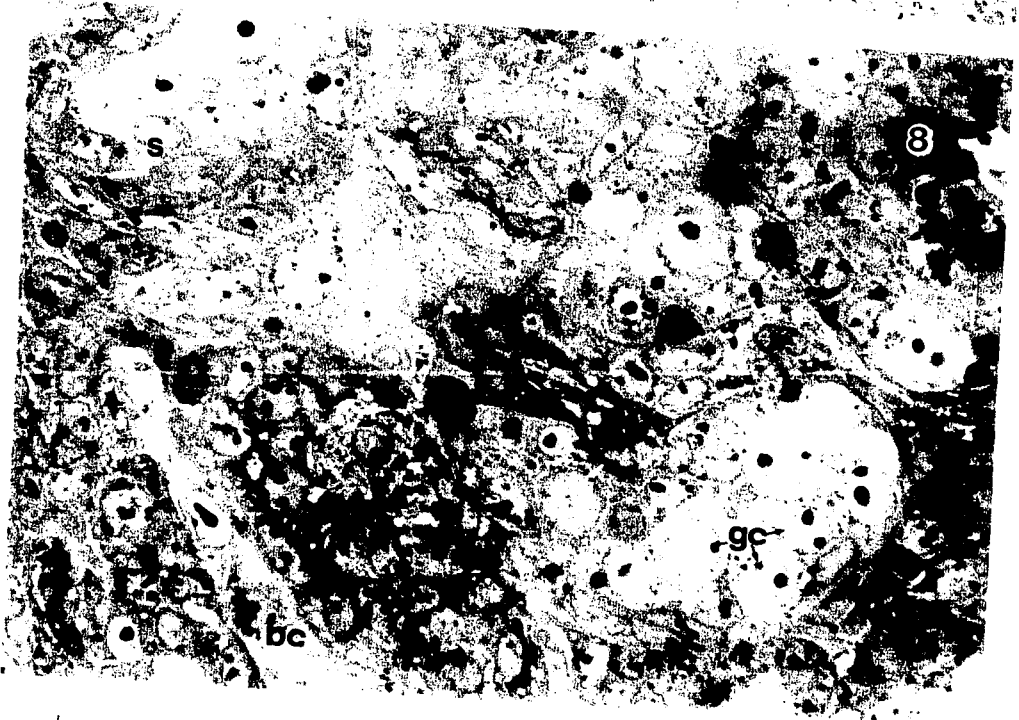
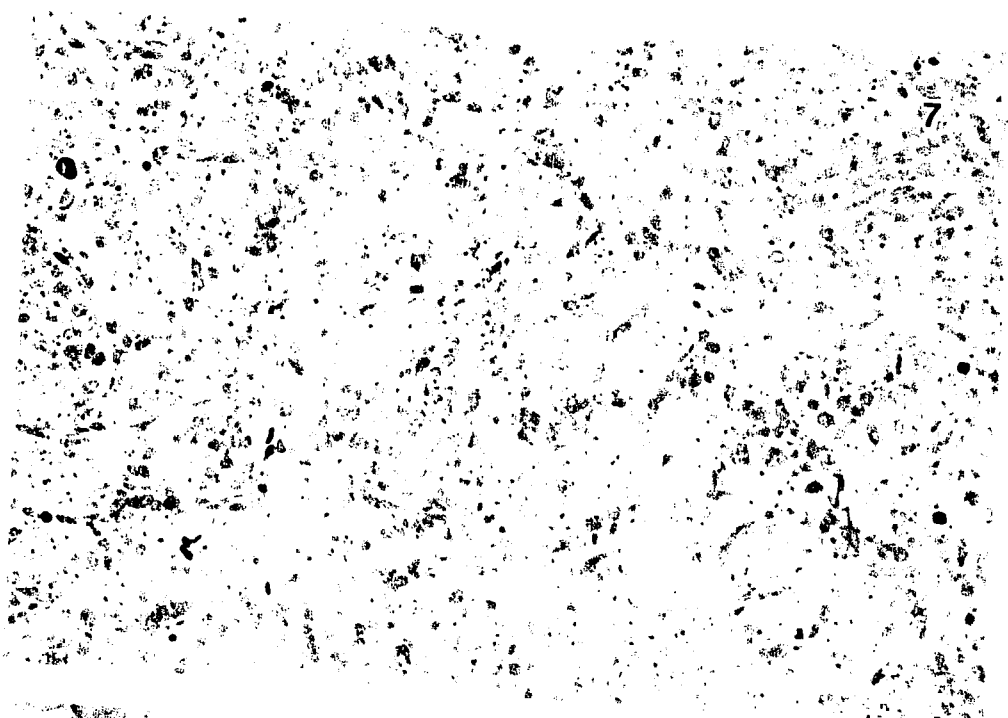


Figura 9

Detección inmunohistoquímica de la hormona antimulleriana en disgregados-reagregados de gónadas aisladas cultivadas por 96 h. La reorganización de los cordones seminíferos se ha llevado a cabo (sc), así como la diferenciación de células de Sertoli (S)(250x).

