

03068

6
25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

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

CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

FERTILIDAD DE HEMBRAS XY (B6.YDOM)
CON TRANSPLANTE DE OVARIOS XX

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

Biol. José Alejandro Marmolejo Valencia

Director de Tesis: Dr. Horacio Merchant Larios

México, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

TESIS

COMPLETA

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.

A mi Abuelita GABINA CASTELÁN
por su fortaleza, apoyo y amor.
Nunca te olvidaré.

A mis tías ESPERANZA y CAROLINA
A mi tío CARLOS

A mis hermanos Patricia
Beatríz
Antonio
Marcela
Rosa Elena

Con cariño especial para tí **BRENDA**.

Por permitirme formar parte de tu maravilloso mundo.
Por que en tí he conocido un verdadero ejemplo de
enteresa, tenacidad y honestidad. Por todos esos
momentos que hemos compartido y por todo lo que
ambos queremos alcanzar.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco de manera especial al Dr. **HORACIO MERCHANT LARIOS** por su excelente asesoramiento y apoyo para la realización del presente trabajo.
Gracias Doctor por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

Al Jurado por sus valiosas sugerencias.

Dra. Gabriela Moralf de la Brena
Dra. Irma Villalpando Fierro
Dra. Ma. del Carmen Clapp Jiménez-Labora
Dr. Roberto Domínguez Casalá

Con profundo agradecimiento al Dr. YUTAKA NISHIOKA por la realización de los análisis para la identificación del sexo genético.
Y hago partícipe de los agradecimientos al Sr. JOSÉ GUADALUPE BALTAZAR por el apoyo técnico brindado.

Mi agradecimiento a,

Dr. Yutaka Nishioka
Dr. Andrés Quintanar.

Y a quienes de alguna manera han contribuido
para la realización de éste trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, NORMA MORENO, JOSÉ GUADALUPE
BALTAZÁR, DOLORES LARA, ARTURO SALAME y ESTHER.

ÍNDICE.

I.	RESUMEN.	1
II.	INTRODUCCIÓN.	2
2.1	Determinación sexual en los mamíferos.	2
2.1.1	Diferenciación sexual gonadal y fenotípica.	2
2.1.2	Gónada indiferenciada.	3
2.1.3	Diferenciación testicular.	3
2.1.4	Diferenciación del ovario.	7
2.2	El ratón B6.Ydom.	8
2.2.1	Características de las hembras B6.Ydom.	10
2.3	Transplante ortotópico de ovarios.	15
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	16
IV.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	17
4.1	Hipótesis general.	17
4.2	Hipótesis específicas.	17
4.3	Objetivo general.	17
4.4	Objetivos específicos.	17
V.	MATERIAL Y MÉTODOS.	18
5.1	Estrategias experimentales.	18
	A) Transplante ortotópico de ovarios adultos.	18
	B) Transplante ortotópico de ovarios infantiles.	18
	C) Transplante ortotópico de ovarios fetales.	19
5.2	Producción de ratones B6.Ydom.	21
5.2.1	Hibridación con la sonda de DNA, 145SC5.	21
5.2.2	Obtención de ratones fetales e infantiles B6.Ydom.	22
5.2.3	Obtención de ratones fetales, infantiles y adultos de la B6.	22
5.3	Transplante ortotópico de ovarios.	23
	A) Preparación de los injertos de ovario.	23
	B) Procedimiento operativo del transplante.	23
5.4	Dificultades quirúrgicas inmediatas.	26
5.5	Apareamiento de los animales operados.	26
5.6	Autopsias.	27
5.7	Reidentificación del genotipo de los injertos de ovario.	27
5.8	Microscopía.	27
VI.	RESULTADOS.	28
6.1	Hibridación con la sonda de DNA 145SC5 (<i>dot hybridization</i>).	28
6.2.1	A. Transplante ortotópico de ovarios adultos.	28
6.2.2	B. Transplante ortotópico de ovarios infantiles.	32

6.2.3	C. Transplante ortotópico de ovarios fetales.	35
6.3	Estado físico de los injertos de ovarios y otros órganos manipulados durante la cirugía.	40
6.4	Análisis histológico postoperación de los injertos de ovarios.	41
6.4.1	Características histológicas de los ovarios XX injertados tanto en hembras B6 como B6.Ydom.	41
6.4.2	Características histológicas de los ovarios B6.Ydom injertados en hembras B6.	41
6.4.3	Características histológicas de los ovarios locales intactos de las hembras B6.Ydom con implante unilateral.	42
VII.	DISCUSIÓN.	43
VIII.	RESUMEN DE RESULTADOS.	48
IX.	CONCLUSIÓN.	48
X.	PERSPECTIVAS.	48
XI.	LITERATURA CITADA.	49

I. RESUMEN.

Cuando el cromosoma Y del ratón doméstico *Mus musculus domesticus* (*Ydom*) [Tirano, Italia] o *Mus poschiavinus* (*Ypos*) [Poschiavo, Suiza] es introducido al genoma de la cepa C57BL/6J (B6), se altera el desarrollo del testículo a partir de la generación F2 (**B6.Ydom**) y como resultado hay una reversión sexual parcial o completa de los individuos XY. Los machos revertidos B6.Ydom (**hembras fenotípicas**) carecen de ciclo estral regular y no se reproducen.

En el presente trabajo estudiamos si la esterilidad de las hembras B6.Ydom se debe a una alteración del eje hipotálamo-hipófisis o es un problema intrínseco de sus ovarios debido a la presencia del cromosoma Y.

Por medio de técnicas de trasplante ortotópico de ovarios, en una primera etapa se sustituyeron los ovarios de las hembras B6.Ydom adultas por ovarios adultos XX y los de las hembras XY se injertaron en hembras normales ovariectomizadas. Después de la recuperación quirúrgica las hembras operadas se aparearon con machos B6.

Observamos que las hembras B6.Ydom con ovarios XX adultos, son capaces de mantener la gestación y la lactancia de las crías, lográndose porcentajes de fertilidad y lactancia de las crías de 60% y 88% respectivamente. En cambio las hembras B6 reeceptoras de ovarios Ydom adultos, no resultaron preñadas. Los cortes histológicos de los ovarios B6.Ydom adultos muestran que carecen de folículos casi totalmente y los existentes en su mayoría son folículos atrésicos.

La siguiente fase de este trabajo consistió en transplantar ovarios de etapas de desarrollo más tempranas, para saber si los ovarios B6.Ydom pueden llegar a ser fértiles si se desarrollan en un ambiente genotípicamente normal (XX). Sustituimos los ovarios de hembras B6.Ydom juveniles por ovarios XX infantiles y fetales e injertamos ovarios B6.Ydom infantiles y fetales en hembras B6 juveniles ovariectomizadas.

Observamos que los ovarios XX fetales e infantiles continúan su desarrollo en las hembras B6.Ydom después del trasplante y conjuntamente llegan a ser fértiles, lográndose porcentajes de fertilidad y de lactancia de crías hasta del 100%. En ningún caso observamos fertilidad en ovarios B6.Ydom transplantados a hembras normales B6. Dichos resultados permiten sugerir que la incapacidad reproductiva de la hembra B6.Ydom se debe a una alteración a nivel ovárico.

Concluimos que la esterilidad de las hembras B6.Ydom se debe a un defecto a nivel del ovario, probablemente debido a una alteración del ovocito debido a la presencia del cromosoma Ydom durante su maduración.

II. INTRODUCCIÓN.

2.1 DETERMINACIÓN SEXUAL EN LOS MAMÍFEROS

En los mamíferos la presencia del cromosoma Y (XY) es uno de los factores que determinan que un organismo se desarrolle como un macho, ya que la ausencia de este cromosoma determina que un organismo se desarrolle como una hembra (XX).

La presencia del cromosoma Y es necesaria para que se desarrolle un testículo a partir de la gónada indiferenciada. Actualmente se sabe que una pequeña región del brazo corto del cromosoma Y denominada SRY en humanos (Berta, et al. 1990) y Sry en otras especies de vertebrados (Koopman, et al. 1990), parece ser suficiente para iniciar los eventos morfogenéticos que culminan con la diferenciación testicular (Koopman, et al. 1991; Hawkins, et al. 1991). Por ello, para entender el papel que juega el cromosoma Y en este proceso, es importante conocer el patrón de diferenciación sexual a partir de una gónada sexualmente indiferenciada y por consiguiente el establecimiento del fenotipo sexual.

2.1.1 DIFERENCIACIÓN SEXUAL GONADAL Y FENOTÍPICA.

En los mamíferos, durante su etapa embrionaria se desarrolla una gónada sexualmente indiferenciada en la zona ventral del mesonefros. En el mesonefros se encuentran tanto el conducto de Müller como el conducto de Wolf, estructuras precursoras de órganos genitales internos femeninos y masculinos respectivamente. También los genitales externos se encuentran en una etapa indiferenciada y se les reconoce como el seno urogenital.

2.1.2 GÓNADA INDIFERENCIADA.

La gónada sexualmente indiferenciada está constituida por diferentes componentes celulares: células germinales primordiales de origen extraembrionario, células del epitelio celómico, células mesenquimáticas y células endoteliales que invaden la región urogenital.

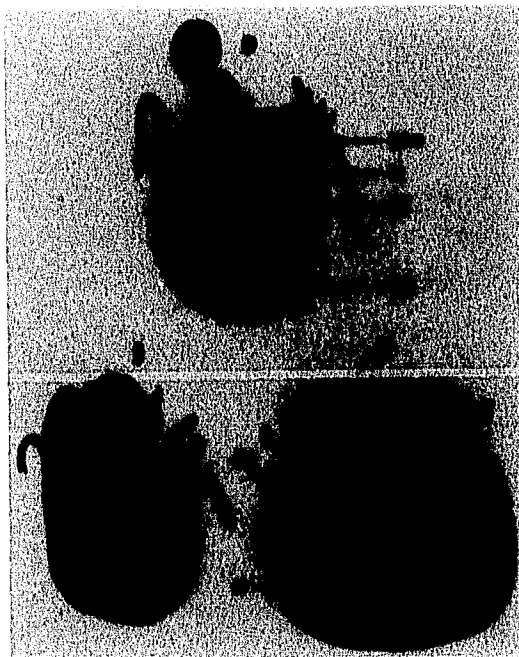
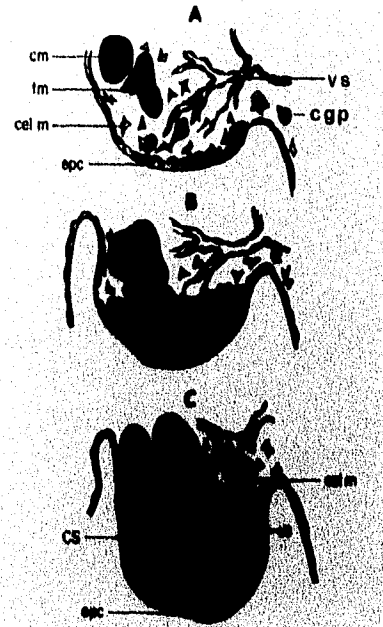
En el ratón a los 11 días postcoito (dpc) se establece este órgano debido a la colonización de la cresta gonadal por las células germinales primordiales y a la proliferación de células somáticas de la región urogenital que dan origen tanto a los cordones sexuales delimitados por una lámina basal como al tejido estromático. Ambos constituyen los elementos histológicos precursores del testículo o del ovario en las gónadas XY ó XX respectivamente (Merchant-Larios & Taketo, 1991) [Figura 1].

2.1.3 DIFERENCIACIÓN TESTICULAR.

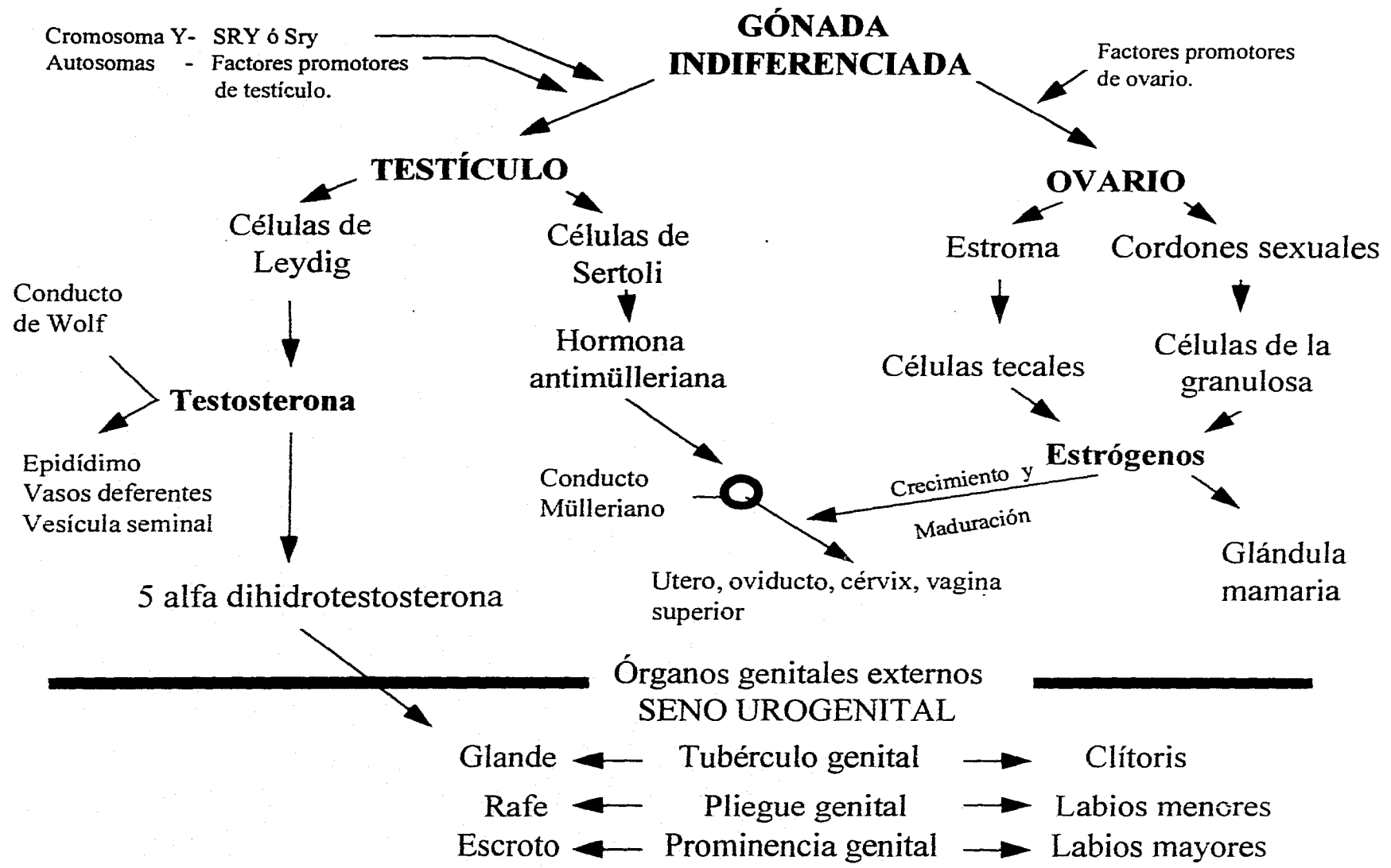
En el ratón a los 12 dpc, en los individuos que presentan el cromosoma Y (XY) la gónada indiferenciada inicia su diferenciación y se transforma en un testículo, donde los cordones sexuales son separados del epitelio celómico por una invasión gradual de tejido mesenquimático y células endoteliales desde la región mesonéfrica. De esta manera se forman los cordones seminíferos que están constituidos por células somáticas epiteliales o presertoli y proespermatogonias, mediante una organización de tipo epitelial separada del estroma por láminas basales. Las células de Leydig aparecen en el estroma después de la formación de los cordones seminíferos (Merchant-Larios & Taketo, 1991; Merchant-Larios, et al. 1993) [Figura 1].

Las células de Sertoli producen la hormona antimülleriana (Meusy-Dessolle & Josso, 1977) que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller. Los conductos de Wolf se desarrollan gracias a la estimulación inducida por la testosterona, hormona producida por las células de Leydig, dando lugar a los órganos genitales masculinos internos como: epidídimos, conductos deferentes y vesículas seminales. El desarrollo de los genitales externos a partir del seno urogenital es inducido por la 5 alfa-dihidrotestosterona, producto de la biotransformación de la testosterona [Figura 2].

FIGURA 1. Secuencia de eventos morfo-
genéticos de la diferenciación sexual
gonadal. A) Esquema de la cresta genital,
donde se muestran vasos sanguíneos (vs)
invadiendo la cresta genital, el conducto
mesonéfrico (cm), túbulos mesonéfricos
(tm), células mesenquimáticas (cel m), el
epitelio celómico o mesotelio (epc) y
células germinales primordiales (CGPs)
llegando a la cresta. B) En el ratón a los 10
días postcoito (dpc) se establece el blaste-
ma gonadal por una condensación de
células mesenquimáticas y mesoteliales
que rodean a las CGPs. C) A los 11 dpc se
establece la gónada indiferenciada
caracterizada por la formación de los
cordones sexuales (CS) constituidos por
células epiteliales que rodean a las CGPs;
los cordones están separados de las células
mesenquimáticas y vasos sanguíneos por
láminas basales.



