

LA DIFERENCIACION SEXUAL EN VERTEBRADOS: HIPOTESIS Y TEORIAS

Arturo SALAME-MÉNDEZ ¹ e Irma VILLALPANDO-FIERRO ²

¹ Departamento de Biología de la Reproducción, División de C. B. S.,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
Apdo. Postal 55-535, CP 09340 México, D.F. MEXICO

² Departamento de Biología Celular. Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México.
Apdo. Postal 70228, CP 04510 México, D.F. MEXICO

RESUMEN

Se revisan cronológicamente las hipótesis y teorías que explican los procesos implicados en la diferenciación sexual en los vertebrados. Estas han asentado los precedentes teóricos y experimentales en el conocimiento de los mecanismos genéticos, celulares y moleculares a partir de los cuales se forma el testículo o el ovario, así como de los genitales internos y externos. Se analizan los puntos en común que hay entre las hipótesis y teorías descritas con base a evidencias experimentales. Se propone una sinopsis sobre la diferenciación sexual masculina en el ratón.

Palabras clave: vertebrados, diferenciación sexual, gónadas.

ABSTRACT

Here we review the hypothesis and theories to explain the processes involved in the sexual differentiation of vertebrates which established both the theoretical and experimental precedents in the knowledge of the genetic, cellular and molecular mechanisms from which either the testicle or the ovary are formed, as well as both internal and external genitalia. After an analysis of the common ideas among the hypothesis and theories, based on experimental evidences, we propose a synopsis for sexual differentiation in male mouse.

Key words: vertebrates, sexual differentiation, gonads.

INTRODUCCION

La reproducción ocurre a través de varias estrategias y una de ellas es la reproducción sexual, la cual básicamente consiste en la producción de gametos en la gónada. Esta es una región anatómica a partir de la cual se diferenciará el ovario o el testículo. En el ovario se desarrollarán los ovocitos y en los testículos los espermatozoides, además de que en ambas gónadas se producirán hormonas.

En los vertebrados se presentan diferentes mecanismos a partir de los cuales se determina el sexo. Durante la fertilización, al momento en que se fusiona el pronúcleo masculino con el femenino (anfimixis), el sexo genético del cigoto se determina. De tal manera que, tanto el embrión como el individuo en condiciones normales,

adquieren uno de los dos tipos de sexo cromosómico: un sexo homogamético o un sexo heterogamético.

El sexo homogamético está constituido por un par homólogo de cromosomas sexuales, XX en los mamíferos o su homólogo ZZ en las aves y otros vertebrados. Debido a lo cual los portadores de esta carga genética, son hembras o machos respectivamente. El sexo heterogamético está constituido por un par heterólogo de cromosomas sexuales, XY en los mamíferos o su homólogo ZW en las aves y otros vertebrados. De tal manera que los individuos que poseen estos cromosomas son machos o hembras respectivamente.

Otro mecanismo que ocurre en los vertebrados a partir del cual se determina el sexo de los individuos independientemente de su sexo cromosómico, se presenta en algunas especies de tortugas por acción de la temperatura de incubación (Salame-Méndez, 1997; Ewert y Nelson, 1991). En general, los huevos de un nido que se incuban a una temperatura entre 26-27°C, se determina el sexo masculino de los embriones y sus gónadas se diferencian en testículos. Los huevos que se incuban a una temperatura entre 30-32°C, el sexo de los embriones se determina como femenino, diferenciándose sus gónadas en ovarios.

Una vez determinado el sexo genético del individuo, en un momento y tiempo específico del desarrollo embrionario, se expresarán los genes involucrados en la diferenciación sexual gonadal. Durante esta etapa, ocurren una serie de eventos celulares y moleculares que confluyen en la morfogénesis y diferenciación del testículo y del ovario, así como de los genitales internos y externos. Postnatalmente se llevará a cabo la diferenciación sexual del hipotálamo y, durante la madurez sexual, el individuo al adquirir sus características fisiológicas, endocrinológicas como etológicas le permitirán reproducirse.

Por lo anterior, podemos resumir que la diferenciación sexual se puede integrar en tres etapas que se dan en tiempos y espacios específicos: I) determinación, II) diferenciación y III) manifestación. En la primera se lleva a cabo el establecimiento del sexo genético en el momento de la fertilización. En la segunda se expresa el genoma que dirige la morfogénesis y diferenciación del primordio gonadal en testículos u ovarios y el desarrollo de los genitales internos y externos. Postnatalmente ocurrirá la diferenciación sexual del sistema nervioso central, así como la adquisición de los caracteres sexuales secundarios. Por último, en la tercera etapa, se determina la expresión fisiológica y etológica del individuo que culmina con la actividad reproductora.