Figura 10

La detección inmunohistoquímica de laminina confirma la formación de los cordones seminíferos (sc) en reagregados de gónadas aisladas. El depósito de formazan revela que la diferenciación de células de Leydig (Lc) se lleva a cabo en estos reagregados, y su localización es igual que reagregados de gónadas con mesonefros (600x).

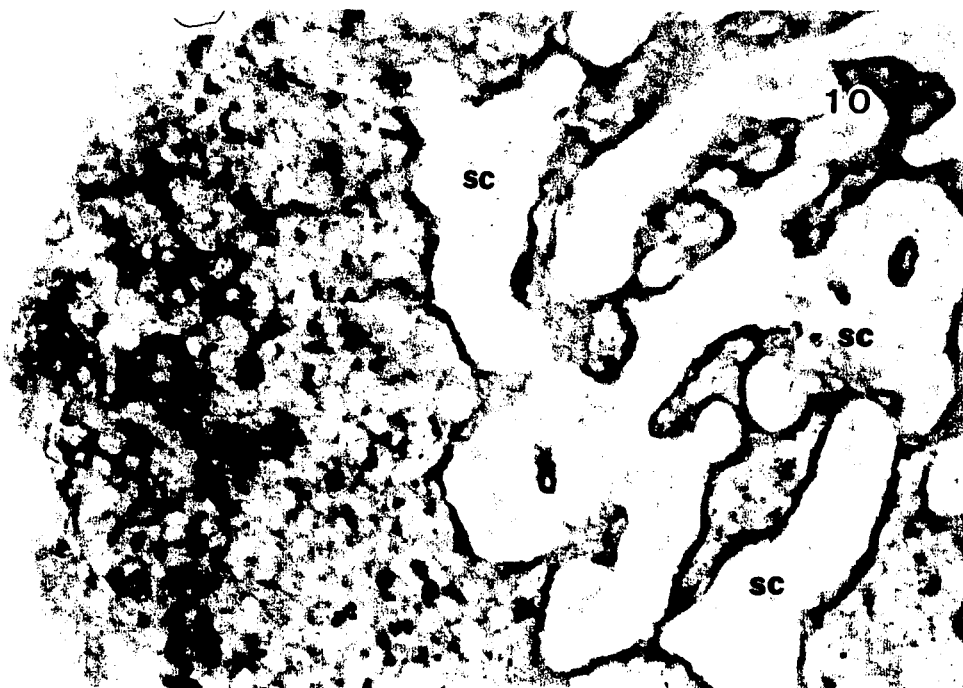
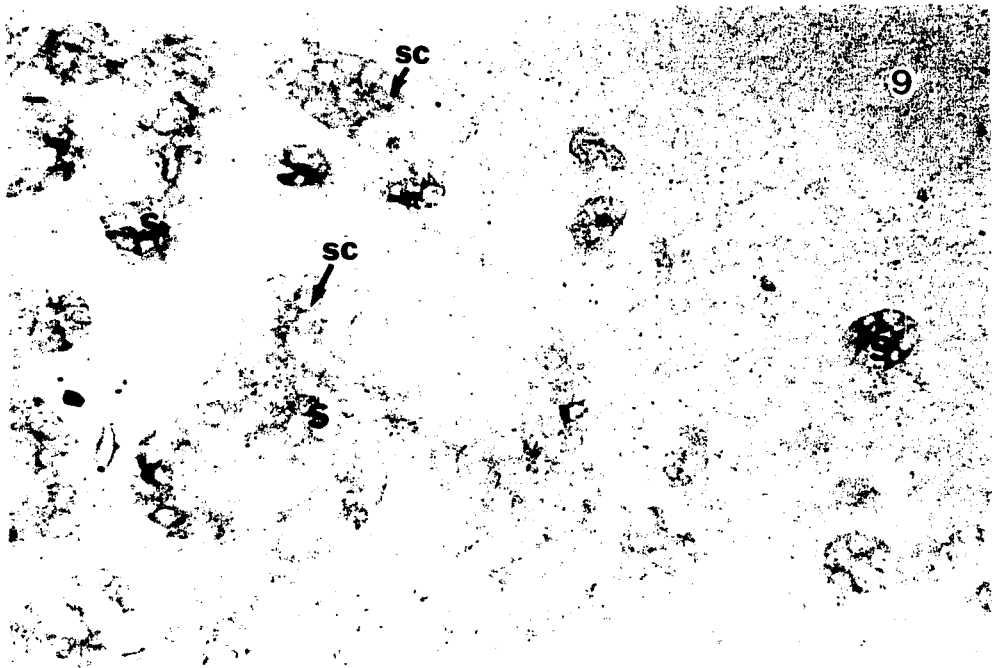
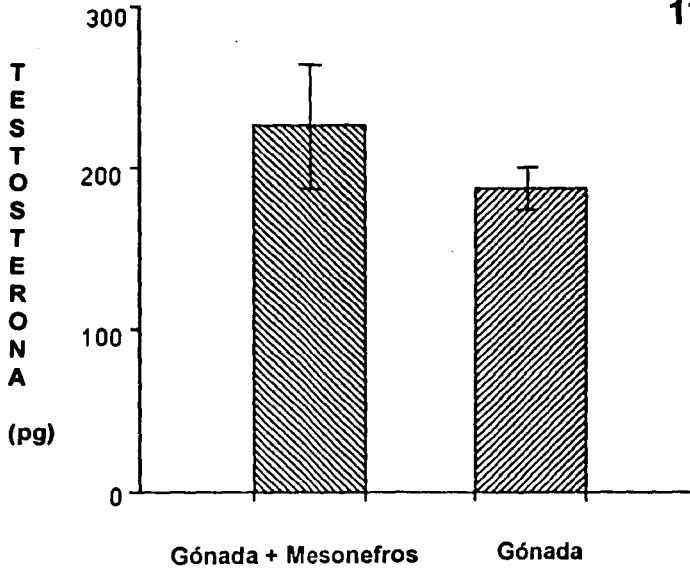