D) A los 12 dpc, en los individuos XY se
forma el testículo por una invasión
gradual de mesénquima (cel m) y vasos
(vs), separando los cordones sexuales del
epitelio celómico (epc). E) En los indivi-
duos XX, a los 12 dpc, el ovario es semc-
jante a la gónada indiferenciada; sólo hay
un ligero crecimiento por la prolifera-
ción de células somáticas y CGPs. F) La
diferenciación del ovario se inicia cuando
las CGPs entran en meiosis (alrededor de
los 14 dpc) y se transforman en ovocitos
(ov) al ser individualizadas por las células
epiteliales para formar folículos (F)
[Merchant-Larios, 1991].



5 Figura 2. Diagrama de la secuencia de eventos que llevan a la formación de los fenotipos sexuales en los mamíferos. (Fuente: [Gilbert, 1994] y [Merchant, 1990]).

Las propuestas para explicar la diferenciación de la gónada se iniciaron con E. Witchi (1951), quien estableció la hipótesis del antagonismo corticomedular. Ésta supone la existencia de dos sustancias: la cortesina producida por la corteza y la medularina producida por la médula. De acuerdo al genotipo sexual, una de ellas se produce en mayor cantidad induciendo la proliferación de la región correspondiente e inhibiendo la región gonadal antagónica. Por lo tanto se forma un testículo si prolifera la región medular o un ovario al prevalecer la región cortical.

Esta hipótesis prevaleció hasta que fueron propuestos otros factores como responsables de la diferenciación sexual. Uno de ellos fue el antígeno de histocompatibilidad H-Y (Wachtel, et al. 1975) cuya expresión se pensó era exclusiva de los machos. Sin embargo, los resultados obtenidos de machos negativos o hembras positivas al antígeno (Johnson, et al. 1982) descartaron a éste como el producto directo de un gene determinante testicular.

Posteriormente se propuso al gene ZFY como el regulador de la síntesis del factor determinante testicular (TDF) (Hawkins, et al. 1991), sin embargo, diversas evidencias permitieron descartarlo como el regulador del TDF.

Una de ellas fue el descubrimiento de un gene de secuencia semejante en el cromosoma X (el ZFX). Con éste hallazgo surgió la hipótesis de que la diferenciación sexual dependía de cierta cantidad de genes, dosificada por la inactivación de un cromosoma X (Chandra, 1985; Ferguson-Smith, 1988). De acuerdo a esta hipótesis, los genes ZFY y ZFX producirían proteínas funcionalmente intercambiables. Las células XY tendrían dos copias activas de los genes, de manera que los embriones se desarrollarían como machos. Mientras que las células XX tendrían una copia debido a la inactivación de un cromosoma X y por lo tanto los embriones se desarrollarían como hembras. Sin embargo, al encontrarse que el ZFX escapa a la inactivación, dicha hipótesis se descartó (Schneider-Gädicke, et al. 1989). Por otra parte, en los marsupiales se encontró que las secuencias relacionadas al ZFY son de origen autosomal y que su patrón de expresión es ubiquo (Schneider-Gädicke, et al. 1989). Además en los ratones mutantes *We/We*, durante el desarrollo de los testículos se encontró que no se expresan los homólogos murinos del ZFY (*Zfy-1* y el *Zfy-2*) (Koopman, et al. 1989).

Finalmente se encontró un gene, denominado SRY en los humanos y *Sry* en el ratón, que reúne las propiedades genéticas y biológicas esperadas de un gene que genera un

producto protéico cuya acción es el primero o uno de los primeros eventos que ocurren para desencadenar toda la cascada de eventos que determinan la diferenciación testicular (Burgoyne, 1988). En los humanos, el gene consta de 35 Kilobases (Kb); sin embargo, en el ratón un pequeño fragmento de 14 Kb es suficiente para inducir la diferenciación testicular en individuos XX (Koopman, et al. 1991). Este gene se expresa entre los 10.5 y los 12.5 dpc (Koopman, et al. 1990), período en que se presenta la diferenciación testicular en esta especie.

2.1.4 DIFERENCIACIÓN DEL OVARIO.

A los 12 dpc, el ovario del ratón no presenta diferencias respecto a la estructura de la gónada indiferenciada. Sólo se aprecia un ligero crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y de las células germinales.

La diferenciación del ovario se inicia cuando las células germinales u ovogonias entran paulatinamente a la profase de la primera división meiótica (entre los 14 y 15 dpc). En el período perinatal los ovocitos, que se encuentran agrupados en el interior de los cordones sexuales, empiezan a ser separados por células epiteliales durante el proceso de foliculogénesis (Merchant-Larios & Chimal-Monroy, 1989; Merchant-Larios, 1991); las células epiteliales situadas alrededor de los ovocitos, adquieren una forma cúbica y tienden a separarlos dando lugar a los primeros folículos. También hay proliferación de tejido mesenquimático y vasos sanguíneos, los que van a constituir el estroma ovárico [Figura 1].

Por otra parte, mientras que los conductos de Wolf sufren una regresión por la falta de estimulación por la testosterona, los conductos de Müller se desarrollan dando lugar a los órganos genitales internos femeninos, aparentemente no se requiere ninguna estimulación para la diferenciación del tracto genital femenino, se ha observado que las gonadotropinas o el ovario no son necesarios para su diferenciación, a pesar que se han detectado receptores a estrógenos en los conductos Müllerianos de ratas fetales. Sin embargo, los estrógenos son necesarios para el crecimiento y desarrollo del tracto genital femenino (ver Byskov & Høyer, 1988). Los órganos genitales externos femeninos se desarrollan a partir del seno urogenital [Figura 2], aunque se desconocen los mecanismos que inician este proceso.

Hasta este momento describimos brevemente el proceso normal de diferenciación sexual en el ratón. Sin embargo, existen modelos biológicos del mismo género en los cuales dicho proceso de diferenciación sexual está alterado (Eicher & Washburn, 1983; Erickson, Durbin & Tres, 1987; Lovell-Badge & Robertson, 1990; Houle & Taketo, 1992; Capel, et al. 1993; Eicher, 1994).

En esta investigación, es de particular interés el modelo biológico murino denominado C57BL/6J.Ydom (B6.Ydom). En esta cepa de ratón, los individuos XY presentan alteraciones durante el proceso de diferenciación testicular, y como consecuencia de una reversión sexual el 50% de estos individuos se desarrollan como hembras fenotípicas.

2.2 EL RATÓN B6.Ydom.

Cuando el cromosoma Y de la especie de ratón silvestre *Mus musculus domesticus* (Ydom; Tirano, Italia) o *Mus poschiavinus* (Ypos; Poschiavo, Suiza) se introdujo al genoma de la cepa C57BL/6J (B6), todos los machos (B6.Ydom) de la primera generación (F1) resultaron normales. Pero en la progenie obtenida de la retrocruza* entre machos F1 y hembras B6, el cromosoma Ydom falla en la inducción de la diferenciación testicular normal y como resultado hay una reversión sexual parcial o completa de los individuos XY (Eicher, et al. 1982; Eicher & Washburn, 1986; Nagamine, et al. 1987)[Figura 3].

Particularmente, a partir de la sexta generación de retrocruza (F6), ningún individuo XY desarrolla testículos normales durante la vida fetal. Aproximadamente el 50% de los individuos desarrollan ovotestis, en los cuales hay diferenciación testicular ubicada en la zona central-medular, mientras que en sus regiones craneal y caudal, la organización morfológica corresponde a una diferenciación ovárica (Taketo-Hosotani, et al. 1989; Merchant-Larios & Taketo, 1991) [Figura 4]. En experimentos *in vitro* se encontró que

* Se establece la retrocruza cuando los individuos heterocigóticos, producto de una cruce, se aparean con una de las cepas parentales homocigóticas. Por ejemplo:

Cruza:	CC x aa	=	Ca + Ca	C= Carácter para el color
Retrocruza:	Ca x CC	ó	Ca x aa	a= Albino

los ovotestis fetales (14 y 16 dpc) producen cantidades de testosterona de acuerdo al radio de estructura testicular que poseen (Taketo-Hosotani, et al. 1989). Los niveles de testosterona en los individuos B6.Y^{dom} púberes son más bajos que en los individuos XY normales (Houle & Taketo, 1992). En algunos individuos se desarrolla una cantidad suficiente de tejido testicular que les permite llegar a ser fértiles una vez alcanzada su madurez sexual.

Por su parte, el otro 50% de los individuos XY, no presenta el proceso de diferenciación testicular, a pesar de la presencia del cromosoma Y y de la transcripción del Sry (Lee & Taketo, 1994). En este caso, la reversión sexual es total, ya que las gónadas se desarrollan como ovarios y los individuos se desarrollan como hembras fenotípicas (Eicher, et al. 1982; Eicher & Washburn, 1986; Taketo-Hosotani, et al. 1989) [Figura 3].

Una de las hipótesis propuestas para explicar la reversión sexual en esta cepa, es una posible incompatibilidad entre los genes del cromosoma Y^{dom} y genes del cromosoma X o genes autosómicos, lo que resulta en un retardo en el desarrollo testicular. Posiblemente algunos de los genes autosómicos involucrados en esta alteración, sean genes que están relacionados con la diferenciación sexual, como los denominados Tda-1 y Tda-2 (Testis-determining autosomal), que inducen la formación de tejido ovárico en individuos XY que presentan una supuesta condición homocigótica para dichos genes. Otro es el loci denominado Tas (T-associated sex-reversal), localizado en el cromosoma 17, cuya posible herencia o la supuesta delección de una o varias secuencias involucradas en la determinación sexual causa reversión sexual de los individuos XY (Eicher & Washburn, 1983; Washburn & Eicher, 1983; Eicher & Washburn, 1986; Erickson, Durbin & Tres, 1987; Nagamine, et al. 1987; Palmer & Burgoyne, 1991; Taketo, et al. 1991; Graves & Erickson, 1992; Eicher, 1994).

Laval y colaboradores (1995), proponen que la variación en el grado de reversión sexual entre diferentes cromosomas Y *domesticus* en el sistema C57BL/6J depende del número de copias de secuencias *Rbm* (familia de genes murinos homólogos a los RBM humanos, relacionados con el control de la traducción de RNA durante la espermiogénesis temprana). Ellos observaron que el nivel de expresión del Sry en la gónada de 11.5 dpc está relacionado con el número de secuencias *Rbm*.

Posteriormente, se encontró que los ratones *XYpos* sólo desarrollan tejido testicular cuando acarrean como transgene un alelo del Sry de *M. musculus* (Eicher, Shown & Washburn, 1995) y se ha propuesto que los responsables del desarrollo de tejido ovárico en la cepa C57BL/6J son el alelo Sry del cromosoma *Ypos* (de *M. domesticus poschiavinus*) o la región reguladora del Sry que presenta cambios en su secuencia (Coward, et al. 1994; Eicher, 1994; Graves & Erickson, 1995; Eicher, Shown & Washburn, 1995).

Precisamente, los individuos que únicamente producen tejido ovárico (hembras fenotípicas B6.*Ydom*) son nuestro modelo biológico a examinar en esta investigación, por lo tanto mencionaremos las características biológicas conocidas hasta el momento.

2.2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS HEMBRAS B6.*Ydom*.

Las hembras *XYdom* poseen ovarios bilaterales. En estudios microscópicos, se ha observado que sus ovarios presentan un desarrollo morfológicamente comparable a los ovarios XX hasta los 16 dpc, cuando muchas células germinales han alcanzado el estado de cigoteno o paquiteno de la primera profase meiótica.

A los 17 dpc, en la región medular de los ovarios XY, los ovocitos empiezan a degenerar; en los ovarios de 14 días postparto (dpp) sólo se aprecian los remanentes de cordones sexuales estériles, se desconocen las causas que inducen la degeneración de los ovocitos XY. Sin embargo, en su región cortical muchos ovocitos se desarrollan y forman folículos. En los ovarios XY de 28 dpp, muchos folículos de origen cortical ocupan la región medular (Taketo-Hosotani, et al. 1989).

Alrededor de las 8 semanas postparto (spp), los ovarios XY presentan pocos folículos de los cuales algunos logran ovular [Figura 5], a pesar de que se ha observado que las hembras carecen de un ciclo estral regular. Las hembras pueden ser apareadas con machos B6 normales, ya que presentan una conducta sexual aparentemente normal. Sus cigotos llegan a presentar división, sin embargo los embriones mueren durante el período de preimplantación cuando están entre los estados de 1 a 2 células y excepcionalmente alcanzan el estado de 8 células. Inclusive en experimentos realizados *in vitro*, los embriones ocasionalmente alcanzan el estado de 4 células (Merchant-Larios, et al. 1994).

Por otra parte, se sabe que en los ovarios fetales XY, se transcribe el gene Sry en el tiempo en que ocurre la transcripción del mismo en los testículos normales; sin embargo, la presencia de los transcritos de RNA mensajero del gene Sry persiste en los ovarios XY hasta el día 14 de gestación, 2 días más en comparación con los testículos normales cuyos transcritos de Sry desaparecen (Lee & Taketo, 1994). Además, a semejanza de lo que ocurre en los ovarios XX, en los ovarios fetales XY no se detectaron transcritos de los genes para la 3 β -hidroxiesteroi-deshidrogenasa (3 β -HSD) y la 17 alfa-hidroxilasa (17 alfa-HA) (Lee & Taketo, 1994), enzimas importantes en la producción de testosterona. De manera que los ovarios fetales XY no producen testosterona (Taketo-Hosotani, et al. 1989).

Durante el desarrollo postnatal, los ovarios XY presentan anomalías endócrinas. En el día 1 postparto, los niveles de producción de hormonas esteroideas (testosterona, estradiol y progesterona) no difieren con los niveles producidos por los ovarios XX; sin embargo, conforme avanzan en su desarrollo, los ovarios XY producen niveles menores de hormonas esteroideas que los ovarios XX (Villalpando, Nishioka & Taketo, 1993). Inclusive, la actividad de la 3 β -HSD presenta una distribución diferente en comparación con la de ovarios XX desde los 6 a los 60 dpp (Villalpando, Nishioka & Taketo, 1993). Se ha observado que un retardo en la expresión del gen IGF-I (Insulin Growth Factor-I, factor involucrado en la esteroidogénesis) tal vez sea la causa de la baja producción de esteroideas y de los problemas de fertilidad en las hembras B6.Ydom (Villalpando-Fierro, et al., 1996). Finalmente, se ha observado que las hembras B6.Ydom ovariectomizadas inician normalmente el ciclo estral luego del implante ectópico de ovarios XX (Taketo-Hosotani, et al. 1989).

Esto último es relevante, puesto que si las hembras experimentan cambios fisiológicos que las lleva a la regularización del ciclo estral cuando se les implantan injertos de ovarios ectópicos, entonces es esencial saber que ocurrirá si se les implantan injertos de ovarios de manera ortotópica.