La diferenciación sexual se ha estudiado en varias especies con diversos enfoques que van desde el morfológico hasta el nivel de la biología molecular. Resultando un vasto cúmulo de información sobre este tema la cual pareciera ser reciente, sin embargo sus bases originales son antiguas.

El objetivo de este trabajo, es describir los antecedentes teóricos y experimentales de la diferenciación sexual en los vertebrados y cómo estos han cambiado con el

tiempo. Para lo cual se resumen cronológicamente a partir de este siglo, las hipótesis y teorías que tratan de explicar este tema. Estas han asentado los precedentes teóricos y experimentales que han permitido conocer un poco más los mecanismos celulares y moleculares por los cuales se forma el testículo o el ovario, así como de los genitales internos y externos. Corroborándose así algunas de las propuestas teóricas originales.

Asimismo, con base en las evidencias experimentales más recientes, se propone una sinopsis en que se integra el papel del gen SRY, la síntesis y acción de las hormonas esteroides sexuales, así como de la hormona inhibidora de los conductos de Müller en la diferenciación del testículo y de los genitales internos y externos en el ratón.

TEORÍA HORMONAL

Al estudiar las estructuras genitales de embriones masculinos de cerdo, Bouin y Ancel (1903) propusieron que el tejido intersticial (tejido a partir del cual se diferencian las células de Leydig) de la gónada indiferenciada, producía una o varias sustancias que regularían la diferenciación del testículo, así como de los genitales con lo cual establecieron las bases de la teoría hormonal de la diferenciación sexual de los vertebrados.

Posteriormente Lillie (1916, 1917) y Keller y Tander (1916) investigaron el free-martinismo en bovinos. Este es un término que se usa para denotar gemelos de diferente sexo (XX, XY) unidos por anastomosis vasculares coriónicas, y en el que el embrión femenino, presenta características sexuales masculinas. Para explicar este fenómeno, estos autores propusieron que la masculinización del embrión femenino era ocasionada por un "agente transformante" secretado por las gónadas del gemelo masculino. Planteando por primera vez que este "agente transformante" era una hormona. La explicación del free-martinismo por Lillie (1916, 1917), y Keller y Tander (1916), abrió un nuevo panorama en el estudio de la diferenciación sexual.

TEORÍA CÓRTICO-MEDULAR DE LA DIFERENCIACIÓN GONADAL

A partir de la teoría hormonal de la diferenciación sexual y con base en sus estudios sobre la diferenciación sexual gonadal en anfibios, Witschi (1934, 1951, 1956, 1967) propone su teoría cortico-medular de la diferenciación gonadal. En ella plantea que el desarrollo gonadal acontece por un crecimiento diferencial de uno de los dos compartimentos que conforman al primordio gonadal (PG) de machos y hembras: la corteza y la médula. El desarrollo de uno de estos compartimentos y la degeneración del otro, se debe a la secreción de dos sustancias antagónicas: la cortexina y la medularina. La corteza del PG de las hembras, al secretar la cortexina estimula su desarrollo e inhibe el de la médula. El proceso anterior da como resultado la diferenciación del ovario (Fig. 1).