Figura 11

Radioinmunoanálisis de Testosterona en el medio de cultivo.

En la gráfica se observa que la presencia de células mesonéfricas en los reagregados, incrementa la producción de testosterona. Aunque las desviaciones estandar se sobrelapan, las pruebas estadísticas indican que existen diferencias significativas en la producción de testosterona (t = prueba de t para grupos independientes; d f = grados de libertad).



Células reagregadas después de 96 h de cultivo

$T=3.66$
 $d.f.=20$
 $P<0.05$

5 DISCUSION GENERAL

Al estudiar el desarrollo de las gónadas fetales *in vitro*, algunos autores han sugerido que la diferenciación de las células de Sertoli y de Leydig, así como, la formación de cordones seminíferos en el testículo pudieran estar controlados por mecanismos independientes (Magre y Jost, 1984; Patsavoudi *et al.* 1985).

Algunas observaciones en cultivos de gónadas fetales sugieren que la diferenciación de células de Sertoli, células de Leydig y la formación de cordones seminíferos puede ser inhibida independientemente *in vitro* (Magre *et al.* 1981; Jost y Magre, 1988; Taketo *et al.* 1984). Sin embargo, no se consideró en ningún caso el papel del mesonefros adyacente en la organización testicular.

Recientemente Buehr *et al.* (1993), encontraron que el testículo fetal en el ratón se desarrolla mejor cuando es cultivado junto con el mesonefros. Esto sugiere que este órgano puede jugar un papel importante en la diferenciación de la gónada del macho, ya que en cultivos de gónadas sin mesonefros no se llevó a cabo la formación de los cordones seminíferos.

En el presente estudio se confirmó que la región del mesonefros adyacente es necesaria para que se lleven a cabo los procesos morfogénéticos que conducen a la formación de los cordones seminíferos en gónadas de ratón *in vitro*. Sin embargo, en los experimentos de disgregación-reagregación, se encontró que la no formación de cordones seminíferos en cultivos de gónadas aisladas, se debe a la escasa cantidad de células estromáticas presentes en la cresta genital a los 11 *dpc*.

En los reagregados en cambio, se suman las células estromáticas de seis gónadas, de manera que la activa proliferación de esas células permite la organización de los cordones seminíferos, así como la diferenciación de las células de Sertoli y de Leydig. Por lo tanto, se puede decir que a los 11 *dpc* existe una activa proliferación de células mesonefricas hacia la región de la gónada, donde aún la cantidad de tejido estromático no es suficiente para llevar a cabo su diferenciación.