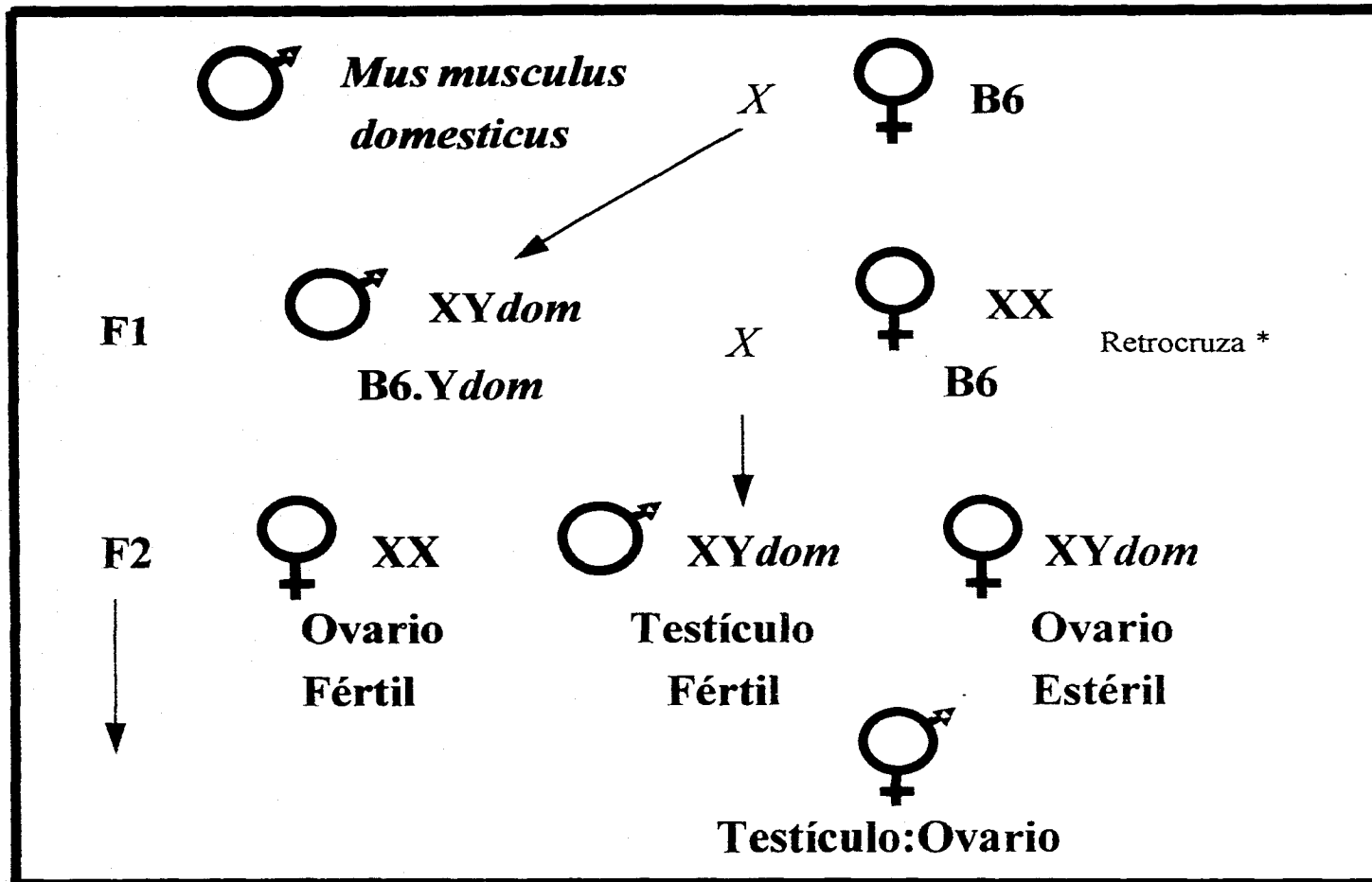


Figura 3. Diagrama sobre el origen del ratón C57BL/6J.Ydom (B6.Ydom) y las características fenotípicas de su progenie. El cromosoma Y de *M. m. domesticus* se continúa conservando mediante la retrocruza de machos XYdom fértiles con hembras C57BL/6J (B6).

* Se establece una retrocruza cuando el apareamiento del individuo heterocigótico se realiza con una de las cepas parentales homocigóticas.

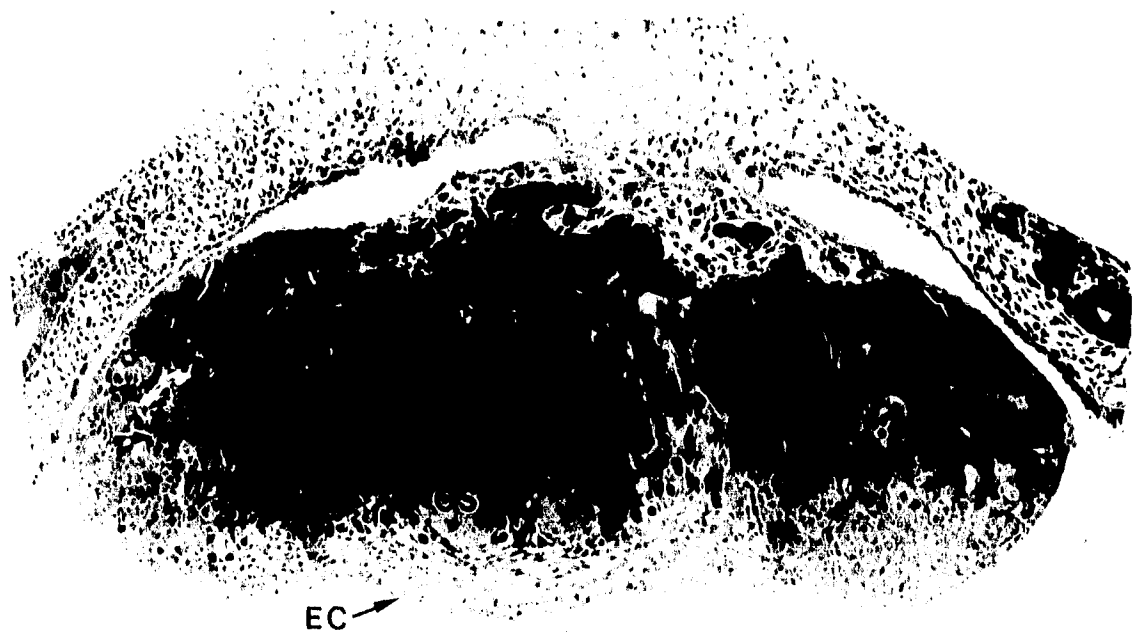


FIGURA 4. Corte longitudinal del ovotestis de un feto de ratón B6.Ydom de 14 días postcoito. En la región medular se aprecia la segregación de cordones seminíferos (cs) rodeados por abundante tejido mesenquimático (*) que a su vez los separa del epitelio celómico (ec), como ocurre en los testículos normales XY. En las regiones cranial y caudal se aprecia la estructura tisular propia del desarrollo de un ovario, donde los cordones gonadales (flechas) permanecen unidos al epitelio superficial como ocurre en los ovarios normales XX. 200x (Fuente: Merchant-Larios & Taketo, 1991).

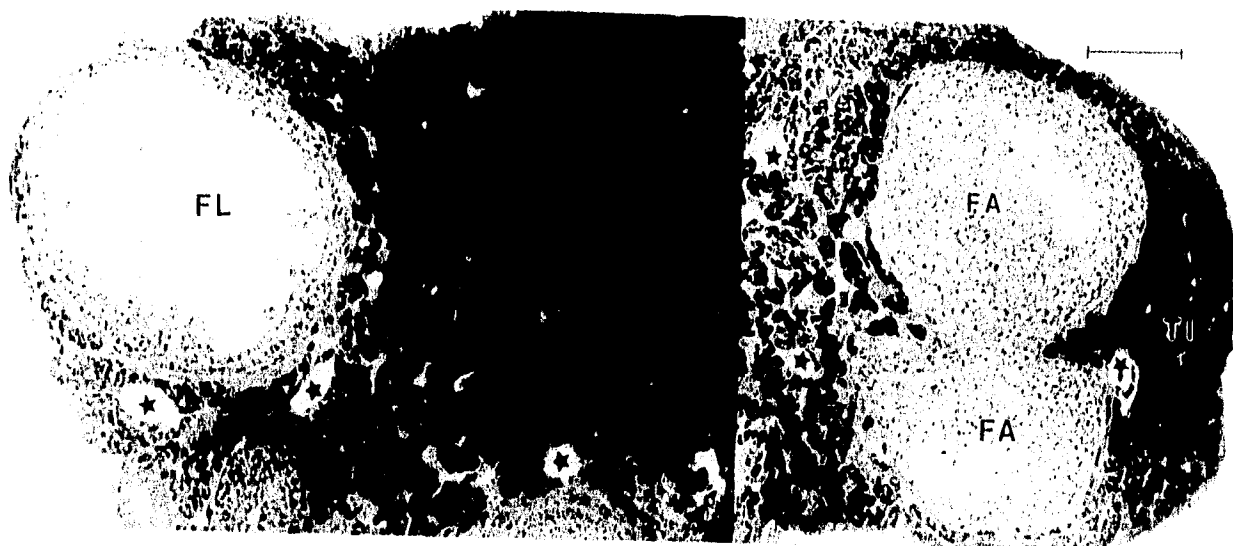


FIGURA 5. Corte longitudinal del ovario de una hembra B6.Ydom de 7 semanas postparto. En su mayor parte esta constituido por masas compactas de tejido intersticial (TI) irrigadas por vasos sanguíneos (VS). A la izquierda se observa un folículo preovulatorio (FL). Hacia la derecha se observan dos folículos que alcanzaron gran tamaño pero que han iniciado el proceso de atresia (FA). Nótese los numerosos remanentes de zonas pelúcidas de los ovocitos de folículos atrécicos (*). Segmento 100 μ m.

2.3 TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS.

El trasplante ortotópico de ovario es un procedimiento quirúrgico que se ha empleado como estrategia experimental para estudiar el comportamiento endócrino y la fertilidad de ovarios transplantados de un individuo donador, a la cápsula ovárica de un individuo receptor ovariectomizado (Robertson, 1940; Jones & Krohn, 1960).

Se ha empleado para estudiar el desarrollo y fertilidad de injertos ováricos transplantados en etapas tempranas (Russell & Douglass, 1945), además de analizar la sobrevivencia de los ovocitos (Jones & Krohn, 1960) y la morfología de los injertos en distintos períodos postquirúrgicos (Stevens, 1955; Parrott, 1958).

De esta manera, el trasplante ortotópico de ovarios es un procedimiento aplicable en estudios de tipo genético (Stevens, et al. 1957) y fisiológico (Palm, 1961), y se trata de un procedimiento experimental viable de gran utilidad para estudiar los factores que inducen la esterilidad en las hembras que presentan el cromosoma *Ydom*.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los ovarios de las hembras B6.Ydom presentan alteraciones en su desarrollo que se manifiestan con una mayor pérdida de ovocitos y una menor formación de folículos que los ovarios de las hembras B6 (XX) normales. En el estado adulto estas alteraciones se asocian con irregularidades del ciclo estral e infertilidad. Por otra parte, las hembras B6.Ydom muestran ciclos normales luego del implante ectópico de ovarios XX, a diferencia de las hembras normales que manifiestan ciclos estrales irregulares luego del implante ectópico de ovarios XYdom. Estos resultados permiten sugerir que el eje hipotálamo-hipófisis de la hembra XYdom es funcional pero sus ovarios probablemente carecen de una función endócrina adecuada. Sin embargo, también se ha observado que durante un período corto las hembras B6.Ydom logran ovular y sus ovocitos pueden ser fertilizados, por lo que la infertilidad pudiera deberse a una falla a otro nivel.

Quizás la capacidad funcional del eje hipotálamo-hipófisis de las hembras B6.Ydom sea insuficiente para mantener la gestación o tal vez existen alteraciones a nivel del tracto genital (oviducto, útero) que dificultan el desarrollo de los embriones.

Alternativamente, la presencia del cromosoma Ydom afectaría exclusivamente al ovario, afectando factores de tipo parácrino o autócrino o ambos, que alteran la capacidad de los ovocitos para desarrollar un embrión o el funcionamiento del cuerpo lúteo para mantener la gestación.

En este sentido, la aplicación del trasplante ortotópico de ovarios nos permitirá establecer que tan funcionales pueden ser los constituyentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y el tracto genital de la hembra B6.Ydom.

IV. HIPÓTESIS y OBJETIVOS.

De acuerdo al estado actual del conocimiento, el presente estudio pretende apoyar o refutar las siguientes hipótesis sobre la infertilidad de las hembras B6.Ydom:

4.1 HIPÓTESIS GENERAL.

En la hembra B6.Ydom la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis es suficiente para estimular la función del ovario XX de modo que la hembra sea fértil y lleve la gestación a término; en cambio el ovario Ydom está afectado de manera irreversible y no es funcional.

4.2 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.

- I.-** Las hembras B6.Ydom pueden ser fértiles al sustituirse sus ovarios XYdom con injertos de ovarios adultos XX.
- II.-** Los ovarios B6.Ydom adultos pueden ser funcionales cuando son transplantados a una hembra B6 normal.
- III.-** Las hembras B6.Ydom pueden ser fértiles con injertos de ovarios XX desarrollados desde etapas más tempranas.
- IV.-** Los ovarios B6.Ydom transplantados en etapas tempranas pueden desarrollarse en una hembra B6 normal y llegar a ser funcionales.

4.3 OBJETIVO GENERAL.

Establecer si la presencia del cromosoma Y en la hembra B6.Ydom afecta de manera irreversible la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis y del ovario.

4.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- I.-** Determinar si las hembras B6.Ydom pueden ser fértiles al sustituirse sus ovarios XYdom con injertos de ovarios adultos XX.
- II.-** Observar si los ovarios B6.Ydom adultos pueden ser funcionales cuando son transplantados a una hembra B6 normal.
- III.-** Establecer si las hembras B6.Ydom pueden ser fértiles con injertos de ovarios XX desarrollados desde etapas más tempranas.
- IV.-** Observar si los ovarios B6.Ydom transplantados en etapas tempranas pueden desarrollarse en una hembra B6 normal y llegar a ser funcionales.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1 ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES.

Mediante técnicas microquirúrgicas se efectuaron trasplantes ortotópicos de ovario, abordando las siguientes estrategias:

A. TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS ADULTOS.

a.1) Ovarios XX de hembras B6 adultas se injertaron de manera unilateral y bilateral en hembras XY (B6.Ydom) receptoras. [Figura 6]; en los casos de trasplante unilateral se dejó intacto un ovario XYdom local.

a.2) Ovarios XY de hembras B6.Ydom juveniles y adultas se injertaron en las mismas condiciones en hembras XX (B6) receptoras [Figura 6]; en los casos de trasplante unilateral se extirpó el ovario contralateral.

Para la realización de trasplantes ortotópicos con ovarios infantiles y fetales abordamos las siguientes estrategias:

B. TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS INFANTILES.

b.1) Ovarios infantiles XX se injertaron en hembras receptoras tanto B6 como hembras B6.Ydom [Figura 7] de manera bilateral y unilateral. Cuando se realizó el trasplante unilateral en las hembras B6 se extirpó su ovario contralateral y en las hembras B6.Ydom se dejó intacto el ovario local contralateral.

b.2) Ovarios infantiles XYdom se injertaron en hembras B6 únicamente; se realizaron tanto trasplantes bilaterales como unilaterales y en este último caso se extirpó el ovario local contralateral de la hembra receptora [Figura 7].

C. TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS FETALES.

c.1) Ovarios fetales XX se injertaron en hembras receptoras tanto B6 como B6.Ydom [Figura 7] de manera bilateral y unilateral. Cuando se realizó transplante unilateral en las hembras B6 se extirpó el ovario contralateral y en las hembras B6.Ydom se dejó intacto un ovario local.

c.2) Solamente se injertaron ovarios fetales XYdom en hembras B6; los transplantes fueron unilaterales, por lo que se extirpó el ovario local contralateral de la hembra receptora. [Figura 7].

Transplante ortotópico de ovarios adultos.

Intercambio de ovarios entre hembras adultas.

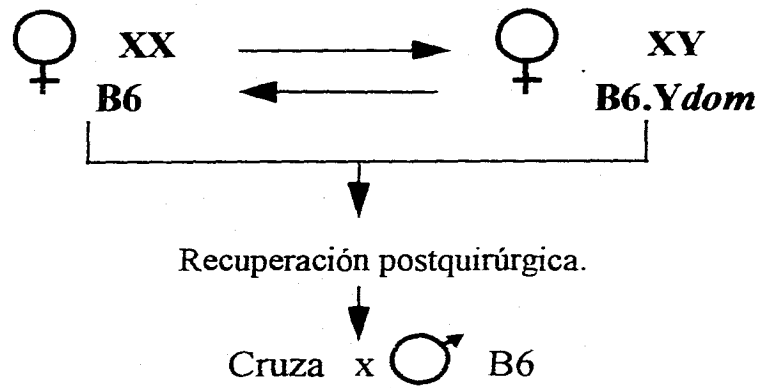


Figura 6. Modelo experimental del transplante ortotópico de ovarios adultos entre hembras XX (B6) y hembras XY (B6.Ydom).

Transplante ortotópico de ovarios infantiles y fetales.

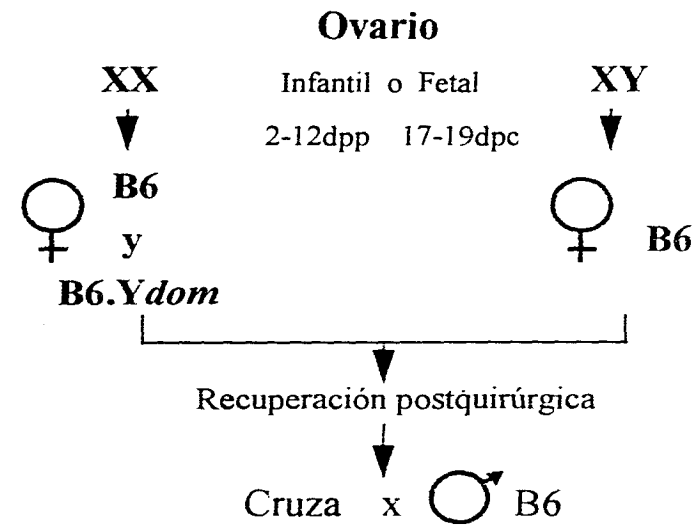


Figura 7. Modelo experimental del transplante ortotópico de ovarios infantiles y fetales en hembras XX (B6) y hembras XY (B6.Ydom).