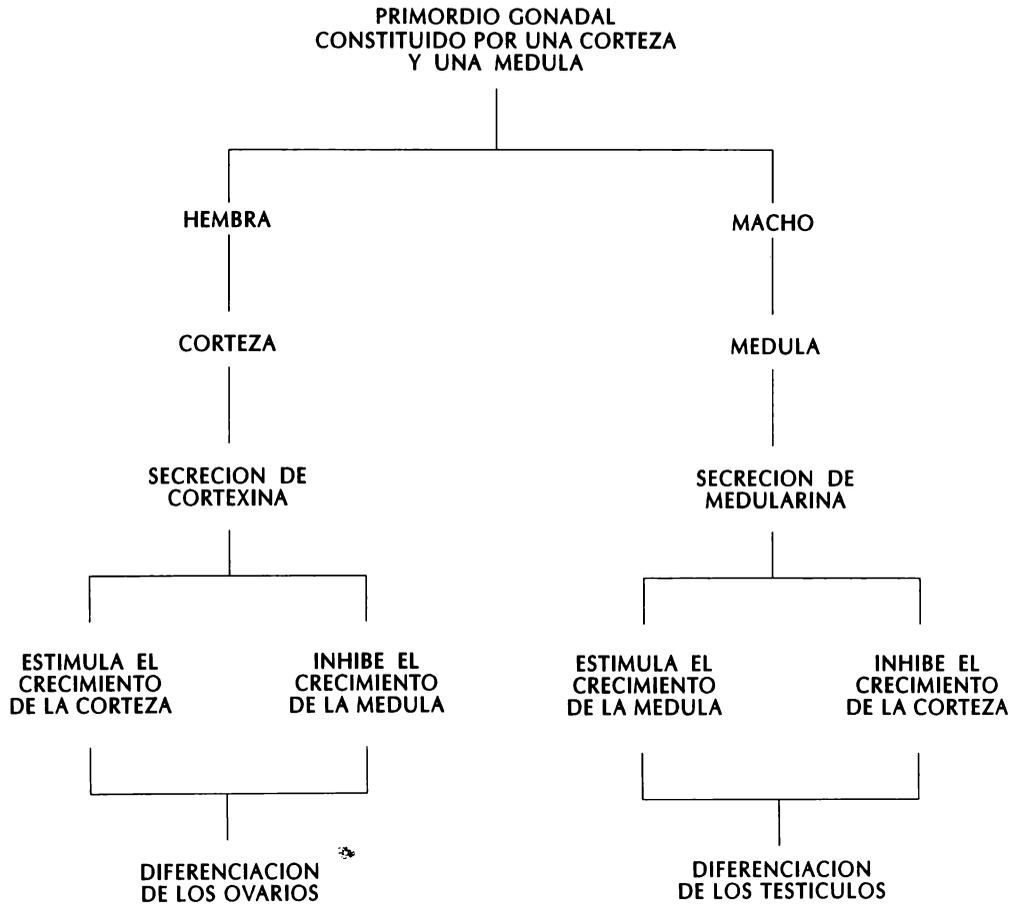


Figura 1

Teoría córtico-medular de Witschi (1951) a partir de la cual se lleva al cabo la diferenciación sexual gonadal en anfibios.

Por otro lado, la médula del PG de los machos al secretar la medularina induce su crecimiento, y provoca la regresión gradual de la corteza; lo cual permite que se lleve al cabo la diferenciación del testículo (Fig. 1). A partir de la observación de que las gónadas embrionarias biosintetizan y secretan esteroides sexuales, se pensó que la cortexina era un estrógeno y la medularina un andrógeno. Sin embargo, Witschi (1967) no aceptó este planteamiento y hasta el presente no se ha demostrado experimentalmente la existencia de estas dos moléculas morfo-reguladoras.

HIPÓTESIS DE LA DIFERENCIACIÓN OVÁRICA ESTRÓGENO DEPENDIENTE

Wolff y Ginglinger (1935 a, b) al estudiar el efecto estrogénico del fluido uterino de aves, que nombraron foliculina, propusieron que esta sustancia era la causante de la diferenciación del PG femenino en el ovario izquierdo. En las aves como una condición normal, sólo se desarrolla el ovario izquierdo y el derecho involuciona.

A esta hipótesis no se le prestó mayor interés a pesar de implicar, por primera vez, a los estrógenos como moduladores de la diferenciación sexual gonadal.

HIPÓTESIS DE LA DIFERENCIACIÓN TESTICULAR ANDRÓGENO DEPENDIENTE

Wolff y Wolff (1951) con base en sus investigaciones sobre la diferenciación sexual gonadal en aves (gallos y patos), propusieron que la diferenciación testicular se lleva al cabo por la acción de los andrógenos, en particular de la testosterona (T). En el macho, durante una fase corta y específica del desarrollo embrionario, la región medular de su PG produce y secreta T; siendo este andrógeno el modulador de la diferenciación testicular. En cambio en las hembras, su PG al no producir andrógenos y/o estrógenos, se diferencia el ovario izquierdo.

HIPÓTESIS CÓRTICO-MEDULAR DE LA DIFERENCIACIÓN GONADAL MEDIADA POR HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES

Wolff y Wolff (1951) al integrar sus resultados en aves con los de Witschi (1934) en anfibios, postularon que la diferenciación del PG en testículos u ovarios, se debe tanto al sexo del embrión como a la producción y secreción de hormonas esteroides sexuales (HES). La producción y secreción de HES referidas por Wolff y Wolff, son la de los andrógenos (T) y estrógenos (estradiol, E2). Proponiendo además que la T y el E2, modulan de manera dual el crecimiento e inhibición de uno de los dos compartimentos del PG.