Los análisis de autoradiografía demuestran que dos tipos de células estromáticas penetran a la región del testículo desde la región mesonefrica: células

mioides peritubulares y células endoteliales. De este hecho se podría postular, que estas células y/o sus productos extracelulares serían la contribución del mesonefros para la formación de los cordones testiculares. Asimismo, se establece porqué al inicio de la diferenciación testicular, la región mesonefrica es necesaria para la segregación normal de los compartimentos epitelial y estromático.

En este trabajo, la mayoría de las células marcadas por autoradiografía son células endoteliales, lo que podría sugerir que estas células proliferan en la región mesonefrica y posteriormente penetran a la región de la gónada. En la etapa inicial de la diferenciación testicular, una señal proveniente de la gónada parece inducir la penetración de vasos sanguíneos, lo que en un momento dado podría guiar a otras células hacia la gónada. Existen evidencias que apoyan esta interpretación: En el punto de inicio de la diferenciación sexual (12.5 *dpc*), las gónadas de machos se distinguen de las de hembra por que se encuentran altamente vascularizadas (Merchant-Larios y Taketo, 1991). En cultivos de gónadas aisladas individualmente, en las que no se forman cordones seminíferos, no se detectan células endoteliales ni células mioides (Buehr et al. 1993).

En testículos de rata, por otra parte, se encontró que las membranas basales que rodean a los cordones seminíferos son producidas en colaboración por las células de Sertoli y las células mioides (Skinner *et al.* 1985). En condiciones de cultivo, las células miodes peritubulares producen tanto fibronectina como laminina, mientras que las células de Sertoli producen sólo laminina (Davis *et al.* 1990). En este estudio encontramos que aunque en gónadas aisladas se produce laminina, la integración de membranas basales es incompleta. Esto podría deberse a la ausencia de células mioides peritubulares y fibroblastos provenientes de la región del mesonefros.

En el caso de los reagregados, la cantidad de células mioides, fibroblastos y células de Sertoli se incrementa, con lo cual aumenta su actividad para secretar componentes extracelulares como laminina, fibronectina, colágena, etc.

La diferenciación de células de Sertoli y de Leydig *in vitro* coincide con la diferenciación de estos tipos celulares *in vivo*. La presencia del mesonefros no influye en el tiempo de diferenciación de estos dos linajes celulares. En nuestras condiciones de cultivo, tanto en complejos urogenitales como en gónadas aisladas, las células de Sertoli se detectan por inmunohistoquímica del MIS después de 12 h

de cultivo, lo que es comparable con gónadas de macho *in vivo*. La detección de MIS después de 24 h se incrementa tanto *in vivo* como *in vitro*, y sólo se observan diferencias en cultivos de gónada aislada donde las células de Sertoli se encuentran distribuidas formando grupos irregulares de diferente tamaño y rara vez se encontraron estructuras parecidas a cordones.

Al tomar la expresión de MIS como una evidencia para la diferenciación de las células de Sertoli, el presente estudio demuestra que la organización de los cordones seminíferos no es necesaria para la diferenciación de estas células de Sertoli.

La diferenciación de células de Leydig en testículos fetales de ratón se ha estudiado por medio de los criterios de citoquímica (Hitzemann, 1962), ultraestructura (Russo y de Rosas, 1971) y morfología (Vergouwen *et al*, 1991). En todos estos estudios, las células de Leydig se localizan en el compartimento estromático después de la formación de los cordones seminíferos. Por otro lado, aunque Taketo, *et al* (1991) han reportado que los testículos fetales de ratón secretan testosterona a los 12.5 *dpc*, una correlación entre la diferenciación morfológica y fisiológica de las células de Leydig durante la ontogenia del testículo no se ha evidenciado.

Los experimentos de gónadas aisladas indican que los precursores de las células de Leydig estarían formando parte de la gónada a los 11.5 *dpc*, cuando el *Sry* se está expresando (Koopman, *et al*. 1990).

Se encuentra bien establecido que el *Sry* actúa específicamente en células de la gónada indiferenciada y lleva a cabo su diferenciación hacia testículo (Lovell-Badge, 1992). Se ha propuesto que en las células de Sertoli se expresa el *Sry* y regula la producción de factores necesarios para la diferenciación de las células de Sertoli. De acuerdo a los presentes resultados, la expresión de factores angiogénicos en las gónadas indiferenciadas de machos se podría considerar como un fenómeno importante en la cascada de eventos iniciada por el *Sry*.

En estudios recientes en el ratón, se encontró que los animales desprovistos de MIS presentan un desarrollo de cordones seminíferos normal (Bheringer *et al*. 1994). Por lo tanto, esta molécula puede descartarse como el factor angiogénico responsable de la invasión de células mesonéfricas hacia la gónada.