5.2 Producción de ratones B6.Ydom.

Los ratones B6.Ydom de las generaciones de retrocruza N19-23 que poseen el genoma B6 y el cromosoma Y del ratón doméstico *Mus musculus domesticus* (Tirano, Italia) se prepararon de la siguiente forma:

Cada macho B6.Ydom se colocó en una jaula con dos hembras B6 y se observaron periódicamente, registrándose la preñez, el alumbramiento y las crías lactantes. Una vez terminado el periodo de lactancia (alrededor de 3 semanas), los machos fenotípicos son seleccionados para utilizarse en las siguientes retrocruzas, de esta manera se mantiene constantemente la cepa (Nagamine, et al. 1987) [Figura 3].

Se identificó el sexo genético de las hembras fenotípicas mediante hibridación de muestras sanguíneas empleando una sonda de DNA 1.5 Kb, denominada 145SC5. Este fragmento corresponde a una secuencia repetida en el cromosoma Y, la cual es muy efectiva para discriminar machos de hembras ya que es específica del cromosoma masculino (Nishioka, 1988).

A cada una de las hembras (1 a 2 semanas postparto) se le extrajo sangre mediante punción en la zona antero-ventral de la cola, se tomaron de 2 a 3 µl de tejido sanguíneo por medio de una micropipeta graduada, mismos que se colocaron en filtros de membrana (Gene Screen, New England Nuclear) adecuadamente identificados.

Se identificó el sexo genético de las hembras fenotípicas infantiles y fetales mediante hibridación de muestras de sangre empleando la misma sonda de DNA 145SC5 que identifica la presencia del cromosoma Y.

5.2.1 Hibridación con la sonda de DNA, 145SC5.

Los filtros se introdujeron en una pequeña bolsa plástica conteniendo Formamida al 50%, 0.5% Dodecilsulfato de Sodio (SDS), 1 M de NaCl y 5% de Sulfato de Dextran. Una vez cerrada la bolsa herméticamente, se incubó en baño María a 42°C con agitación constante durante 2 a 3 horas. Posteriormente se adicionó DNA (145SC5) marcado con Fósforo radiactivo (^{32}P) y se continuó la incubación por 16 a 20 horas. Los filtros se lavaron tres veces en una solución 0.1x de citrato de sodio complementado con cloruro de

sodio [SSC] (SSC 1x esta compuesto por 0.15 N de NaCl y 0.015 N de Citrato-Na) y 0.5% de SDS a 50°C durante 45 minutos cada lavado. Los filtros se expusieron a películas radiográficas (Fuji RX), incubándose a -70°C durante 8 a 16 horas. **

5.2.2 Obtención de ratones fetales e infantiles B6. *Ydom*.

Para la obtención de ratones fetales e infantiles, cada ratón macho B6. *Ydom* (50-150 días postparto, dpp) se colocó con tres hembras B6 (50-60 dpp). La presencia del tapón de copulación en la vagina se examinó cada mañana entre las 9:00 y 11:00 AM. El día en que se encontró el tapón de copulación se definió como día cero postcoito y se seleccionaron los fetos en los días 17 a 19 dpc. El día de nacimiento de las crías se definió como día cero postparto, con esta referencia se seleccionaron los ratones en edad infantil de 2 a 12 días postparto.

5.2.3 Obtención de ratones fetales, infantiles y adultos de la cepa B6.

Cada macho B6 (50-150 spp) se colocó con tres hembras B6 (50-60 dpp). La presencia del tapón de copulación en la vagina se examinó cada mañana entre las 9:00 y 11:00 AM. El día en que se encontró el tapón de copulación se definió como día postcoito cero; se seleccionaron los fetos en los días 17 a 19 dpc. El día de nacimiento de las crías se definió como día cero postparto y se seleccionaron los ratones en edad infantil de 2 a 12 dpp, así como los juveniles y los adultos.

**Esta técnica se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Yutaka Nishioka. Department of Biology, McGill University, Montreal, Canadá.

5.3 TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS.

A) PREPARACIÓN DE LOS INJERTOS DE OVARIO.

Las hembras B6 (42-63 dpp) y B6.Ydom (21-80 dpp) donadoras se sacrificaron con éter, sus ovarios se disecaron liberándolos de la cápsula ovárica y lo más limpio posible de tejido adiposo, y se mantuvieron en una caja de Petri con Medio L-15 1x (Leibovitz's [L-15 Medium], Gibco, BRL), complementado con 200 UI/ml de penicilina G sódica y 200 µg/ml de Sulfato de estreptomicina, hasta el momento de ser injertados.

Con respecto a las hembras fetales (17-19 dpc) e infantiles (2-12 dpp) donantes, sus ovarios se disecaron íntegramente de la cápsula ovárica y se mantuvieron en una caja de Petri con Medio L-15 1x (Leibovitz's [L-15 Medium], Gibco, BRL) complementado con 10% de Suero Bovino Fetal (Sigma, USA), 200 UI/ml de penicilina G sódica, y 200 µg/ml de sulfato de estreptomicina, hasta el momento de ser injertados.

B) PROCEDIMIENTO OPERATIVO DEL TRANSPLANTE.

Las hembras B6 y B6.Ydom receptoras se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (dosis: 1 ml/100 g de peso corporal, de una solución al 3.5% de hidrato de cloral disuelto en una solución al 0.9% de NaCl [Chloral Hydrate C-IV. Lab. Grade. Fisher Scientific Co. USA.]). Ambos costados dorsolaterales del ejemplar se rasuran a la altura de la ubicación interna de los ovarios, el ratón se coloca sobre una almohadilla de algodón o gasa en posición ventro-dorsal. La piel se frota con una solución antiséptica de benzal-alcohol 70% en proporción 1:1 (Benzal Concentrate. Terrier, México) [Figura 8, Fase I].

Se realiza un incisión dorsolateral de aproximadamente 1 cm de longitud a través de la piel y del tejido subcutáneo de la región lumbar en ambos lados de la línea media. Frecuentemente se puede observar el ovario a través de los músculos abdominales, en los que se hace una pequeña incisión evitando los vasos sanguíneos justo en la posición donde se encuentra el ovario. Utilizando pequeñas pinzas se sujeta el tejido adiposo que rodea al ovario y éste se expone al exterior de la pared abdominal para fijarlo, con ayuda de pequeños forceps dentados, en una posición cómoda que permita realizar el siguiente paso de la operación [Figura 8, Fase II]. Así, la cápsula ovárica debe quedar expuesta hacia el operador, el tejido adiposo queda por arriba y el oviducto por debajo de la posición del ovario [Figura 8, Fase III].

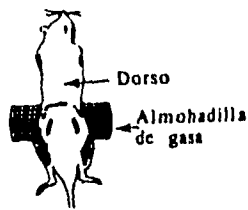
Empleando un estereomicroscopio (Nikon SMZ-2T, oculares 10x/23 y aumentos hasta de 63 veces el tamaño real), con pequeñas tijeras curvas de iridectomía se hace una pequeña incisión en la cápsula ovárica [Figura 8, Fase IV], de manera que se pueda desnudar al ovario para exponerlo totalmente.

Con la cápsula ovárica desplazada y plegada hacia un lado para evitar dañar la bolsa que ésta forma, el ovario expuesto se separa cuidadosamente del tejido adiposo adyacente y se seccionan los vasos y nervios hiliares con ayuda de las tijeras de iridectomía [Figura 8, Fase V]. Una vez diseccionado el ovario y detenido la hemorragia de los vasos hiliares seccionados, empleando un poco de gelfoam [Upjohn, USA] o algodón [Figura 8, Fase VI], el injerto es introducido a través de la incisión en la cápsula ovárica de manera que quede ubicado en su interior [Figura 8, Fase VII].

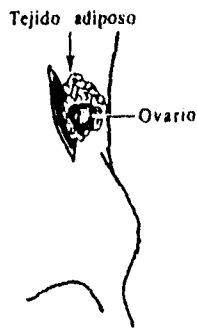
Para asegurar que el ovario permanezca dentro de la bolsa se realizan pequeñas suturas en la incisión hecha en la cápsula ovárica, empleando hilo de plástico inerte muy delgado (Prolene 7-0, Ethicon) [Figura 8, Fase VIII]; de esta manera los tejidos y órganos pueden ser introducidos a la cavidad abdominal sin riesgo de que el injerto sea expulsado por la abducción al reacomodarse los órganos manipulados. También la incisión realizada en la pared abdominal es cerrada por medio de suturas con el mismo material y la incisión de la piel se cierra con suturas de hilo de algodón [Figura 8, Fase IX] (Stevens, et al. 1957; Jones & Krohn, 1960; Palm, 1961).

En todo momento se aplican baños de solución salina (0.9% NaCl) tibia para evitar la desecación de los órganos y la obstrucción visual provocada por la hemorragia.

En el caso del trasplante de ovarios adultos, únicamente injertamos 1/2 ovario (Stevens, et al. 1957), de esta forma es más fácil introducir los ovarios XX a la bolsa ovárica de las hembras B6.Ydom que albergaban un ovario más pequeño. Los ovarios infantiles y fetales fueron introducidos íntegramente a la cápsula ovárica de las hembras receptoras.



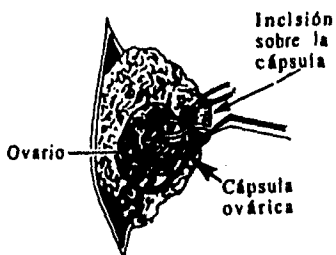
I. Colocación del ejemplar en posición normal sobre una almohadilla de gasa. Se realizan dos incisiones dorsolaterales a través de la piel y tejidos subcutáneos.



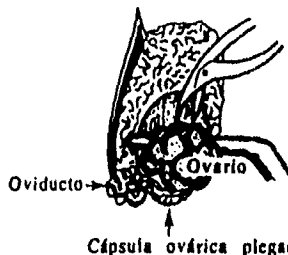
II. Incisión en los músculos y peritoneo; exposición del ovario y tejido adiposo adyacente.



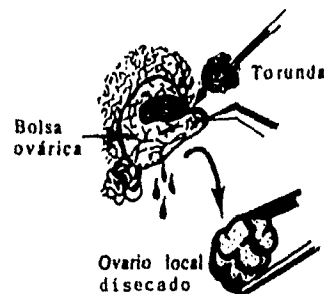
III. Ilustración que indica (←) el sitio de la incisión sobre la cápsula ovárica.



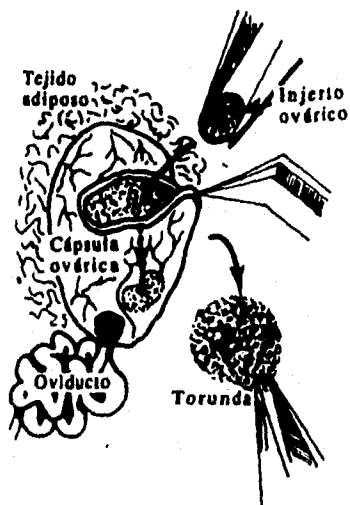
IV. Realización del corte en la cápsula ovárica con tijeras de iridectomía. Se aprecia la forma de bolsa de la cápsula. El ovario local se descubre para que quede directamente expuesto al operador.



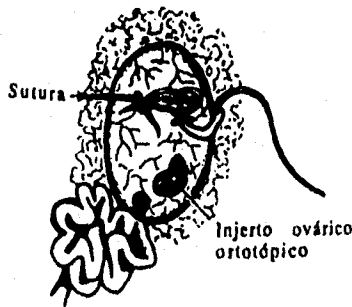
V. Disección del ovario, separándolo del tejido adiposo y seccionando los vasos hiliares con tijeras de iridectomía.



VI. La hemorragia es detenida con pequeñas torundas de material absorbente introducidas en la bolsa ovárica.



VII. Se extrae la torunda y se introduce el injerto ovárico al interior de la cápsula.

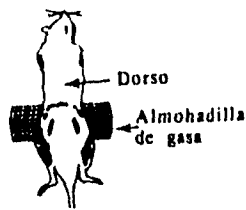


VIII. Se cierra la incisión de la cápsula ovárica por medio de suturas de hilo muy delgado. Los órganos se introducen a la cavidad abdominal.

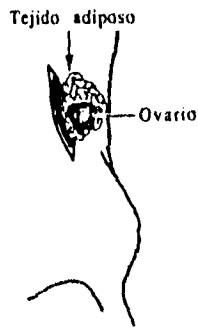


IX. Se suturan las incisiones de los músculos de la pared abdominal y la piel. Finalmente se aplica solución antiséptica para evitar infecciones postquirúrgicas.

FIGURA. 8. Fases del procedimiento quirúrgico para el trasplante ortotópico de ovario en el ratón. (Marmolejo-Valencia, J. A., modificado de Robertson, 1940 y Jones & Krohn, 1960).



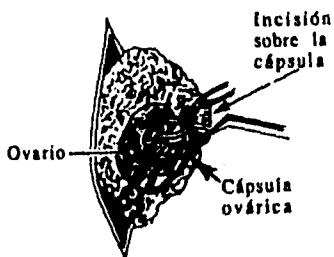
I. Colocación del ejemplar en posición normal sobre una almohadilla de gasa. Se realizan dos incisiones dorsolaterales a través de la piel y tejidos subcutáneos.



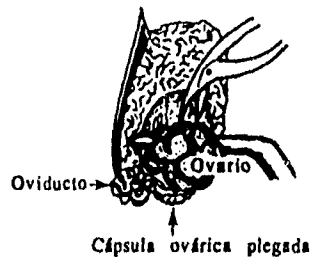
II. Incisión en los músculos y peritoneo; exposición del ovario y tejido adiposo adyacente.



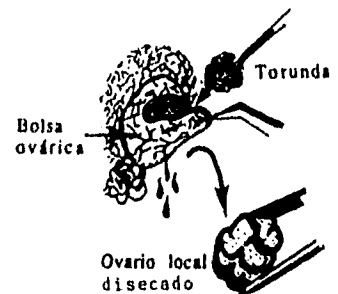
III. Ilustración que indica (←) el sitio de la incisión sobre la cápsula ovárica.



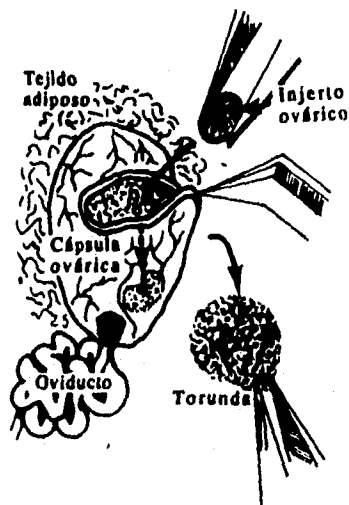
IV. Realización del corte en la cápsula ovárica con tijeras de iridectomía. Se aprecia la forma de bolsa de la cápsula. El ovario local se descubre para que quede directamente expuesto al operador.



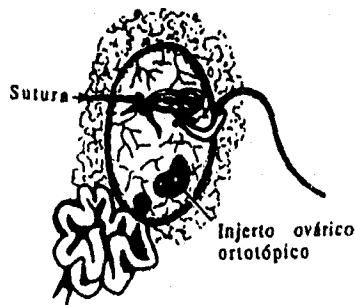
V. Disección del ovario, separándolo del tejido adiposo y seccionando los vasos hiliares con tijeras de iridectomía.



VI. La hemorragia es detenida con pequeñas torundas de material absorbente introducidas en la bolsa ovárica.



VII. Se extrae la torunda y se introduce el injerto ovárico al interior de la cápsula.



VIII. Se cierra la incisión de la cápsula ovárica por medio de suturas de hilo muy delgado. Los órganos se introducen a la cavidad abdominal.



IX. Se suturan las incisiones de los músculos de la pared abdominal y la piel. Finalmente se aplica solución antiséptica para evitar infecciones postquirúrgicas.

FIGURA. 8. Fases del procedimiento quirúrgico para el trasplante ortotópico de ovario en el ratón. (Marmolejo-Valencia, J. A., modificado de Robertson, 1940 y Jones & Krohn, 1960).

5.4 DIFICULTADES QUIRÚRGICAS INMEDIATAS.

1) La primera dificultad quirúrgica se presenta cuando se realiza la incisión en la cápsula ovárica. Cuando el corte resulta demasiado pequeño es difícil desnudar un ovario demasiado grande y a pesar de que la cápsula ovárica tiene cierta elasticidad, ésta se puede rasgar al forzar la salida del ovario. Una incisión demasiado grande dificulta el manejo de la cápsula ovárica al intentar mantener el injerto dentro de la bolsa aún con la aplicación de suturas para cerrarla, los implantes pueden ser expulsados debido al efecto de succión que se produce al reintroducir los órganos en la cavidad abdominal.

2) La principal dificultad radica en el control de la hemorragia que se produce al seccionar los vasos hiliares del ovario. Esto se puede minimizar aplicando un trozo de material absorbente (gelfoam) directamente en la bolsa ovárica y al aplicar solución salina tibia y una ligera presión con torundas de algodón sujetadas por medio de pinzas. Es esencial detener la hemorragia antes de introducir el injerto de ovario en la cápsula ovárica, pues si ésta continúa, cuando se cierra la incisión la cápsula se distiende y puede volver a abrirse o en todo caso puede formarse un coágulo que obturará el oviducto o impedirá la implantación y desarrollo del injerto.