En los machos la T secretada por la médula, estimula el crecimiento de esta zona e inhibe el de la corteza, lo que permite que se lleve al cabo la diferenciación testicular (Fig. 2). Por el contrario, en las hembras la corteza al producir y secretar E2, estimula su crecimiento e inhibe el de la médula resultando la diferenciación de los ovarios (Fig. 2).

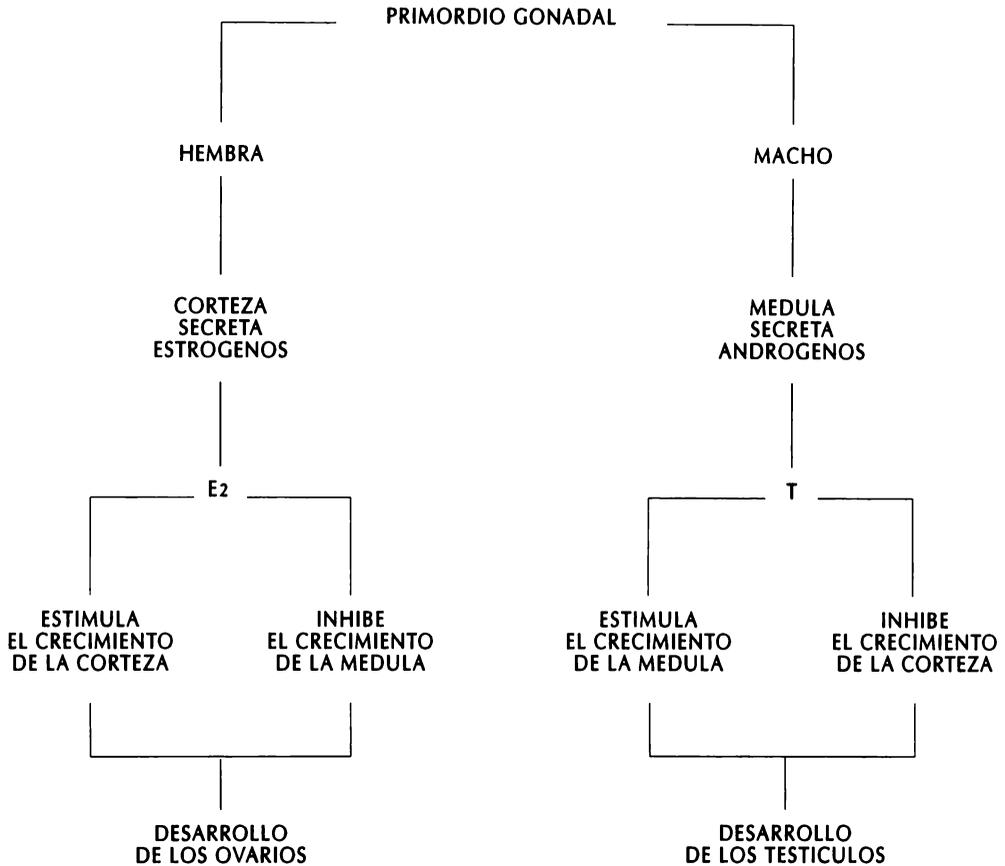


Figura 2

Hipótesis de la diferenciación sexual gonadal córtico-medular mediada por las hormonas esteroideas sexuales propuesta por Wolff y Wolff (1951). E2 = estradiol; T = testosterona.

HIPÓTESIS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL MASCULINA MEDIADA POR ANDRÓGENOS Y LA HORMONA INHIBIDORA DE LOS CONDUCTOS DE MÜLLER

Los estudios realizados por Jost (1953) en mamíferos a partir de los años 40's, revolucionaron los conceptos que se conocían sobre la diferenciación sexual en anfibios (Gallien, 1973), reptiles (Raynaud y Pieau, 1985) y aves (Wolff y Wolff, 1951). Además los hallazgos de Jost, se consideran en la actualidad como el "dogma" de la diferenciación sexual en los mamíferos. Sus trabajos se pueden resumir como sigue:

1. Si se extirpan las gónadas tanto a embriones de conejos femeninos y masculinos antes de la diferenciación sexual gonadal, se desarrollan los conductos de Müller en ambos sexos y en los machos involucionan los conductos de Wolff. De estas observaciones Jost concluyó: i) el ovario no es un inductor primario de la diferenciación de los conductos de Müller en los fetos femeninos, y ii) el testículo produce factores químicos que causan la diferenciación de los conductos de Wolff, provocando la regresión de los conductos de Müller.
2. La administración de andrógenos a hembras y machos de conejo durante la diferenciación sexual gonadal no afecta el desarrollo de los conductos de Müller; mientras que los conductos de Wolff presentaron diversos grados de diferenciación. De estos resultados Jost sugirió que el testículo produce dos sustancias que regulan la diferenciación de los caracteres sexuales secundarios: un inhibidor de los conductos de Müller (paramesonéfricos) y un estimulador del desarrollo de los conductos de Wolff (mesonéfricos).

Actualmente se sabe que el inhibidor de los conductos de Müller es una glicoproteína denominada hormona anti-Mülleriana (HAM) (Lee *et al.*, 1993) y que es semejante al factor de crecimiento transformante β (β TGF, β transforming growth factor; Wilson *et al.*, 1993). Esta hormona es producida por las células de soporte o de Sertoli, la cual provoca la muerte de las células de los conductos de Müller. La HAM al estar ausente en las hembras, da lugar al desarrollo de los oviductos, úteros y la parte superior de la vagina.

El "estimulador" del desarrollo de los conductos de Wolff es la T que promueve la diferenciación de estos conductos en los genitales internos: epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales y conducto eyaculador. Por otro lado, la T al ser 5α -reducida se biotransforma en 5α -dihidro-testosterona (DHT), hormona que estimula el desarrollo de los genitales externos: el pene y el escroto (Lobaccaro y Sultán, 1992).

En base a sus observaciones morfológicas, Jost (1953) propone que hay dos eventos consecutivos en la diferenciación sexual masculina en los mamíferos: la diferenciación primaria y la secundaria. En la diferenciación primaria, acontecen la morfogénesis y la diferenciación del PG en un testículo (Merchant-Larios y Taketo,

1991). Esta gónada queda constituida por tejido intersticial o esteroidogénico, así como por túbulos seminíferos. El tejido intersticial se desarrolla y se diferencia en las células de Leydig que secretarán T. Por su parte, los túbulos seminíferos quedan conformados por las células germinales primordiales que se diferenciarán en espermatogonias, así como por las células de Sertoli que secretarán la HAM, que provocará la subsecuente muerte de las células de los conductos de Müller (Fig. 3).

Durante la diferenciación sexual secundaria, la T secretada por las células de Leydig, regula el desarrollo y diferenciación de los conductos de Wolff en los genitales internos, así como establecer los caracteres sexuales secundarios. Mientras que la DHT promueve el desarrollo de los genitales externos (Fig. 3).

TEORÍA DEL CRECIMIENTO DIFERENCIAL

En esta teoría propuesta por Mittwoch (1971), se intentó explicar la diferenciación sexual gonadal en aves y mamíferos. Planteando que la presencia del cromosoma sexual Y en los mamíferos, y su homólogo W en las aves, durante una etapa específica del desarrollo propicia que el PG tenga un crecimiento rápido debido al incremento de ciclos celulares cortos. En los mamíferos esto favorecería el desarrollo y crecimiento de los testículos, y en las aves el del ovario izquierdo. Por otro lado, la ausencia del cromosoma Y o W en el sexo homogamético, provocaría que el PG se desarrolle más lentamente debido a que tiene ciclos celulares prolongados. Lo anterior provoca el crecimiento de los ovarios en los mamíferos y de los testículos en las aves.

TEORÍA DEL ESTEROIDÓMERO

Lepori (1980) al integrar las observaciones descritas sobre la diferenciación gonadal y de los genitales internos y externos, así como la bioquímica de las HES y su participación en la diferenciación sexual, propone la teoría del esteroidómero. En esta teoría se sugiere el desarrollo en el embrión de territorios especializados o esteroidómeros que sintetizan y secretan HES. Los esteroidómeros se originan de una porción de las placas laterales del mesodermo y que van desarrollándose en dirección medio-lateral (Fig. 4). Los esteroidómeros son cuatro: el de corticosteroides (C), el de progestágenos (P), el de andrógenos (A) y el de estrógenos (E). El esteroidómero C se desarrolla del blastema interrenal y está destinado a sintetizar corticosteroides. El esteroidómero P se desarrolla a partir de las células somáticas de la gónada y produce progesterona. Esta región correspondería a la médula en la teoría córtico-medular de Witschi (1951).