La migración de células de la región del mesonefros hacia la región de la gónada, puede deberse a una señal que viene de las células de la gónada, probablemente controladas por el factor determinante de la diferenciación testicular (*Sry*), por lo que nos preguntamos si sólo las células del estroma mesonefrico responden específicamente a esta señal.

Nosotros encontramos que, células del estroma del esbozo de la extremidad anterior (EEA) migran hacia la región de la gónada, y se lleva a cabo la formación de los cordones seminíferos. Por lo que es claro que ambos tejidos primordiales embrionarios responden a la misma señal producida por las células de la cresta gonadal a los 11.5 *dpc*. También se observó que la diferenciación de células de Sertoli y de Leydig en estos injertos se lleva a cabo normalmente y no se ve afectada por factores extraños en los procesos de morfogénesis de las extremidades.

Estos resultados contradicen reportes previos en donde los fragmentos del EEA o corazón se injertaron con crestas genitales y no se observó la formación de los cordones seminíferos (Buehr *et al.* 1993). Las diferencias pueden estar en las condiciones de cultivo, es decir, el sustrato utilizado para el cultivo de órganos y el tiempo de cultivo. Buehr, *et al.* (1993), observaron sus injertos después de 7 días de cultivo. En nuestras condiciones de cultivo, tanto en injertos de mesonefros-gónada como EEA-gónada, se pudo observar la formación de cordones seminíferos después de 24 h de cultivo, y permanecen bien organizados hasta las 96 h. Tres días más tarde, la cresta genital se incorpora dentro del EEA el cual tiende a desintegrarla.

Aunque se podría argumentar que el papel del mesonefros en la formación de los cordones seminíferos podría deberse a que en esa región se produce algún factor difusible que induce la organización de los cordones, dos evidencias experimentales indican que se trata de interacciones celulares directas: i) cuando se colocó un filtro permeable entre el mesonefros y la gónada, se previno la formación de los cordones seminíferos (Buehr *et al.* 1993). ii) En el presente estudio se observó que si tanto el EEA como la gónada se injertaban en extremos donde coincidían con su superficie epitelial, y no donde se encontraban expuestas las áreas donde se realizó la disección, no se llevaba a cabo la formación de los cordones seminíferos.

Por otro lado, la producción de un factor difusible requerido para la migración de células del estroma mesonéfrico, puede ser un paso subsecuente a la expresión del *Sry*. Sería interesante conocer si el factor difusible putativo es producido por las mismas células somáticas que expresan el *Sry*. A nivel de microscopia electrónica, la cresta genital a los 11.5 *dpc* está formada por células germinales, células epiteliales, vasos sanguíneos y algunas células mesenquimáticas. En el presente estudio encontramos que en gónadas aisladas se llevo a cabo la diferenciación de células de Sertoli y de Leydig, lo que sugiere que las precursoras de estas células están ya presentes en la cresta genital desde etapas muy tempranas. De modo que el gene *Sry* se puede estar expresando en cualquiera de estos tipos celulares.

Un hallazgo interesante en el presente estudio fue el encontrar que la cantidad de testosterona producida en los cultivos, difiere dependiendo del sexo del tejido injertado. La producción de testosterona se ve aumentada significativamente cuando se injerta al primordio testicular con un mesonefros o un EEA de un embrión macho. En los injertos de mesonefros o EEA de hembra, se secretan niveles de testosterona similares a las secretadas por gónadas aisladas. Esto sugiere que la diferencia en la producción de testosterona puede deberse a la presencia de genes en el cromosoma Y importantes para la función esteroidogénica de las células de Leydig (Jutley y Stewart, 1985; Patek *et al.* 1991).

Como en este estudio se encontró que las células mesonéfricas migran hacia la región de la gónada independientemente de su sexo genético, queda por dilucidar si las células XX son capaces de diferenciarse como células de Leydig.

6 CONCLUSIONES

- 1) Las crestas genitales de macho tienen la capacidad para autodiferenciarse *in vitro*. Sin embargo, cuando son cultivadas en etapas muy tempranas, no poseen suficiente tejido estromático para formar a los cordones seminíferos.
- 2) La formación de los cordones seminíferos requiere la migración de células provenientes de la región mesonéfrica.
- 3) Se identificaron células endoteliales, mioides y fibroblastos de origen mesonéfrico, como las responsables de la morfogénesis de los cordones seminíferos.
- 4) La diferenciación de células de Sertoli y de Leydig es independiente de la migración de células mesonéfricas.
- 5) El sexo cromosómico de las células que migran del mesonefros o del EEA determina el nivel de testosterona secretado por el testículo fetal.