3) Una vez una que se introdujo el injerto, la incisión hecha en la cápsula ovárica fue cerrada con hilo Prolene 7-0 (Ethicon), que es un material plástico inerte. En el caso de los implantes adultos, el manejo de suturas no presentó mayores dificultades, pero con los injertos de menor tamaño la suturación se dificulta, ya que un exceso de tensión en la cápsula puede provocar la obturación del oviducto o una disminución del espacio que puede impedir el adecuado desarrollo del injerto.

5.5 APAREAMIENTO DE LOS ANIMALES OPERADOS.

Después de un período de 10 a 20 días de recuperación (Palm, 1961), las hembras operadas se colocaron con un ratón macho (B6) y se observaron periódicamente [Figuras 6 y 7]. Las hembras que presentaban indicios de preñez o alumbramiento, eran aisladas y observadas periódicamente, tomando notas y fechas sobre cualquier evento ocurrido durante su observación (día del alumbramiento, número de crías nacidas, crías muertas, crías destetadas).

Las hembras que no presentaban señales de preñez se mantuvieron junto con el macho dentro de un período de 2 a 5 meses. Posteriormente a todas las hembras se les realizó una autopsia.

5.6 AUTOPSIAS.

La autopsia de las hembras operadas se realizó inmediatamente después de que se presentaron las siguientes condiciones: **i)** cuando la hembra presentó el proceso de parto y las crías habían muerto, **ii)** cuando las crías sobrevivientes alcanzaron la edad de destete (3 semanas) y **iii)** cuando las hembras no resultaron preñadas.

Durante la autopsia se hicieron observaciones acerca del estado físico de los órganos que fueron manipulados durante la operación, como por ejemplo: estado de implantación y desarrollo del ovario injertado, integridad de la cápsula ovárica, presencia de coágulos producidos por hemorragia postquirúrgica, integridad del oviducto o si hubo regeneración de tejido ovárico local que no haya sido extirpado.

5.7 REIDENTIFICACIÓN DEL GENOTIPO DE LOS INJERTOS DE OVARIO.

Con el propósito de verificar si hubo regeneración de tejido ovárico local y si el injerto evolucionó adecuadamente, se reconfirmó el sexo genético de los ovarios adultos en las hembras operadas. Una pequeña pieza de cada ovario se homogeneizó individualmente en 30 μ l de amortiguador Set (Set Buffer: EDTA 5 mM en TRIS 10 mM, pH 8.0), empleando dos laminillas portaobjetos. Con micropipetas graduadas se tomaron 2 μ l de cada uno de los homogenados y se colocaron en filtros de membrana (Gene Screen, New England) adecuadamente identificados. El sexo genético de cada uno de los ovarios se determinó según la técnica descrita anteriormente (Nishioka, 1988).

5.8 MICROSCOPIA.

Para el análisis histológico los ovarios se fijaron con solución de Karnovsky, (1965) sin Ca^{++} (pH 7.4), se postfijaron con una solución de tetróxido de Osmio [1% OsO_4 en amortiguador de Zetterqvist, (Zetterqvist, 1956)] y se incluyeron en epon 812. Se obtuvieron cortes semifinos de 1 μ m de grosor con ultramicrotomo Nova (LKB, Bromma) y se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes fueron observados al microscopio óptico (Nikon HFX-DX).

VI. RESULTADOS.

6.1 HIBRIDACIÓN CON LA SONDA DE DNA 145SC5 (*dot hybridization*).

En la Figura 9 presentamos un ejemplo de la hibridación con la sonda de DNA 145SC5, en muestras de sangre de ratones descendientes de la siguiente cruce (machos B6.Ydom x hembras B6). El tejido sanguíneo (2-3 μ l) dió como resultado puntos intensos cuando se trataba de hembras que presentaban el cromosoma Y (B6.Ydom) y puntos poco notables o ninguna marca cuando se trataba de hembras XX. En el caso de las muestras de sangre de individuos fetales o infantiles los individuos con ovotestis uni o bilateral dieron resultados exclusivamente positivos.

Con respecto a la reidentificación del genotipo de los implantes adultos, los resultados correspondieron con el genotipo de la hembra donadora identificada inicialmente; es decir, los homogenados de ovarios XY dieron resultado positivo a la sonda mientras que los homogenados de ovarios XX fueron negativos.

6.2.1 A. TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS ADULTOS.

a.1. Hembras B6.Ydom con injertos de ovarios XX.

Con respecto a las hembras B6.Ydom receptoras de ovarios XX adultos, los resultados fueron positivos tanto en trasplantes unilaterales como bilaterales [ver genotipo ovárico Tabla 1].

La edad de los ovarios XX al momento del trasplante fue de 6 a 9 spp y su edad al momento del alumbramiento fue de 11 a 18 spp [Tabla 1]. Si a la edad de cada implante durante el parto le descontamos 3 semanas que es el tiempo aproximado de gestación en el ratón, más la edad del injerto durante el trasplante, obtenemos el tiempo postimplante en que los injertos manifestaron su función en las hembras Ydom receptoras. Por ejemplo, en la hembra 14 B6.Ydom [Tabla 1], la edad del implante en el parto es de 12 spp. Descontando 3 semanas de la gestación más 7 spp de edad del injerto en el trasplante, obtenemos una diferencia de 2 semanas. Esto significa que el implante XX en la hembra 14 B6.Ydom manifestó su función a las 2 semanas postimplante (spi). Por lo tanto, el tiempo que tardaron los implantes adultos en manifestar su función en las hembras Ydom varió de 2 a 8 spi.

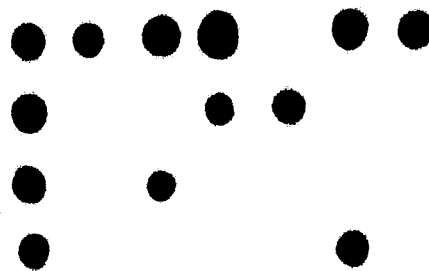
De 15 hembras operadas 9 resultaron preñadas (60%) y presentaron proceso de parto. El promedio de crías nacidas fue de 5.6 crías/camada y se obtuvo una producción de 56 crías en total [ver Tabla 9].

De las 9 hembras, 8 (88%) mantuvieron crías durante todo el período de lactancia cuyo número varió de 2 a 7 crías destetadas/camada [Tabla 1]. Hubo un sólo caso en que apareamos dos veces a una de las hembras (hembra B6. *Ydom* No. 65 [Tabla 1]) y en ambas ocasiones produjo camadas.

a.2. Hembras XX (B6) con injertos de ovarios B6. *Ydom* .

Las hembras B6 receptoras de ovarios XY adultos en ningún caso resultaron preñadas [Tabla 2] a pesar de que permanecieron con el ratón macho hasta 10 semanas después de la recuperación quirúrgica.

Los resultados de la autopsia mostraron que en las hembras hubo una recuperación adecuada de los órganos genitales manipulados durante la cirugía; las cápsulas ováricas, oviductos e injertos ováricos presentaban un estado físico íntegro.



58	59	60	61	62	63	64
65	66	67	68	69	70	71
72	73	74	75	76	77	78
79	80	81	82	83	84	85
86	87	86	87	88	89	43
44	47	48	49	50		

FIGURA. 9. Hibridación con la sonda de DNA 145SC5 marcada con ^{32}P (*dot hybridization*). La sonda corresponde a secuencias repetidas que constituyen parte del cromosoma Y. La prueba se realizó en 2-3 μl de sangre de hembras obtenidas de la cruce entre ♀ B6 x ♂ B6.Y $_{dom}$. Los círculos densos corresponden a hembras XY.

TABLA. 1. TRANSPLANTE DE OVARIOS XX ADULTOS EN HEMBRAS B6.Ydom*.

Hembra B6.Ydom* No.	Genotipo Ovárico *		Edad del ovario XX		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (spp)	Parto (spp)	
•14	XX	XYdom	7	12	5 d
•14'	XYdom	XX	6	11	6(2† + 4d)
•17	XX	XYdom	8	14	3 †
58	XX	XX	7	13	7(2† + 5d)
63	XX	XX	7	13	5 d
65	XX	XX	7	16 ; 20	6† ; 6(4† + 2d)
84	XX	XX	7	18	3 d
•90	XX	XYdom	7	14	8(4† + 4d)
•91	XYdom	XX	9	17	7 d

TABLA. 2. TRANSPLANTE DE OVARIOS XYdom*ADULTOS EN HEMBRAS B6.

Hembra B6 No.	Genotipo Ovárico *		Edad del ovario XYdom		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (spp)	Autopsia (spp)	
1	XYdom	XYdom	7	18	-
3	XYdom	XYdom	9	20	-
•5	∅	XYdom	11	14	-
6	XYdom	XYdom	3	9	-
7	XYdom	XYdom	3	9	-
8	XYdom	XYdom	3	12	-
9	XYdom	XY dom	3	10	-

*. Determinado con la sonda 145SC5; spp, Semanas postparto;

•, Transplante unilateral; d, Destete; †, Crías muertas;

∅, Ovariectomizado.

Tabla. 1: La edad de las hembras receptoras fue de 7 a 11 spp.

Producción: 9 hembras fértiles; 8 destetes (88%);

Tasa de nac.: 5.6 crías/camada.

Tabla. 2: La edad de las hembras receptoras fue de 7 spp.

6.2.2 B. TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS INFANTILES.

b.1. Hembras XX (B6) receptoras de ovarios XX.

En las hembras B6 receptoras de ovarios infantiles XX, los resultados fueron positivos tanto en trasplantes unilaterales como bilaterales [ver genotipo ovárico Tabla 3]. La edad de los injertos de ovarios al momento del alumbramiento varió de 7 a 11 semanas postparto (spp) [Tabla 3]. Descontando su edad al momento del trasplante y el tiempo de gestación obtenemos que los injertos comenzaron a ser fértiles de 2.7 a 7.8 spi, cuando la edad de los injertos estaba entre 4.1 y 8.1 spp.

De 15 hembras operadas 10 (66.6%) resultaron preñadas, la tasa de nacimientos fue de 3.2 crías/camada, con una producción total de 32 crías [ver Tabla 9]. Únicamente en 3 casos (30%) las crías fueron mantenidas durante la lactancia, el número varió de 2 a 6 crías destetadas/camada [ver Tabla 3]. En un caso hubo reabsorción de los embriones y en otro los fetos sólo alcanzaron la edad de 16 dpc debido a que la hembra se enfermó.

b.2. Hembras B6.Ydom receptoras de ovarios XX.

En hembras B6.Ydom receptoras de ovarios infantiles XX, los resultados fueron positivos en trasplantes unilaterales y bilaterales [ver genotipo ovárico Tabla 4]. La edad de los implantes durante el parto varió de 7 a 11 spp [Tabla 4], si descontamos el tiempo de gestación y la edad del injerto durante el trasplante, obtenemos que los injertos comenzaron a ser fértiles de 2.5 a 6.7 spi, cuando su edad estaba entre 5.7 y 8 spp.

Observamos preñez en 4 de 5 hembras operadas (80%), obteniéndose una tasa promedio de nacimientos de 5.2 crías/camada y una producción de 21 crías en total [Tabla 9]. En los 4 casos (100%) las crías fueron mantenidas todo el período de lactancia, destetándose de 2 a 7 crías/camada [Tabla 4].

b.3. Hembras XX (B6) receptoras de ovarios B6.Ydom.

En hembras B6 receptoras de ovarios XY infantiles, ninguna de las hembras resultó preñada [Tabla 5], a pesar de que permanecieron con el ratón macho hasta 9 semanas después de su recuperación quirúrgica.

Durante la autopsia observamos que los implante se habían desarrollado y los órganos genitales manipulados durante la cirugía se recuperaron adecuadamente.

TABLA. 3. TRANSPLANTE DE OVARIOS XX INFANTILES EN HEMBRAS B6.

Hembra B6 No.	Genotipo Ovárico*		Edad del Ovario XX		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (dpp)	Parto (spp)	
12	XX	XX	2	11	1 †
13	XX	XX	2	10	2 †
16'	XX	XX	8	8.5	3 †
18	XX	XX	9	8.4	5 (1 † + 4 d)
•19'	XX	∅	9	10	6 (4 † + 2 d)
21	XX	XX	6	9	4 †
21'	XX	XX	9	9.8	1 †
•22	XX	∅	7	8	Reabsorción
22'	XX	XX	10	10	6 d
•33	XX	∅	10	7	4 fetos ~16 dpc

*. Determinado con la sonda 145SC5; dpp, Días postparto; spp, Semanas postparto; •, Transplante unilateral; ∅, Ovariectomizado; †, Crías muertas; d, Destete; dpc, Días postcoito. La edad de las hembras receptoras fue de 5 a 6 spp. Producción: 10 hembras fértiles; 3 destetes (30%); Tasa de nac.: 3.2 crías/camada.

TABLA. 4. TRANSPLANTE DE OVARIOS XX INFANTILES EN HEMBRAS B6.Ydom*.

Hembra. B6.Ydom* No.	Genotipo Ovárico *		Edad del Ovario XX		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (dpp)	Parto (spp)	
131	XX	XX	10	11	7 d
132	XX	XX	9	9	2 d
•134	XX	XYdom	11	7	5 d
135	XX	XX	9	9	7(2† + 5d)

*, Determinado con la sonda 145SC5; •, Transplante unilateral; ddp, Días postparto; spp, Semanas postparto; d, Destete; †, Crías muertas.

La edad de las hembras receptoras fue de 6 spp.

Producción: 4 hembras fértiles; 4 destetes (100%);

Tasa de nac.: 5.2 crías/camada.

TABLA. 5. TRANSPLANTE DE OVARIOS XYdom* INFANTILES EN HEMBRAS B6.

Hembra B6 No.	Genotipo Ovárico*		Edad del ovario XYdom		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (dpp)	Autopsia (spp)	
17	XYdom	XYdom	8	11.8	-
•23	XYdom	∅	10	11.8	-
•31	XYdom	∅	12	6	-

*, Determinado con la sonda 145SC5; •, Transplante unilateral; dpp, Días postparto ; spp, Semanas postparto; ∅, Ovariectomizado. La edad de las hembras receptoras es de 5-6 spp.

6.2.3 C. TRANSPLANTE ORTOTÓPICO DE OVARIOS FETALES.

c.1. Hembras XX (B6) receptoras de ovarios XX.

De las hembras B6 que recibieron ovarios fetales XX obtuvimos resultados positivos con trasplantes unilaterales, ya que sólo llevamos a cabo esta modalidad. Ahora, si a la edad del injerto en el parto le descontamos la edad del injerto durante el trasplante, obtenemos el tiempo postimplante en que los injertos comenzaron a ser fértiles. Así tenemos que en los tres casos obtenidos en la Tabla 6, la edad de los implantes durante el parto fue de 6.8, 11 y 11 spp, si a cada uno le descontamos su edad durante la operación obtenemos que los injertos manifestaron su fertilidad a las 4.2, 8.2 y 8.4 spi respectivamente, justo cuando tenían la edad de 4, 8 y 8 spp.

En esta fase experimental, sólo 3 hembras de 16 (18.7%) fueron fértiles, produciendo de 1 a 4 crías/camada y un total de 9 crías [Tabla 9]. Solo un ejemplar (33%) mantuvo sus 4 crías durante el período de lactancia [ver Tabla 6].

TABLA. 6. TRANSPLANTE DE OVARIOS XX FETALES EN HEMBRAS B6.

Hembra B6 No.	Genotipo Ovárico*		Edad del ovario XX		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (dpc)	Parto (spp)	
•14	XX	∅	18	6.8	1 †
•30	XX	∅	19	11	4 †
•38	XX	∅	18	11	4 d

*. Determinado con la sonda 145SC5; •, Transplante unilateral;
dpc, Días postcoito; spp, Semanas postparto; ∅, Ovariectomizado;
†, Crías muertas; d, Destete.

La edad de las hembras receptoras fue de 5 spp.

Producción: 3 hembras fértiles; 1 destete (33%);

Tasa de nac.: 3 crías/camada.

c.2. Hembras B6.Ydom receptoras de ovarios XX.

Con respecto a las hembras B6.Ydom receptoras de ovarios XX fetales, los resultados fueron positivos en los trasplantes bilaterales y unilaterales [ver genotipo ovárico Tabla 7]. Al descontar la edad del injerto durante el trasplante a la edad del mismo en el parto, obtenemos que los implantes manifestaron ser fértiles desde los 3.4 a las 9.5 spi, cuando su edad era de 3.5 a 9.8 spp.

Obtuvimos 7 hembras preñadas de 21 ejemplares operados (33.3%), el número promedio de crías nacidas fue de 3.8 crías/camada y la producción total fue de 31 crías [ver Tabla. 9]. Sólo dos hembras (28.5%) mantuvieron las crías durante el período de lactancia, correspondiendo a 2 y 5 crías destetadas respectivamente; una hembra se apareó en dos ocasiones y en ambas resultó preñada [ver Tabla. 7].

c.3. Hembras XX (B6) receptoras de ovarios B6.Ydom.