El esteroidómero A es un derivado de la región medular del blastema gonadal del que se originará el estroma. De este compartimento se desarrollan las células de Leydig que biosintetizan T, andrógeno responsable de la organización de los túbulos seminíferos del testículo. El esteroidómero E está comprometido para biosintetizar estrógenos como el E2, el cual participará en el desarrollo de los ovarios y de los caracteres secundarios femeninos.

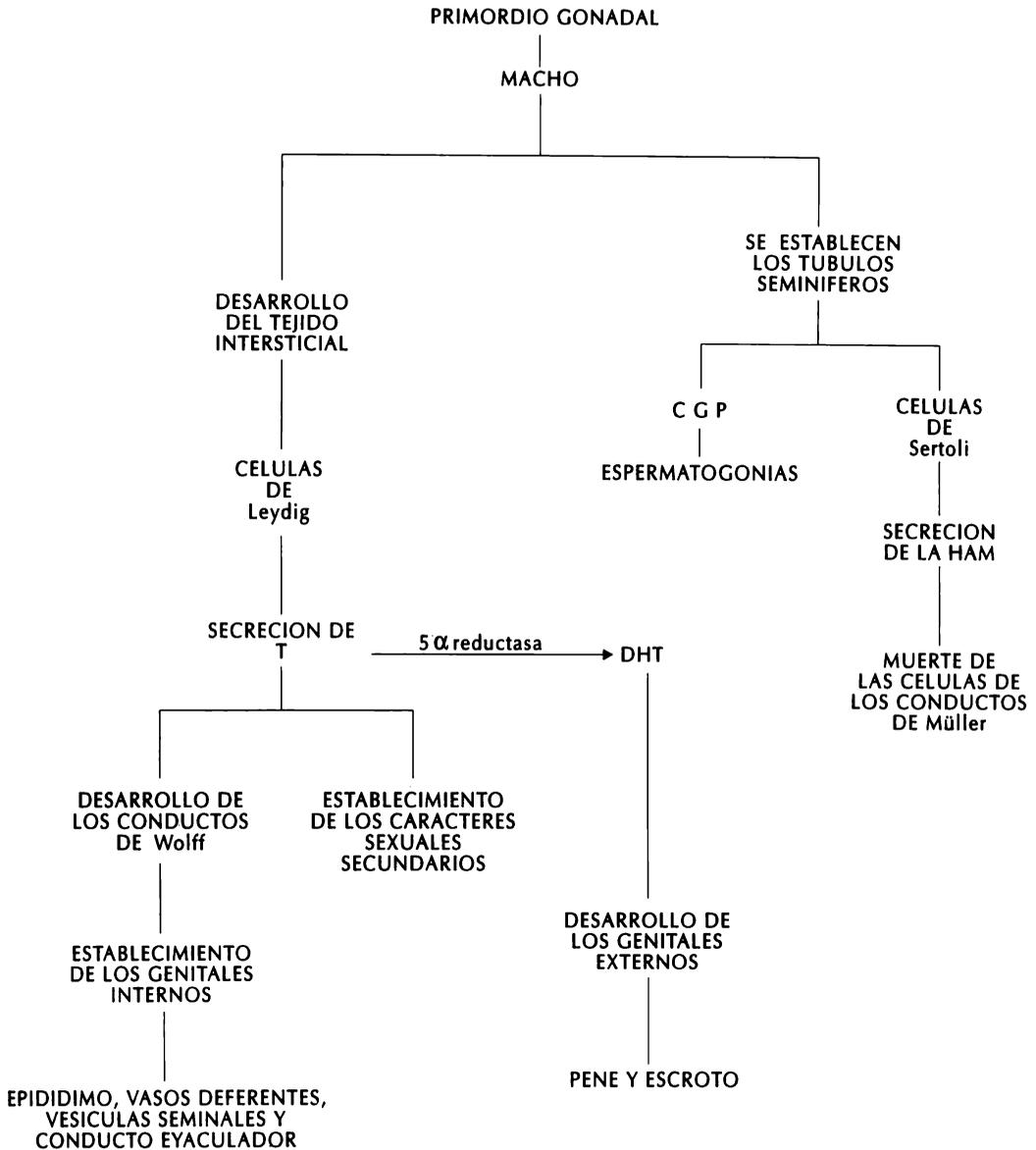


Figura 3

Hipótesis de Jost (1953) que describe como se lleva al cabo la diferenciación sexual gonadal masculina en los mamíferos. T = testosterona; DHT = 5α-dihidro-testosterona; CGP = células germinales primordiales; HAM = hormona anti-Mülleriana.