7 BIBLIOGRAFIA

Alvarez-Buylla A. y Merchant-Larios H. (1986): Mouse primordial germ cells use fibronectin as substrate for migration. **Expl. Cell. Res.** **165**: 362-368.

Behringer R.R, Cate R.L, Froelick G.J, Palmiter R.D. y Brinster R.L. (1990): Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian-inhibiting substance. **Nature** **345**: 167-170.

Behringer R.R, Finegold J.M. y Cate L.R. (1994): Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. **Cell**: 415-425.

Berta P, Hawkins J.R, Sinclair A.H, Taylor A, Griffiths B.L, Goodfellow P.N. y Fellows M. (1990): Genetic evidence equating SRY and the male sex determining gene. **Nature** **348**: 248-250.

Brambell F.W. y Parkes S.A. (1927): Changes in the ovary of the mouse following exposure to X-rays: 3. Irradiation of nonparous adult. **Prog. Roy. Soc. B.** **101**: 36.

Bishop-Calame S. (1966): Etude expérimentale de l'organogénèse du système urogénitale de l'embryon de poulet. **Arch Anat Micr Morph Exp.** **55** (spp. No. 2): 215.

Brien P. (1937): La réorganisation de l'éponge après dissociation par filtration et phénomènes d'involution chez Ephydatia fluviatilis. **Arch. Biol.** **48**: 185-268.

Buehr M, Subin G.U. y McLaren A. (1993): Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. **Development** **117**: 273-281.

Burgoyne P.S. (1988): Role of mammalian Y chromosome in sex determination. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.** **B322**: 63-72.

Burns R.K. (1961): Role of hormones in the differentiation of sex. In: **Sex and internal secretions.** (eds. Young Luc y Baltimore D.M.). Williams and Williams 76-160.

Byskov A.G. y Saxon L. (1976): Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. **Dev. Biol.** **52**: 193-200.

Byskov A.G. (1978): The meiosis inducing interaction between germ cells and rete cells in the fetal mouse gonad. **Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.** **19**: 1251-1261.

Cambar R. y Mesnage J. (1963): L'agénésis expérimentale du sexe chez les amphibiens anoures. **C R Acad. Sci. Paris** **257**: 4021-4023.

Cate R.L., Donahoe P.K. y MacLaughlin. (1990): Müllerian inhibiting substance. **Handbook Exp. Pharmacol.** **95**: 179-210.

Cate R.L. y Wilson C.A. (1993): Müllerian-inhibiting substance. In: **Genes in Mammalian Reproduction**, R.B.L. Gwatkin (ed). New York: Wiley-Liss: 185-205.

Chiquione A.D. (1954): The identification, origen and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. **Anat. Rec.** **118**: 135-146.

Dang D.C. y Fouquet J.P. (1979): Differentiation of the fetal gonad of *Macaca fascicularis* with special reference to the testis. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.** **19**: 1197-1209.

Davis M.C, Papadopoulos V, Sommers H.K. y Dym M. (1990): Differential expression of extracellular matrix components in rat Sertoli cells. **Biol. Reprod.** **43**: 860-869.

Deanesly R.(1975): Follicle formation in guinea-pigs and rabbits: a comparative study with notes on the rete ovarii. **J. Reprod. Fert.** **45**: 371-374.

Dolci S. y De Felici M. (1990): A study of meiosis in chimeric mouse fetal gonads. **Development** **109**: 37-40.

Donahoe P.K, Ito Y, Morikawa Y. y Hendren W.H. (1977): Müllerian inhibiting substance in human testes after birth. **J. Pediat. Surg.** **12**: 323-330.

Donovan P.J, Sttot D, Cairns L.A, Heasman J. y Wylie C.C. (1986): Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. **Cell** **44**: 831-838.

Escalante D. y Merchant-Larios H. (1992): Somatic and germ cell interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. **Exp. Cell Res.** **198**: 150-158.

Evans C.W, Robb D.I, Tucket F. y Challoner S. (1982): Regulation of meiosis in the foetal mouse gonad, **J. Embryol Exp. Morph.** **68**: 59-67.

Everett N.B. (1945). The present status of the germ cells problem in vertebrates. **Biol. Rev.** **20**: 45-55.

Fauré-Fremient E. (1932): Morphogénèse expérimentale (reconstitution) chez Ficulina ficus. **Arch. Anat Microscop. Morphol. Exper.** **28**:1-80.

Fazel A.R, Schulte B.A, Thompson R.P. y Spicer S.S. (1987): Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. **Cell Differentiation** **21**: 199-211.