Finalmente, ninguna de las hembras B6 receptoras de ovarios XY fetales resultó preñada [Tabla. 8], a pesar de que permanecieron con el macho hasta 12 semanas después de su recuperación quirúrgica.

Al realizar la autopsia de estas hembras apreciamos que la integridad de los órganos genitales manipulados era normal y los injertos de ovario se desarrollaron positivamente en 4 de 5 ejemplares operados.

TABLA. 7. TRANSPLANTE DE OVARIOS XX FETALES EN HEMBRAS B6.Ydom*.

Hembra B6.Ydom No.	Genotipo Ovárico*		Edad del ovario XX		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (dpc)	Parto (spp)	
•141	XX	XYdom	18	12.4	2 d
153	XX	XX	18	10.4	4 †
•160	XX	XYdom	18	7.4	2 †
•214	XX	XYdom	17	11	5 d
•217	XX	XYdom	17	6.2	3 †
•222	XX	XYdom	18	7 ; 11	4† ; 6†
•226	XX	XYdom	18	8	5 †

*, Determinado con la sonda 145SC5; dpc, Días postcoito; spp, Semanas postparto; •, Transplante unilateral; d, Destete; †, Crías muertas.

La edad de las hembras receptoras fue de 5 a 8 spp.

Producción: 7 hembras fértiles; 2 destetes (28.5%);

Tasa de nac.: 3.8 crías/camada.

TABLA. 8. TRANSPLANTE DE OVARIOS XYdom* FETALES EN HEMBRAS B6.

Hembra B6 No.	Genotipo Ovárico*		Edad del ovario XYdom		Camada No. Crías
	Derecho	Izquierdo	Transplante (dpc)	Autopsia (spp)	
•13	XYdom	∅	18	11.8	-
•31	XYdom	∅	19	14	-
•32	XYdom	∅	17	13	-
•35	XYdom	∅	17	13	-

*, Determinado con la sonda 145SC5; dpc, Días postcoito;

spp, Semanas postparto; •, Transplante unilateral;

∅, Ovariectomizado.

La edad de las hembras receptoras fue de 5 spp.

En la Tabla. 9 se muestra a manera de resumen los datos generales obtenidos sobre cada uno de los experimentos realizados en este trabajo.

Con respecto a las hembras B6.Ydom que recibieron ovarios XX de las diferentes edades señaladas, un subtotal de 41 ejemplares fueron operados, 20 de las cuales resultaron preñadas correspondiendo a un porcentaje del 48.7%, con una producción subtotal de 108 crías.

Ninguna de las 15 hembras B6 receptoras de ovarios XYdom resultó preñada.

En el caso de las hembras B6 receptoras de ovarios normales (XX), en conjunto: se operaron 31 hembras, 13 de ellas resultaron preñadas correspondiendo a un porcentaje del 41.9% y se obtuvo una producción subtotal de 41 crías.

Finalmente el número total de hembras operadas fue de 87. El número de hembras preñadas fue de 33, obtuvimos una producción total de 149 crías y la tasa general de nacimientos fue de 4.2 crías/ camada.

TABLA. 9. PRODUCCION DE CRIAS POR LAS HEMBRAS RECEPTORAS DE INJERTOS OVARICOS MEDIANTE TRANSPLANTE ORTOTOPICO.

Hembras receptoras y tipo de injertos ováricos.	No. de hembras.	No. de hembras gestantes.	% de hembras gestantes.	No. de crías.
B6.Ydom con ovarios XX adultos	15	9	60	56
B6.Ydom con ovarios XX infantiles	5	4	80	21
B6.Ydom con ovarios XX fetales	21	7	33.3	31
B6 con ovarios XYdom adultos	7	0	0	0
B6 con ovarios XYdom infantiles	3	0	0	0
B6 con ovarios XYdom fetales	5	0	0	0
B6 con ovarios XX infantiles	15	10	66.6	32
B6 con ovarios XX fetales	16	3	18.7	9
Subtotal B6.Ydom receptoras de ovarios XX	41	20	48.7	108
B6 receptoras de ovarios XYdom	15	0	0	0
B6 receptoras de ovarios XX	31	13	41.9	41
Total	87	33		149

6.3 ESTADO FÍSICO DE LOS INJERTOS DE OVARIOS Y OTROS ÓRGANOS MANIPULADOS DURANTE LA CIRUGÍA.

En los animales cuya recuperación quirúrgica evolucionó favorablemente, la cápsula ovárica se recuperó en forma adecuada y el oviducto conservó su estado físico íntegro.

Los injertos de ovarios XX que se implantaron exitosamente, presentaron aspecto granuloso debido a la abundancia de folículos desarrollados; además presentan un tono de color rosado a rojizo cuando la irrigación sanguínea es abundante y la mayoría presenta un tamaño similar al de los ovarios normales.

Los injertos de ovarios XY $_{dom}$ que lograron implantarse, se aprecian como pequeñas masas amorfas con pobre irrigación sanguínea, de aspecto liso y color amarillento; su tamaño fue similar al de los ovarios comunmente observados en hembras B6.Y $_{dom}$ adultas y fueron más pequeños que los ovarios de hembras XX adultas.

En los animales cuya recuperación quirúrgica evolucionó de forma inadecuada, se observaron anomalías en los órganos genitales manipulados durante el proceso quirúrgico.

En algunas ocasiones observamos desarrollo ectópico de los implantes, ya que fueron localizados en el tejido adiposo adyacente a la cápsula ovárica. En otros casos la cápsula ovárica y el oviducto estaban llenos de fluido claro que los distendía completamente por lo que los injertos no se desarrollaron. También observamos coágulos formados dentro de la cápsula ovárica y probablemente había obturación hacia el oviducto. En contadas ocasiones encontramos regeneración de porciones de ovario local que no fue disecado totalmente (ejemplares descartados).

Hubo casos en que insertamos ovarios fetales XX a la cápsula ovárica, sin extirpar el ovario XY local de las hembras B6.Y $_{dom}$ y observamos que aproximadamente en el 50% de los casos (6 de 13), los injertos si se desarrollaron. En algunos casos, la suturación con hilo Prolene 7-0 (Ethicon) fue contraproducente debido a que se tensó demasiado la bolsa formada por la cápsula ovárica, lo que redujo el espacio e impidió el desarrollo de los implantes de edad temprana.

6.3 ESTADO FÍSICO DE LOS INJERTOS DE OVARIOS Y OTROS ÓRGANOS MANIPULADOS DURANTE LA CIRUGÍA.

En los animales cuya recuperación quirúrgica evolucionó favorablemente, la cápsula ovárica se recuperó en forma adecuada y el oviducto conservó su estado físico íntegro.

Los injertos de ovarios XX que se implantaron exitosamente, presentaron aspecto granuloso debido a la abundancia de folículos desarrollados; además presentan un tono de color rosado a rojizo cuando la irrigación sanguínea es abundante y la mayoría presenta un tamaño similar al de los ovarios normales.

Los injertos de ovarios XYdom que lograron implantarse, se aprecian como pequeñas masas amorfas con pobre irrigación sanguínea, de aspecto liso y color amarillento; su tamaño fue similar al de los ovarios comúnmente observados en hembras B6.Ydom adultas y fueron más pequeños que los ovarios de hembras XX adultas.

En los animales cuya recuperación quirúrgica evolucionó de forma inadecuada, se observaron anomalías en los órganos genitales manipulados durante el proceso quirúrgico.

En algunas ocasiones observamos desarrollo ectópico de los implantes, ya que fueron localizados en el tejido adiposo adyacente a la cápsula ovárica. En otros casos la cápsula ovárica y el oviducto estaban llenos de fluido claro que los distendía completamente por lo que los injertos no se desarrollaron. También observamos coágulos formados dentro de la cápsula ovárica y probablemente había obturación hacia el oviducto. En contadas ocasiones encontramos regeneración de porciones de ovario local que no fue disecado totalmente (ejemplares descartados).

Hubo casos en que insertamos ovarios fetales XX a la cápsula ovárica, sin extirpar el ovario XY local de las hembras B6.Ydom y observamos que aproximadamente en el 50% de los casos (6 de 13), los injertos si se desarrollaron. En algunos casos, la suturación con hilo Prolene 7-0 (Ethicon) fue contraproducente debido a que se tensó demasiado la bolsa formada por la cápsula ovárica, lo que redujo el espacio e impidió el desarrollo de los implantes de edad temprana.

6.4 ANÁLISIS HISTOLÓGICO POSTOPERACIÓN DE LOS INJERTOS DE OVARIOS.

6.4.1 Características histológicas de los ovarios XX injertados tanto en hembras B6 como B6.Ydom.

Describiremos de manera general las características morfológicas de los implantes XX desarrollados desde la etapa infantil o fetal en las hembras receptoras.

La edad de los injertos varió de 7 a 16 semanas postparto. Bajo el microscopio de luz se observaron folículos en diferentes etapas de crecimiento, desde pequeños folículos hasta los grandes folículos Graffianos (etapas 3 a 7 de acuerdo a Pedersen & Peters 1968. En: Peters, 1969) cuyos ovocitos han formado su primer cuerpo polar, como ocurre en ovarios normales intactos [Figuras 10, 11, 12, 13 y 14]. Se pueden distinguir grandes cuerpos lúteos con abundante tejido esteroideogénico completamente irrigado por vasos sanguíneos [Figuras 12 y 13].

También abundan los folículos en proceso de atresia, en algunos ovarios se aprecian folículos con células de la granulosa picnóticas del proceso de atresia temprana [Figura 13] y en la mayoría de los ovarios se observan numerosos remanentes de las zonas pelúcidas de los ovocitos que corresponden a folículos en estado de atresia avanzada [Figuras 11, 12, 13 y 15], éstos remanentes frecuentemente están agrupados en áreas conspicuas asociadas con grandes vasos sanguíneos y masas de tejido intersticial compacto [Figuras 11 y 15].

6.4.2 Características histológicas de los ovarios B6.Ydom injertados en hembras B6.

Describiremos de manera general las características morfológicas de los injertos B6.Ydom desarrollados desde la etapa infantil o fetal en las hembras receptoras B6.

La edad de estos injertos varió de 6 a 14 semanas postparto. A diferencia de los ovarios normales, en estos ovarios se distingue una organización histológica atípica, puesto que no se aprecian compartimentos tisulares definidos (folículos, cuerpos lúteos) [Figuras 16 y 17]. Generalmente no hay folículos, en algunas ocasiones se pueden observar los remanentes de las zonas pelúcidas de los ovocitos que corresponden a folículos en estado de atresia avanzada [Figura 17]. No se aprecian cuerpos lúteos [Figuras 16, 17] y ocasionalmente se distinguen cierta especie de cordones de tipo epitelial [Figura 18]. En general estos ovarios

FIGURA 10. Parte de un ovario de hembra B6 normal (XX) de 8 semanas postparto (spp), en el que se observan folículos (FL) en diferentes etapas de crecimiento y cuerpos lúteos (CL) formados por tejido esteroidogénico irrigado por abundantes vasos sanguíneos (VS). El tejido intersticial (TI) está distribuido entre las estructuras foliculares y los cuerpos lúteos. Segmento 100 μ m.

FIGURA 11. Ovario XX de 9 spp desarrollado desde la etapa infantil (9 días postparto, dpp) en una hembra B6. *Ydom*. Hay un folículo antral grande (FL) y algunos folículos primordiales (flechas) cercanos al epitelio superficial. Abundan los remanentes de las zonas pelúcidas de los ovocitos de folículos atrésicos (✦). Nótese las masas de tejido intersticial (TI) donde frecuentemente aparecen zonas de folículos atrésicos (ZN). Segmento 100 μ m.

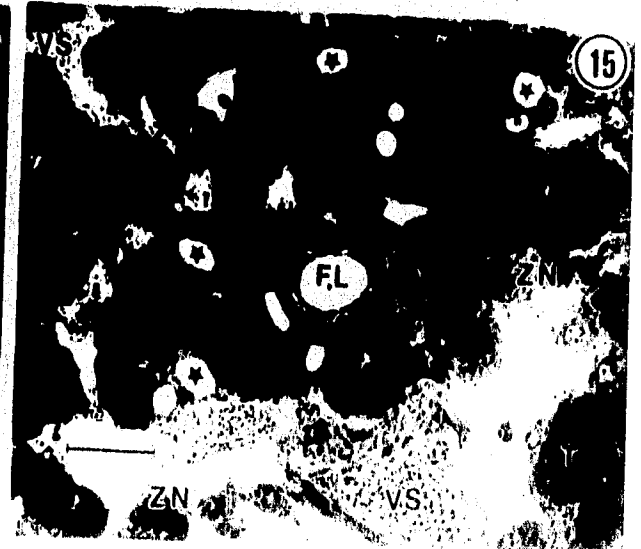
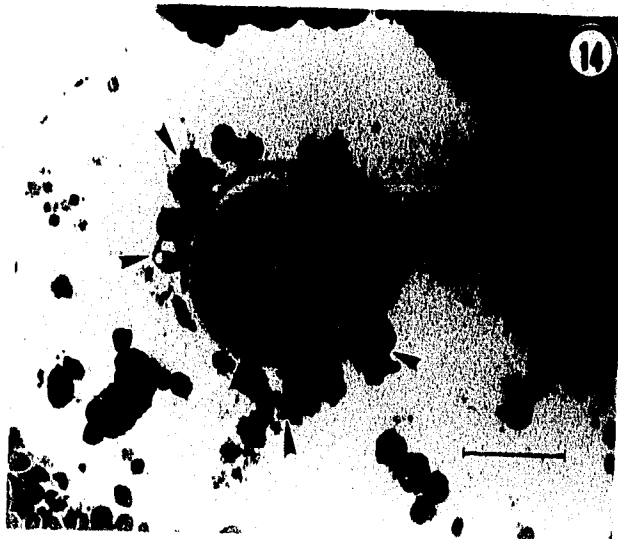
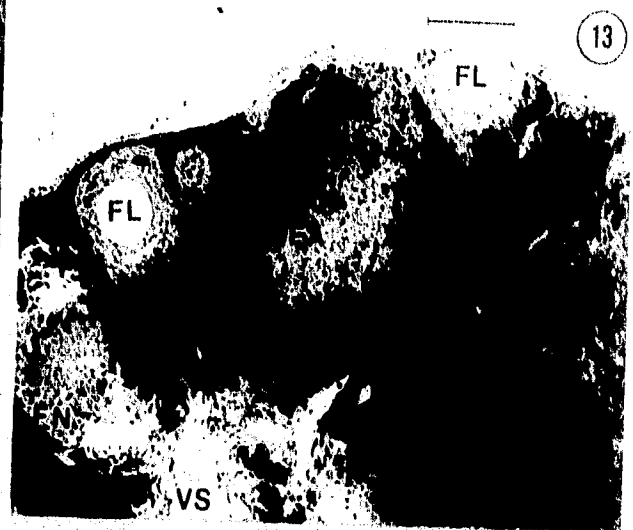
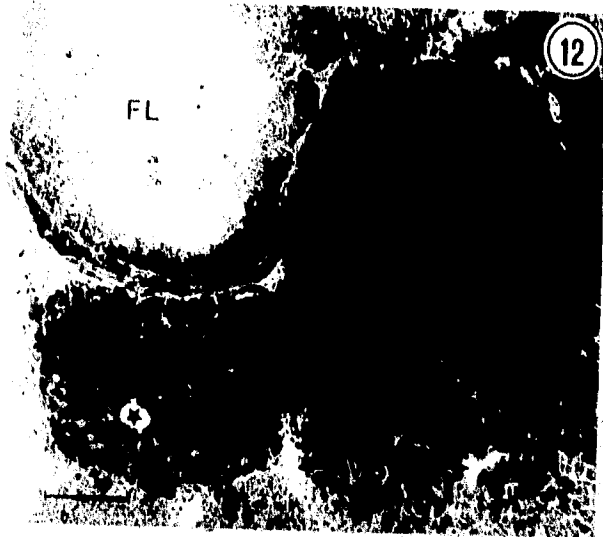
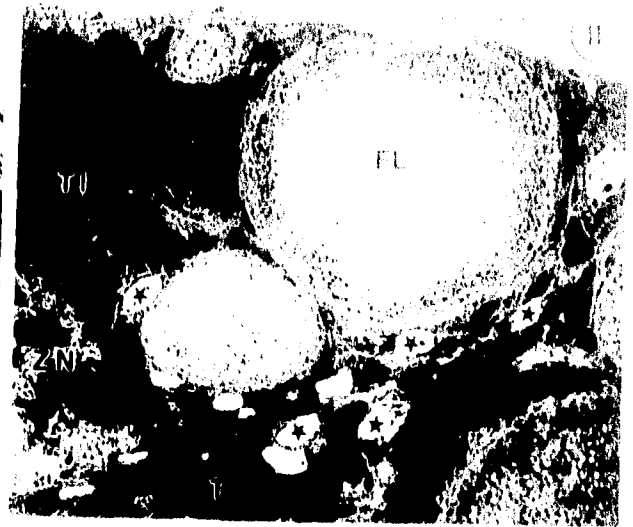
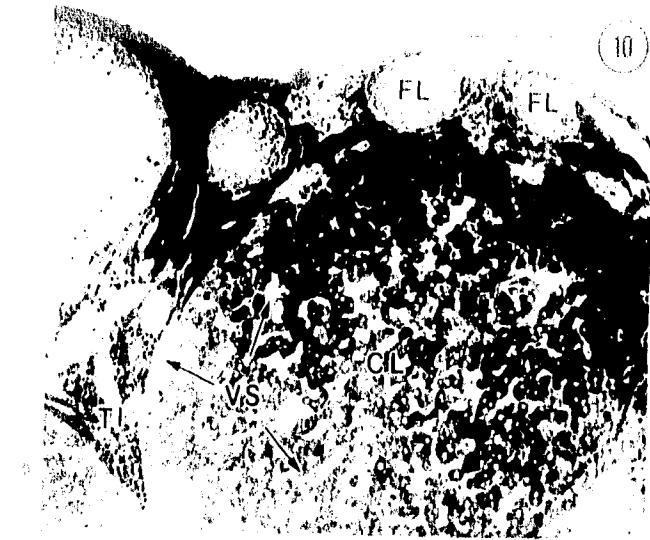
FIGURA 12. Ovario XX de 11 spp desarrollado desde la etapa fetal (19 días postcoito, dpc) en una hembra B6. Se observa un folículo antral grande (FL), así como cuerpos lúteos (CL) constituidos por abundante tejido esteroidogénico irrigado por vasos sanguíneos (VS). Nótese el remanente de zona pelúcida de un ovocito (✦). Segmento 100 μ m.