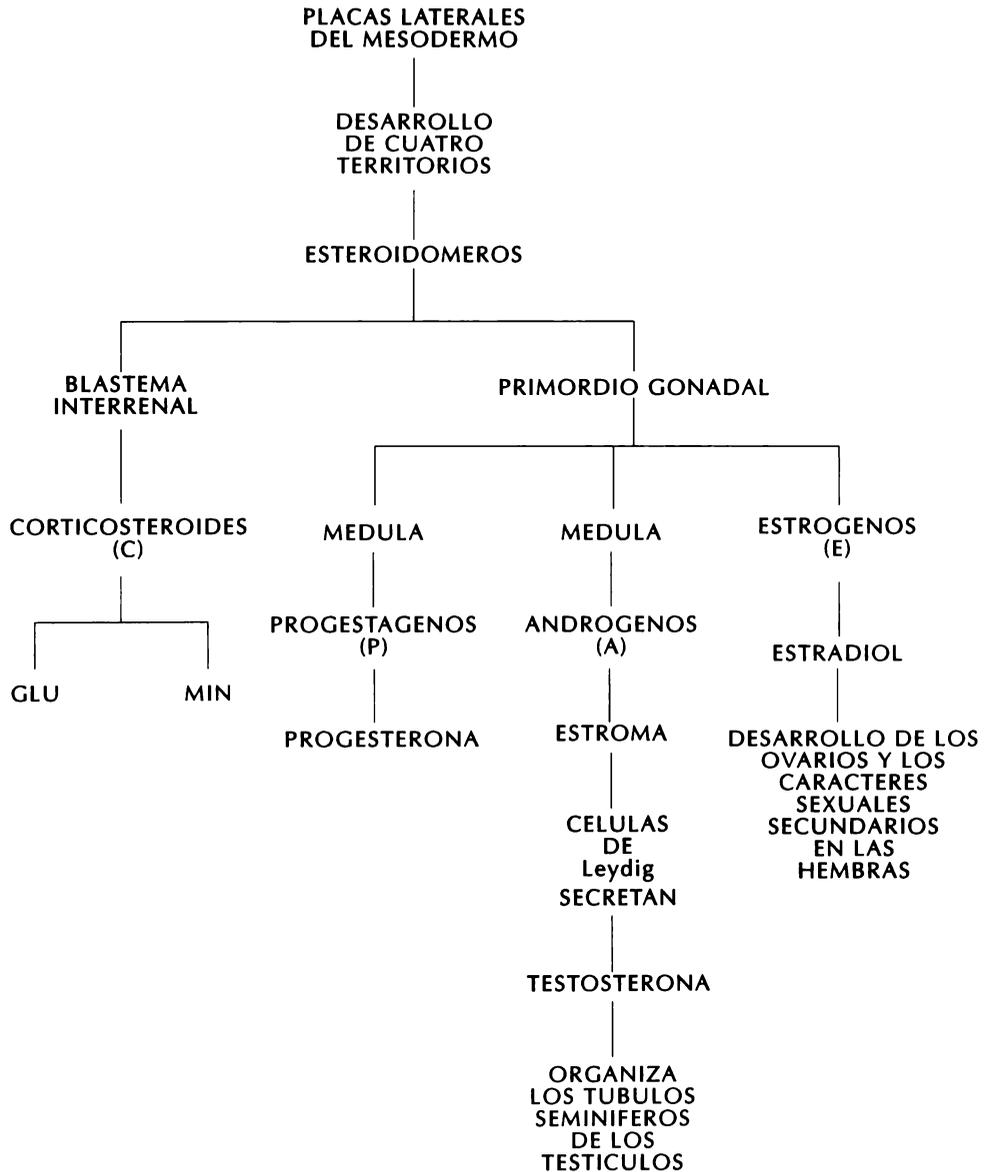


Figura 4

Teoría del esteroidómero sugerida por Lepori (1980), a partir de la cual trata de explicar la diferenciación sexual en las aves y mamíferos. GLU = glucocorticoides (v. gr., cortisol); MIN = mineralocorticoides (v. gr., aldosterona).