Gillman J. (1948): The development of gonads in man, with a consideration of the role of fetal endocrines and histogenesis of ovarian tumors. **Contrib. Embryol. Carnegie Inst. Washinton** **32**: 81-83.

Godin I, Wylie C. y Heasman J. (1990): Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cells numbers and direction of migration in culture. **Development** **108**: 357-363.

Gondos B. (1984): Germ cell differentiation and intercellular bridges. In: **Ultrastructure of Reproduction**. Van Berkmon J. and Motta P.M. (eds). Martinus Nijhoff Publishers, Boston 31-45.

Grund K.S, Pelliniemi J, Paranko J, Muller U. y Lakkala-Paranko T. (1986): Reaggregates of cells from rat testis resemble developing gonads. **Differentiation** **32**: 135-143.

Hannel A.C. y Eddy E.M. (1986): Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. **Gamete Research** 15:25-34.

Hillscher B. y Hillscher W. (1978): Some details on the kinetics of oogonia and M-proespermatogonia in NMRI mice in comparison to rat and man. In: **Development and function of reproductive organs**. Byskov A.G. and Peters H. (eds). *Experta Medica*, Amsterdam 131-139.

Hitzeman S.J.W. (1962): Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. **Anat. Rec.** 143: 351-362.

Humphrey R.R. (1933): The development and sex differentiation of the gonad in the wood frog (*Rana sylvatica*) following extirpation or orthotopic implantation of the intermediate segment and adjacent mesoderm. **J. Exp. Zool.** 65: 243-269.

Hutson J.M. y Donahoe P.K. (1986): The hormonal control of testicular descent. **Endocrinol. Rev.** 7: 270-283.

Josso W, Picard J.Y. y Tran D. (1977): The antimüllerian hormone. **Recent. Prog. Horm. Res.** 33: 117-163.

Josso N, Cate R.L, Picard J.Y, Vigier B, di Clemente N, Wilson C, Imbeaud S, Pepinsky R.B, Guerrier D, Boussin L, Legeai L. y Carré-Eusebe D. (1993): Anti-Müllerian hormone: the jost factor. **Rec. Prog. Hormone Res.** 48: 1-59.

Jost A, Vigier B. y Prepin J. (1972): Freemartins in cattle: the first steps of sexual organogenesis. **J. Reprod. Fertil.** 29: 349-379.

Jost A. y Magre S. (1988): Control mechanisms of testicular differentiation. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.** B322: 55-61.

Jutley J.K. y Stewart A.D. (1985): Genetic analysis of the Y-chromosome of the mouse: Evidence for two loci affecting androgen metabolism. **Genet. Res.** 47: 29-34.

Koopman P, Münsterberg A, Blanche C, Vivian N. y Lovell-Badge R. (1990): Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. **Nature** 348: 450-452.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P. y Lovell-Badge R. (1991): Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. **Nature** **351**: 117-121.

Kuwana T, Maeda S.H. y Fujimoto T. (1986): Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage *in vitro*. **Anat. Rec.** **215**: 403-406.

Lovell-Badge R. (1992): Testis determination: soft talk and kinky sex. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **2**: 596-601.

McLaren A. y Buehr M. (1990): Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. **Cell Differ. Dev.** **31**: 185-195.

Magre S. y Jost A. (1984): Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytidifferentiation of Sertoli cell. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **81**: 7831-7834.

Magre S, Angelopoulou A. y Jost A. (1981): Action du sérum de foetus veau sur la différenciation *in vitro* ou le maintien des cordons séminifères du testicule du foetus du rat. **C R Acad. Bc. Paris t 292 serie III**: 85-89.

Merchant-Larios H. (1975): Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. **Develop. Biol.** **41**: 1-21.

Merchant-Larios H. (1979): Origin of the somatic cells in the rat gonad: an autoradiographic approach. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.** **19**: 1219-1229.

Merchant-Larios H. y Villalpando I. (1981): Ultrastructural events during early gonadal development in Rana pipiens and Xenopus laevis. **Anat. Rec.** **199**: 349-360.