FIGURA 13. Ovario XX de 10.4 spp desarrollado desde la etapa fetal (18 dpc) en una hembra B6. *Ydom*. Se observa un par de folículos en desarrollo (FL) y parte de un cuerpo lúteo (CL). Al centro se ubica un folículo grande que ha iniciado el proceso de atresia (FA) con numerosas células de la granulosa picnóticas. Nótese la masa de tejido intersticial (TI) y otro folículo en atresia avanzada (FN) con grandes vasos sanguíneos (VS). Segmento 100 μ m.

FIGURA 14. Folículo antral preovulatorio de un ovario XX de 11 spp desarrollado desde la etapa fetal (19 dpc) en una hembra B6. El ovocito (OV) con su primer cuerpo polar, está rodeado por células del cúmulus adheridas a la zona pelúcida (cabezas de flecha). Es notable el desprendimiento de células de la capa de células de la granulosa hacia el antro folicular (CG). Segmento 30 μ m.

FIGURA 15. Ovario XX de 11 spp desarrollado desde la etapa infantil (10 dpp) en una hembra B6. *Ydom*. Nótese la abundancia de masas de tejido intersticial (TI) y grandes vasos sanguíneos (VS), conformando amplias zonas con remanente de folículos atrésicos (ZN). Se aprecian numerosas zonas pelúcidas vestigiales (✦). Al centro hay un folículo preantral aparentemente sano (FL). Segmento 100 μ m.

LAMINA I



están constituidos por masas de tejido intersticial y fibroso compacto, donde se advierten numerosas células picnóticas [Figuras 16, 17, 18] y en algunos casos el tejido intersticial está interrumpido por grandes vasos sanguíneos [Figura 19].

6.4.3 Características histológicas de los ovarios locales intactos de las hembras B6.*Ydom* con implante unilateral.

Los ovarios *Ydom* que se mantuvieron intactos en las hembras B6.*Ydom* receptoras de implantes en forma unilateral [ver genotipo ovárico Tablas 4 y 7], presentan las características de organización histológica común de este tipo de ovarios, ya que carecen de folículos, así como de cuerpos lúteos y la mayoría presenta numerosos remanentes de las zonas pelúcidas de los ovocitos, que corresponden a los folículos en estado de atresia avanzada. Estos están ubicados en grandes masas de tejido intersticial y tejido fibroso compactos, irrigados por vasos sanguíneos, la edad de estos ovarios fue de 11 a 20 spp.

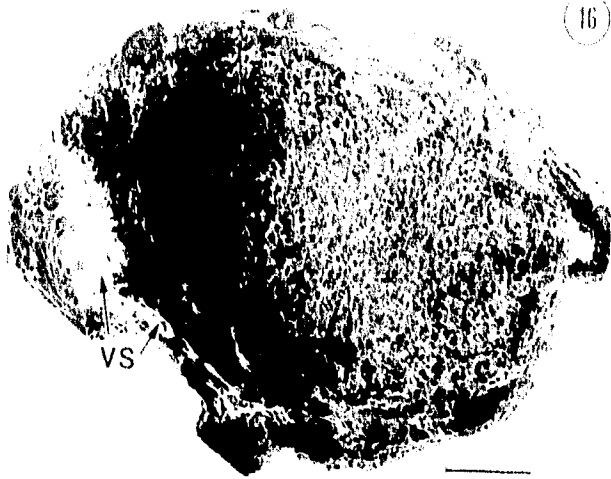
FIGURA 16. Ovario XY de 13 semanas postparto (spp) desarrollado desde la etapa fetal (17 días postcoito, dpc) en una hembra normal B6. Nótese la ausencia de folículos. El órgano está conformado por una masa de tejido intersticial y fibroso irrigado por vasos sanguíneos (VS). Segmento 100 μ m.

FIGURA 17. Ovario XY de 6 spp desarrollado desde la etapa infantil (12 días postparto, dpp) en una hembra normal B6. Es notable la carencia de folículos. El órgano está conformado por una masa de tejido intersticial (TI) y fibroso donde se ubican algunos remanentes de zonas pelúcidas (★) y vasos sanguíneos (VS). Segmento 100 μ m.

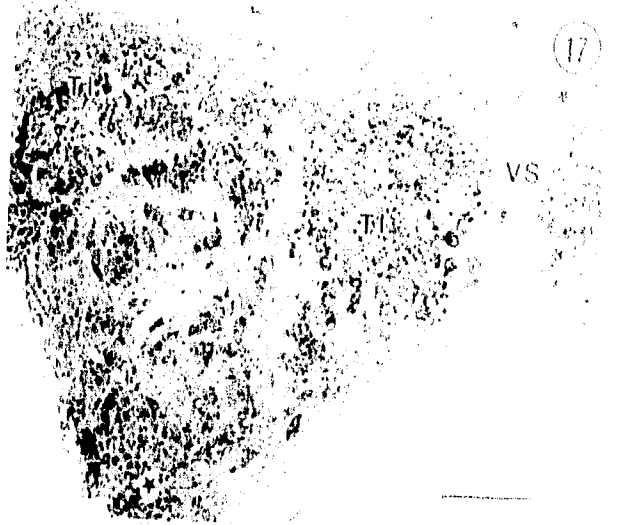
FIGURA 18. Ovario XY de 11.8 spp desarrollado desde la etapa infantil (8 dpp) en una hembra normal B6. Únicamente se aprecian cordones de tipo epitelial (CE). Abunda el tejido intersticial (TI) y fibroso, además de vasos sanguíneos (VS). Segmento 50 μ m.

FIGURA 19. Ovario XY de 13 spp desarrollado desde la etapa fetal (17 dpc) en una hembra normal B6. Se aprecia la abundancia de tejido intersticial (TI) asociado a grandes vasos sanguíneos (VS). Segmento 50 μ m.

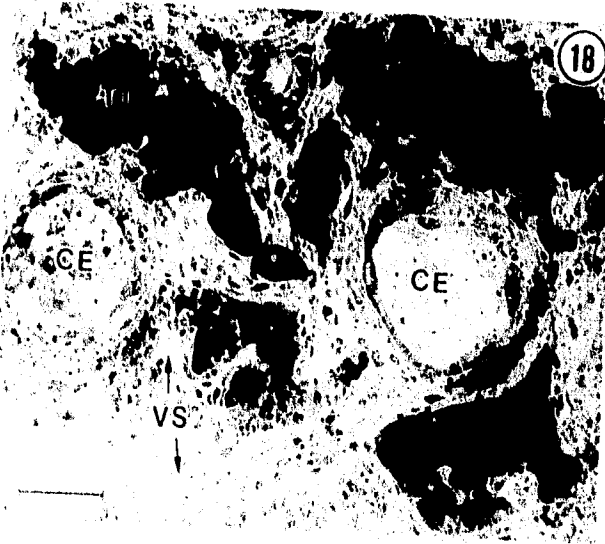
LAMINA II



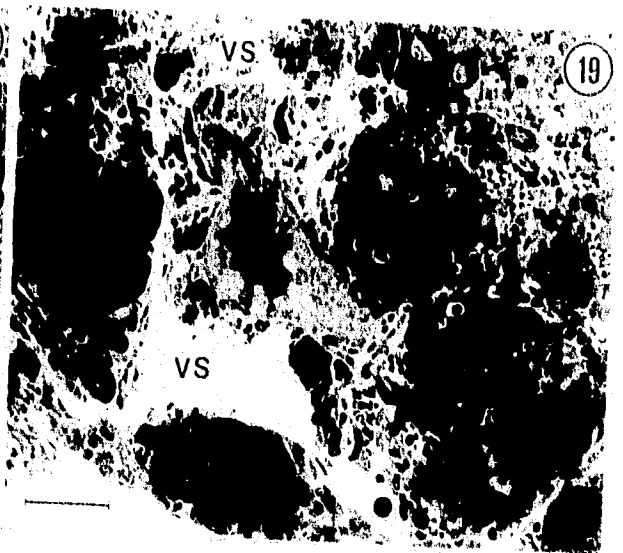
16



17



18



19

VII. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo describimos con mayor detalle el procedimiento operativo del trasplante ortotópico de ovarios [Figura 8], de acuerdo a la modalidad practicada por Robertson (1940), aunque en nuestro caso, cerramos la incisión mediante pequeñas suturas de hilo delgado para mantener el implante dentro de la cápsula ovárica. Dicha modalidad nos permitió disecar totalmente el ovario local en la mayoría de las operaciones realizadas y únicamente observamos 3 regeneraciones de tejidos ovárico local (datos no presentados). Éste procedimiento quirúrgico no está en desventaja con la modalidad realizada por Jones & Krohn (1960), la cual permite mayor libertad para disecar el ovario local, pero también puede presentar mayores posibilidades de que el implante sea expulsado de la bolsa ovárica después de la operación.

En este sentido nuestros resultados son favorables en comparación con los resultados obtenidos por otros autores (Robertson, 1940; Russell & Douglass, 1945; Stevens, et al., 1957). El porcentaje de fertilidad del 45.8% general y la tasa de nacimientos de 4.2 crías/camada obtenidos en este trabajo están dentro de los valores logrados por otros investigadores (37.5% y 5.6 crías/camada, Russell & Douglass, 1945; 66% Stevens, 1955; 69% y 4.1 crías/camada, Stevens, et al. 1957; 64% y 80% Parrott, 1958; 46% y 3.2 crías/camada, Jones & Krohn, 1960).

De manera específica, nuestro porcentaje de fertilidad del 60% en ovarios XX adultos injertados en hembras B6.Ydom [ver Tabla. 9] y la tasa de nacimientos del 5.6 crías/camada son valores bastante similares a los porcentajes y tasas obtenidos por otros investigadores (Stevens, 1955; Stevens, et al. 1957; Parrott, 1958) que realizaron trasplante de ovarios adultos en otras cepas de ratón; inclusive son favorables a los valores obtenidos por Jones & Krohn (1960). Nuestro porcentaje del 88% de hembras que mantuvieron sus crías todo el período de lactancia es bastante aceptable, aún si lo comparamos con el 100% logrado por Stevens, et al., (1957); otros autores también obtuvieron numerosas camadas destetadas de hembras con trasplante de ovarios adultos, sin embargo no mencionan valores específicos al respecto (Stevens, 1955; Parrott, 1958; Jones & Krohn, 1960).

Nuestros porcentajes de fertilidad del 80% y 66.6% conseguidos con los ovarios XX transferidos durante la etapa infantil, son mucho mejores a los valores que obtuvimos con injertos ováricos adultos y con los injertos fetales [ver Tabla. 9]. En el criceto, Parrott

(1959) menciona no haber obtenido diferencias significativas entre trasplantes exitosos de ovarios infantiles y los de ovarios juveniles o adultos. Por nuestra parte, pensamos que el porcentaje del 100% de hembras B6.Ydom [Tabla 4] que mantuvieron la lactancia de sus crías es bastante favorable al 89% de hembras de criceto, con trasplante de ovarios inmaduros, que completaron el período de lactancia de sus crías (Parrott, 1959).

Finalmente, nuestro porcentaje de fertilidad del 33.3% logrado con injertos de ovarios fetales [ver Tabla. 9] es muy cercano al valor del 37% logrado por Russell & Douglass (1945), pioneros del trasplante de ovarios fetales. Dichos investigadores reportan haber tenido problemas con la regeneración de tejido ovárico de la hembra receptora. En nuestras hembras receptoras, no observamos regeneración de tejido ovárico local, al menos en esta fase experimental. Por otra parte, los porcentajes de hembras que lograron mantener la lactancia de sus crías (33% y 28%) son aceptables, considerando que los resultados logrados al respecto por Russell & Douglass (1945) no son del todo claros.

En algunos casos se produjeron crías a partir de ovarios que aún son considerados juveniles (4.1, 5.7, 4 y 3.4 semanas de edad postparto) [ver resultados de Tablas 3, 4, 6 y 7]. Estos resultados concuerdan con las observaciones hechas por Parrott (1959), en trasplantes ortotópicos de ovarios infantiles en cricetos irradiados, quien obtuvo crías de dos injertos de ovarios de 4 semanas de edad postparto.

Esto permite establecer que los implantes de ovarios inmaduros pueden desarrollarse en hembras juveniles y adultas ovariectomizadas y además pueden ser fértiles en etapas juveniles. Ya se ha observado que las hembras de 25-35 dpp pueden ovular mediante la estimulación con gonadotropinas y sus ovocitos ser fertilizados *in vitro* (Taketo-Hosotani, et al. 1989; Merchant-Larios, et al. 1994). Es claro que las hembras receptoras de implantes inmaduros habían alcanzado la edad adulta al momento en que los injertos comenzaron a manifestar funcionalidad en edad juvenil, por lo tanto eran capaces de mantener la gestación.

Tanto en los injertos de ovarios adultos como en los inmaduros registramos indicios de funcionalidad desde 2 a 8 ó más semanas postimplante. De hecho un mayor número de ovarios injertados en etapa infantil y fetal (13 contra 6 injertos adultos) manifestaron funcionalidad entre las 2 y 5 semanas postimplante. Quizás los ovarios inmaduros tienen mayores posibilidades de implantarse y de manifestar su función a diferencia de los ovarios trasplantados en etapa adulta que posiblemente han perdido capacidad funcional debido a la pérdida de ovocitos (Mandl & Zuckerman, 1951). Aunque también los

ovarios inmaduros tienen dificultades para implantarse y ser funcionales, ya que un elevado número de injertos fetales no resultaron fértiles [ver Tabla 9]. Sin embargo, resulta difícil esclarecer qué factores en particular alteran la fertilidad de los injertos inmaduros. Probablemente muchos no fueron funcionales debido a la carencia de una inadecuada innervación (Gerendai, 1988; D'Albora & Barcia, 1996) o debido a alteraciones ocasionadas por el estrés quirúrgico y las secuelas postoperatorias, que impiden la implantación y el adecuado funcionamiento de un injerto.

Posiblemente la falta de suficiente riego sanguíneo desde el momento en que el ovario es extirpado hasta que se implanta y es irrigado con sangre de la hembra receptora, puede alterar su integridad fisiológica (Jones & Krohn, 1960). La pérdida de ovocitos ocasionada por la isquemia temporal sobre el injerto durante la operación, sumada a la pérdida natural conforme aumenta la edad del ovario (Mandl & Zuckerman, 1951), son factores que pueden haber influido en la fertilidad de los injertos. Quizas algunas hembras que no resultaron preñadas o que se preñaron mucho tiempo después de la operación [Tablas. 3, 4, 6 y 7] presentaron este problema, aunque es difícil saberlo ya que no se pueden distinguir histológicamente los injertos de ovarios fértiles de los infértiles (Parrott, 1958; Parrott, 1959).

Las secuelas y reacciones fisiológicas producidas como consecuencia de la manipulación quirúrgica influyen contra el éxito de la implantación y la fertilidad de los injertos de ovario. Por ejemplo, en hembras no preñadas cuyos injertos sí se desarrollaron pudo haber obliteración del espacio periovárico y posiblemente se bloqueó el viaje de los ovocitos ovulados (Jones & Krohn, 1960). La distensión del oviducto por fluido claro que observamos en algunas hembras también pudo influir en el movimiento de los ovocitos, inclusive en muchas hembras con injertos de ovarios fetales notamos la cápsula ovárica totalmente llena de fluido claro en el cual estaba embebido el injerto que no se desarrolló. En algunas ocasiones apreciamos fibrosis y tensión sobre la cápsula ovárica provocada por el hilo de sutura. Finalmente, debido a la hemorragia postquirúrgica, en algunas hembras notamos coágulos sanguíneos que reducen el espacio capsular y alteran el desarrollo de los pequeños injertos de ovario.

En relación a nuestras observaciones histológicas realizadas en los injertos de ovarios XX, los ovarios de ambas etapas de desarrollo (infantil y fetal) injertados tanto en hembras B6 como en hembras B6.Ydom [Figura. 6] presentaron características morfológicas similares. No encontramos diferencias en comparación con lo observado al respecto por otros autores (Jones & Krohn, 1960).

Por lo tanto, independientemente de la edad en que los ovarios sean injertados, éstos presentan alteraciones morfológicas postoperatorias como resultado de la manipulación quirúrgica; es decir, que los pequeños ovarios son afectados por la falta de irrigación sanguínea durante el período que va desde el momento en que se realiza la operación quirúrgica hasta que logra implantarse realmente como órgano dependiente del torrente sanguíneo de la hembra receptora, entonces la isquemia temporal influye en la muerte de los ovocitos, de tal modo que en los ovarios hay regiones depletadas de ovocitos y se establecen zonas de abundante tejido intersticial con numerosos remanentes de zonas pelúcidas de los ovocitos de folículos atrésicos (Jones & Krohn, 1960).

En la primera etapa de este estudio cuando injertamos ovarios *XYdom* adultos en hembras normales [Figura 6], no obtuvimos hembras preñadas [Tablas 2 y 9] a pesar que se les detectó tapón de copulación. Observaciones histológicas de ovarios adultos XY muestran que estos carecen de un gran número de ovocitos y contienen muy pocos folículos Graffianos [Figura 5]. Se sabe que algunos folículos ocasionalmente llegan a ovular (Merchant-Larios, et al. 1994), sin embargo, pensamos que en nuestra primera fase experimental, realmente estábamos injertando ovarios XY prácticamente depletados de folículos sanos.

La posibilidad de transplantar ovarios inmaduros que puedan desarrollarse, ovular y producir camadas viables, fue un aspecto muy importante para analizar si los ovarios XY infantiles o fetales podrían desarrollarse favorablemente en un ambiente genotípico normal (XX) y además llegar a ser fértiles. Sin embargo, ninguno de los ovarios *XYdom* transplantados a las hembras B6 fue fértil [ver Tablas 5 y 8], además el análisis histológico mostró que estos ovarios carecen totalmente de folículos sanos [Figuras 16-19], lo que permite sugerir que los ovarios no mostraron una función endócrina adecuada. Probablemente en éstas hembras B6 se manifestaron las características fisiológicas (carencia de ciclo estral regular) observadas en las hembras B6 *Ydom* y en las hembras B6 con implante ectópico de ovarios *XYdom* (Taketo-Hosotani, et al. 1989). Por lo tanto, en éstos ovarios se manifiestan alteraciones que les impiden un desarrollo prenatal y postnatal normal (Taketo-Hosotani, et al. 1989; Villalpando, Nishioka & Taketo, 1993; Villalpando-Fierro, et al., 1996) que resultan en una función endócrina inadecuada, aún cuando son expuestos al ambiente fisiológico de una hembra normal.

Los ovarios *XYdom* se han generado como una consecuencia de fallas en el programa de diferenciación testicular y sus alteraciones (Taketo-Hosotani, et al. 1989; Merchant-Larios, et

al. 1994) probablemente se originen desde etapas más tempranas de su desarrollo. En estos ovarios ya se ha demostrado la expresión del gene *Sry* y los transcritos permanecen hasta los 14 dpc (Lee & Taketo, 1994), a diferencia de lo que ocurre en los testículos (Koopman, et al. 1990). Existe la posibilidad de que éste factor promueva la expresión de otros factores que induzcan las alteraciones manifestadas durante el desarrollo del ovario, como son la degeneración de ovocitos desde la etapa fetal, la escasa formación de folículos, así como las alteraciones endócrinas postnatales (Taketo-Hosotani, et al. 1989; Villalpando, Nishioka & Taketo, 1993). De esta manera, los ovarios XY estarían predeterminados para continuar un programa de desarrollo anómalo, aún en una hembra XX.

Eicher y colaboradores, (1982) reportaron un sólo ejemplar femenino *XYdom* que produjo una camada de dos crías. Fuera de esta excepción, se ha demostrado que las hembras *B6.Ydom* son estériles (Eicher, et al. 1986; Taketo-Hosotani, et al. 1989; Merchant-Larios, et al. 1994). Éstas hembras carecen de un ciclo estral regular, sin embargo, muestran ciclos normales luego del implante ectópico de ovarios XX (Taketo-Hosotani, et al. 1989). Estas observaciones permitieron sugerir que el eje hipotálamo-hipófisis de las hembras *B6.Ydom* es funcional y que el ovario *Ydom* es quien carece de una función endócrina adecuada. Sin embargo, se necesitaba establecer si las hembras podrían resultar preñadas; existía la posibilidad de que la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis fuera insuficiente para mantener la gestación o que el tracto genital (oviducto, útero) presentara alteraciones que impiden el desarrollo de los embriones, puesto que las hembras *B6.Ydom* pueden llegar a ovular y sus ovocitos ser fertilizados (Merchant-Larios, et al. 1994). Por lo tanto, era imprescindible transplantar los ovarios justo en el sitio que anatómicamente les corresponde para poder aclarar que factores inducen la esterilidad de las hembras *B6.Ydom*.

Con el trasplante ortotópico de ovarios demostramos que las hembras *B6.Ydom* pueden recuperar la fertilidad [Tablas 1, 4 y 7]. Ellas pueden mantener la gestación, por lo tanto su eje hipotálamo-hipófisis es completamente funcional y su tracto genital aparentemente no manifiesta ninguna alteración. Además demostramos que las hembras *B6.Ydom* pueden desarrollar todo el patrón conductual necesario para amamantar y cuidar a sus crías de manera similar a las hembras con genotipo XX.

De esta manera, podemos establecer que la esterilidad de la hembra *B6.Ydom* se debe a un trastorno a nivel del ovario, debido a la presencia del cromosoma Y.

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS.

1.- Los ovarios XX fetales, infantiles o adultos transplantados, recobran su fertilidad tanto en hembras B6 como en hembras B6.Ydom.

2.- En ningún caso se encontró que los ovarios XYdom transplantados a hembras normales fueran fértiles.

4.- En las hembras B6.Ydom, la presencia del cromosoma Y no afecta su capacidad para mantener la gestación ni la lactancia de sus crías. Por lo tanto, con estos resultados podemos sugerir que la esterilidad de las hembras B6.Ydom se debe a un defecto a nivel del ovario.

IX. CONCLUSIÓN.

La presencia del cromosoma Y en las hembras B6.Ydom afecta la función del ovario; el eje hipotálamo-hipófisis no es alterado de manera irreversible.

X. PERSPECTIVAS.

Los resultados sugieren que la esterilidad de las hembras B6.Ydom se debe a un defecto a nivel del ovario que contiene el cromosoma Y, ya que presenta alteraciones durante su desarrollo, como la pérdida de ovocitos y la carencia de folículos sanos. Sería interesante establecer que factor o factores inducen la muerte de los ovocitos del ovario B6.Ydom, ya que se desconoce por que éstos comienzan a degenerar particularmente en la región medular durante la etapa fetal.

Por otra parte, en las hembras XX normalmente se produce un sólo tipo de ovocitos debido a que son homocigóticas para sus cromosomas sexuales. Pero en este caso la hembra es heterocigótica (XY), por lo tanto produce ovocitos X como ocurre normalmente y también produce ovocitos Y, pero ninguno es viable. Por lo tanto sería interesante establecer por que los ovocitos que conservan el cromosoma X, después del proceso de meiosis, no son capaces de desarrollarse al ser fecundados.

Es posible que uno o más genes del cromosoma Y estén expresados en los ovarios de la hembra B6.Ydom y la identificación de su producto ayudaría a entender el mecanismo molecular de la esterilidad.

XI. LITERATURA CITADA.

- Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P. N. & M. Fellous. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348: 448-450.
- Burgoyne, P. S. (1988). Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 322: 63-72.
- Byskov, A. G. & P. E. Hoyer. (1988). Embryology of mammalian gonads and ducts. In: *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1. (Ed. Knobil, E. & J. Neill). Raven Press, New York, USA. p. 265-302.
- Capel, B., Rasberry, C., Dyson, J., Bishop, C. E., Simpson, E., Vivian, N., Lovell-Badge, R., Rastan, S. & B. M. Cattanach. (1993). Deletion of Y chromosome located outside the testis determining region can cause XY female sex reversal. *Nature Genetics*, 5: 301-307.
- Chandra, H. S. (1985). Is human X chromosome inactivation a sex-determining device?. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 6947-6949.
- Coward, P., Nagai, K., Chen, D., Thomas, H. D., Nagamine, C. M. & Y. C. Lau. (1994). Polymorphism of a CAG trinucleotide repeat within Sry correlates with B6.Ydom sex reversal. *Nature Genetics*, 6: 245-250.
- D'Albora, H. & J. J. Barcia. (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosciences Letter*, 205: 65-67.
- Eicher, E. M., Washburn, L. L., Whitney III, J. B. & K. E. Morrow. (1982). *Mus poschiavimus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science*, 217: 535-537.
- Eicher, E. M. & L. L. Washburn. (1983). Inherited sex reversal in mice: identification of a new primary sex-determining gene. *Journal of Experimental Zoology*, 228: 297-304.
- Eicher, E. M. & L. L. Washburn. (1986). Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann. Rev. Genet.*, 20: 327-360.
- Eicher, E. M. (1994). Sex and trinucleotide repeats. *Nature Genetics*, 6: 221-223.
- Eicher, E. M., Shown, E. P. & L. L. Washburn. (1995). Sex reversal in C56BL/6J.YPOS mice corrected by a Sry transgene. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 350: 263-268.
- Erickson, R. P., Durbin, E. J. & L. L. Tres. (1987). Sex determination in mice: Y and chromosome 17 interactions. *Development*, 101 Supplement: 25-32.
- Ferguson-Smith, M. A. (1988). Genes on the X and Y chromosomes controlling sex. *British Medical Journal*, 297: 635-636.

- Gerendai, I. (1988). Innervation of the ovary and its functional significance. In: *The Brain and Females Reproductive Function*, p. 191-195, (Ed. Genazzani, A. R., Montemagno, U., Nappi, C. and F. Petraglia), The Parthenon Publishing Group, New Jersey, USA.
- Gilbert, S. F. (1994). *Developmental Biology*, 4th ed. Ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, U.S.A.
- Graves, P. E. & R. P. Erickson. (1992). An amino acid change in the DNA-binding region of *Sry*, found in *Mus musculus domesticus* and other species, does not explain C57BL/6J. Ydom sex reversal. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 185(1): 310-316.
- Graves, P. E. & R. P. Erickson. (1995). Sequence variation in the 5', putative promoter of *Sry* and its possible relevance to the C57BL/6J. Ydom sex reversal. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 208(2): 624-628.
- Hawkins, J. R., Koopman, P. & P. Berta. (1991). Testis-determining factor and Y-linked sex reversal. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1: 30-33.
- Houle, A-M. & T. Taketo. (1992). True hermaphrodites: an experimental model in the mouse. *J. of Urology*, 148: 672-676.
- Johnson, L. L., Sargent, E. L., Washburn, L. L. & E. M. Eicher. (1982). XY female mice express H-Y antigen. *Developmental genetics*, 3: 247-253.
- Jones, E. C. & P. L. Krohn. (1960). Orthotopic ovarian transplantation in mice. *J. Endocrinol.* 20:135-146.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. *J. Cell Biol.* 27: 137A.
- Koopman, P., Gubbay, J., Collignon, J. & R. Lovell-Badge. (1989). *Zfy* gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature*, 342: 940-942.
- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. & R. Lovell-Badge. (1990). Expression of candidate sex-determining gen during mouse testis differentiation. *Nature*, 348: 450-452.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P. & R. Lovell-Badge. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 351: 117-121.
- Laval, S. H., Glenister, P. H., Raspberry, C., Thornton, C. E., Mahadevaiah, S. K., Cooke, H. J., Burgoyne, P. S. & B. M. Cattanach. (1995). Y chromosome short arm-*Sxr* recombination in X*Sxr*/Y males causes deletion of *Rbm* and XY female sex reversal.

- Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 10403-10407.
- Lee, C-H. & T. Taketo. (1994). Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6.Ydom sex-reversed mouse gonad. *Developmental Biology*, 165: 442-452.
- Lovell-Badge, R. & E. Robertson. (1990). XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development*, 109: 635-646.
- Mandl, A. M. & S. Zuckerman. (1951). The relation of age to numbers of oocytes. *Journal Endocrinol.* 7:190-193.
- Merchant-Larios, H. & J. Chimal-Monroy. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. In: *Developments in Ultrastructure of Reproduction*, p.p. 55-63. (Motta, P. Ed.) Alan R. Liss, Inc. New York.
- Merchant-Larios, H. (1990). Identidad sexual y desarrollo. En: *Información Científica y Tecnológica, México*. 12(170): 27-33.
- Merchant-Larios, H. & T. Taketo. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 19: 158-171.
- Merchant-Larios, H. (1991). Gametogénesis. En: *Tópicos selectos de Biología de la Reproducción*. p.p. 9-39. (Coor. R. Domínguez Casalá). Grupo Editorial Porrúa, México, D. F.
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N. & M. Buehr. (1993). The role of the mesonephros in the cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *J. Dev. Biol.* 37: 407-415.
- Merchant-Larios, H. Clarke, H. J. & T. Taketo. (1994). Developmental arrest of fertilized eggs from the B6.Ydom sex-reversed female mouse. *Developmental Genetics*, 15:435-442.
- Meusy-Desolle, N. & N. Josso. (1977). Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. *Nature*, 269: 411-412.
- Nagamine, C. M., Taketo, T. & G. C. Koo. (1987). Morphological development of the mouse gonad in Tda-1 XY sex reversal. *Differentiation*, 33: 214-222.
- Nishioka, Y. (1988). Application of Y chromosomal repetitive sequence to sexing mouse embryos. *Teratology*, 38:181-185.
- Palm, J. (1961). Transplantation of ovarian tissue. p.p. 49-56. In: *Transplantation of tissues and cells*. Ed. Billingham, R. E. & W. K. Silvers. The Wistar Institute of Anatomy and Biology Press, Philadelphia, Pa., USA.
- Palmer, S. J. & P. S. Burgoyne. (1991). The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in

- C57BL/6J.Ypos mice. *Development*, 113: 709-714.
- Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica*, 62: 98-116.
- Parrott, D. M. V. (1958). Fertility of orthotopic of ovarian grafts. *Studies on Fertility*, 9: 137.
- Parrott, D. M. V. (1959). Orthotopic ovarian grafts in the golden hamster. *J. Endocrinol.* 19: 126-138.
- Robertson, G. G. (1940). Ovarian transplantations in the house mouse. *Proceeding Society Experimental Biology Medical*, 44: 302-304.
- Russel, W. L & P. M. Douglass. (1945). Offspring from unborn mothers. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 31: 402-404.
- Schneider-Gädicke, A., Beer-Romero, P., Brown, L. G., Nussbaum & D. C. Page. (1989). ZFX has a gene structure similar to ZFY, the putative human sex determinant, and escapes X inactivation. *Cell*, 57: 1247-1258.
- Stevens, L. C. (1955). Survival of ovarian grafts in castrate and unilaterally ovariectomized female mice. *Transplantation Bulletin*, 2: 45-46.
- Stevens, L. C. Russell, E. S. & J. L. Southard. (1957). Evidence on inheritance of muscular dystrophy in an inbred strain of mice using ovarian transplantation. *Proceeding Society Experimental Biology Medical*, 95: 161-164.
- Taketo-Hosotani, T., Nishioka, Y., Nagamine, C. M., Villalpando, I. & H. Merchant-Larios. (1989). Development and fertility of ovaries in the B6.Ydom sex-reversed female mouse. *Development*, 107:95-105.
- Taketo-Hosotani, T., Saeed, J., Nishioka, Y. & P. K. Donahoe. (1991). Delay of testicular differentiation in the B6.Ydom ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for Müllerian inhibiting substance. *Developmental Biology*, 146: 386-395.
- Villalpando, I., Nishioka, Y. & T. Taketo. (1993). Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *J. Steroid. Biochem. Molec.* 45(4): 265-273.
- Villalpando-Fierro, I., Villafán-Monroy, H. & P. Pacheco-Cabrera. (1996). Delayed expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex-reversed female mouse ovary. *Int. J. Dev. Biology.* 40: 477-482.
- Wachtel, S. S., Ohno, S., Koo, G. C. & E. A. Boyce. (1975). Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, 257: 235-237.
- Washburn, L. L. & E. M. Eicher. (1983). Sex reversal in XY mice caused by dominant mutation on chromosome 17. *Nature*, 303: 338-340.

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

Zetterqvist, H. (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. Thesis. Karolinska Institute, Stockholm.