Merchant-Larios H, Popova L. y Reyss-Brion M. (1984): Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. **Develop. Growth and 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 Horacio, Norma Moreno-Mendoza y Mia Buehr. (1993): The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. **Int. J. Dev. Biol.** **37**: 407-415.
- Muller U, Siggh L, Grund K.S. y Jones W.K. (1982): Ovarian cells participate in the formation of tubular structures in mouse/rat heterosexual gonadal cocultures: A direct demonstration by hybridization. **Differentiation** **22**: 136-138.
- Münsterberg A. y Lovell-Badge R. (1991): Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. **Development** **113**: 613-624.
- Nagano T. y Zuzuki F. (1976): The postnatal development of the junctional complexes of the mouse Sertoli cells as revealed by freeze-fracture. **Anat. Rec.** **185**: 403-418.
- Nagy F. (1972): Cell division kinetics and DNA synthesis in the immature Sertoli cells of the rat testis. **J. Reprod. Fert.** **28**: 389-395.
- Ohno S, Nagai Y. y Ciccarese S. (1979): Testis-organizing H-Y antigen and the primary sex determining mechanism of mammals. **Recen. Prog. Horm. Res.** **35**: 449-478.
- Palmer S. y Burgoyne P.S. (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.
- Paranko J, Pelliniemi J, Vaheri A, Foidart J.M. y Lakkala-Paranko T. (1983): Morphogenesis and fibronectin in sexual differentiation of rat embryonic gonads. **Differentiation** **S23**: S72-S81.
- Patek C.E, Kerr J.B, Gosden R.G, Jones K.W, Hardy K, Muggleton-Harris A.L, Handyside A.H, Whittigham D.G: y Hooper M.L. (1991): Sex chimerism, fertility and sex determination in the mouse. **Development** **113**: 311-325.
- Patsavoudi E, Magre S, Castanier M, Scholler R. y Jost A. (1985): Dissociation between testicular morphogenesis and functional of Leydig cells. **J. Endocr.** **105**: 235-238.

Russo J. y De Rosas J.C. (1971): Differentiation of Leydig cell of the mouse testis during the fetal period. An ultrastructural study. **Am. J. Anat.** **130**: 461-480.

Silver W.K. y Wachtel S.S. (1977): H-Y antigen: behaviour and function. A cell surface component of vertebrate may be directly involved in primary sex determination. **Science** **195**: 956-960.

Skinner M.K, Tung P.S. y Fritz I.B. (1985): Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production extracellular components. **J. Cell Biol.** **100**: 1941-1947.

Taketo T, Thau B.R, Adeyemo O. y Koide S.S. (1984): Delay of testicular differentiation in the B6.Ydom ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for Müllerian Inhibiting Substance. **Dev. Biol.** **146**: 523-531.

Taketo T, Saeed J, Roberge S, Matsuo N. y Koide S.S. (1991): Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad in vitro. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** **38**(4): 523-531.

Upadhyay S. y Luciano J.M. Zamboni (1981): The role of the mesonephros in the development of the mouse testis and its excurrent pathways. In: **Development and function of reproductive organs- V workshop on development and function of reproductive organs.** Copenhagen, July 6-9. Byskov A.G. and Peters H. (eds). Amsterdam, Excerpta Medica 18-27.

Upadhyay S. y Zamboni L. (1982): Ectopic germ cells: Natural model for the study of germ cell sexual differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **79**: 6584-6588.

Vergouwen R.P.F, Jacobs S.G.P.M, Huiskamp R, Davids J.A.G. y de Rooij D.G. (1991): Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. **J. Reprod. Fertil.** **93**: 233-243.

Wartenberg H. (1981): The influence of the mesonephric blastema on gonadal development and sexual differentiation. In: **Development and function of reproductive organs- V workshop on development and function of reproductive organs.** Copenhagen, July 6-9. Byskov A.G. and Peters H. (eds), Amsterdam, Excerpta Medica 3-12.

Wachtel S.S, Ohno S, Koo G.C. y Boyse E.A. (1975): H-Y antigen and male development. In: **The testis in normal and infertile men**. Troen P. and Nankin R.H. (eds). 35-43.

Wartenberg H, Inge K, Christoph V. y Schmolke C. (1991): Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. **J. Electron Microscopy Technique** 19: 133-157.

Weiss P. (1945): Experiments on cell and axonal orientation in vitro: The role of extracellular exudates in tissue organization. **J. Exp. Zool.** 100: 353-386.

Witschi E. (1948): Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal. **Contrib. Embryol.** 32: 67-80.

Witschi E. (1951): Embryogenesis of the adrenal and reproductive glands. **Recent. Prog. Horm. Res.** 6: 1-23.

Yoshinaga K, Hendrickx A.G. y Zamboni L. (1988): The development of the sexually indifferent gonad in the prosimian, Galago crassicaudatus crassicaudatus. **Am. J. Anat.** 137: 299-336.

Zamboni L, Bézard J. y Mauléon P. (1979): The role of the mesonephros in the development of the sheep fetal ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.** 19: 1153-1178.

Zenzes M.T. y Engel W. (1981): The capacity of testicular cells of the postnatal rat to reorganize into histotypic structures. **Differentiation** 20:157-161.