Sin embargo, Lepori no propuso que hubiese una interacción de los esteroidómeros para explicar la diferenciación gonadal. A este respecto, Merchant y Villalpando (1990) demostraron que en una tortuga marina (*Lepidochelys olivacea*) con determinación sexual por temperatura, es necesaria una interacción mesonéfrs-gónada. Lo cual involucraría la interacción de los cuatro esteroidómeros para que se diferencie la gónada.

TEORÍA DEL SEXO ANHORMONAL Y ALTERNATIVO

Vannini (1986) plantea que en los individuos XX, que denomina sexo neutro o anhormonal, la organogénesis de los ovarios está determinada por un programa genético en el que no participan las HES (anhormonal). Una vez que se han establecido los ovarios, estos secretarán un estrógeno que modificará el fenotipo general del animal e inducirá el desarrollo y establecimiento de la mayoría de los caracteres sexuales secundarios.

En los individuos XY denominado por Vannini sexo alternativo o emergente, la diferenciación gonadal y la estructuración de los genitales, se debe al balance genético resultante de esta asimetría. Lo anterior permite que se exprese el o los loci del factor determinante del testículo (denominado TDF en el humano o Tdy en el ratón y otras especies).

En mamíferos se ha identificado y caracterizado en el brazo corto del cromosoma sexual Y, el gen putativo determinante del testículo (Koopman *et al.*, 1991; Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). Este gen se encuentra presente en una sola copia y es denominado SRY (sex-determining region of the Y chromosome) en el humano y su homólogo Sry en el ratón y otras especies. Se ha planteado que el producto del gen SRY/Sry desencadena la cascada de eventos moleculares involucrados en la organogénesis de los testículos (Koopman *et al.*, 1991) y por ello se le considera como el TDF (Hacker *et al.*, 1995).

TEORÍA INTEGRATIVA

Con base en la teoría hormonal, del esteroidómero y correlacionando la presencia del antígeno H-Y en los mamíferos y su homólogo H-W en las aves, Vannini (1986) plantea la teoría integrativa de la diferenciación gonadal en aves y mamíferos. El antígeno H-Y es un antígeno de histocompatibilidad que anteriormente se había propuesto como el TDF. Sin embargo, actualmente se ha descartado su participación en la diferenciación gonadal (Simpson *et al.*, 1987; McLaren *et al.*, 1984).

En breve, Vannini propone que las células somáticas (células diploides que sólo se dividen por mitosis) de un embrión con sexo heterogamético secretan en forma espontánea el antígeno H-Y/H-W. Además de que este antígeno, aumenta sus receptores a nivel de la membrana citoplasmática de las células que conforman a los esteroidómeros. Esta inducción primaria estimula a que los esteroidómeros inicien la biosíntesis de las HES típicas del sexo heterogamético, que dependiendo de la especie será la T o el E2.

Estas hormonas regularán tanto la biosíntesis del antígeno H-Y/H-W, así como de su receptor de superficie únicamente en las células somáticas del PG. Lo anterior propicia el que se lleven al cabo los procesos morfogénicos de la diferenciación gonadal del sexo heterogamético (el ovario izquierdo en las aves y de los testículos en los mamíferos).

HIPÓTESIS DE LA DIFERENCIACIÓN GONADAL A PARTIR DE LA RELACIÓN DE ESTEROIDES SEXUALES

Retomando la teoría hormonal, el papel de las hormonas esteroides en la fisiología reproductiva, así como la regulación en la biosíntesis de estrógenos, Bogart (1987) propone una hipótesis con la cual trata de explicar la diferenciación sexual gonadal (determinación sexual primaria) tanto en invertebrados como en vertebrados. Él plantea que en todos los animales la diferenciación gonadal se determina a partir de la relación local entre andrógenos y estrógenos. Si la concentración de andrógenos es mayor que la de los estrógenos, se llevará al cabo la diferenciación testicular. Por el contrario, si la concentración de los estrógenos es mayor que la de los andrógenos, se diferenciarán los ovarios.

HIPÓTESIS DE LA DIFERENCIACIÓN TESTICULAR AUTÓNOMA

Burgoyne *et al.*, (1988) abordaron el problema de la diferenciación sexual gonadal utilizando ratones quimera XX \leftrightarrow XY que resultan al combinar durante la etapa de segmentación embriones femeninos XX con embriones masculinos XY (Le Douarin y McLaren, 1984). Con base en sus estudios plantean que la organización en el PG masculino de los cordones sexuales medulares y el establecimiento de los túbulos seminíferos acontecen autónomamente, es decir sin la participación del cromosoma sexual Y. Además, cuestionan la existencia de una molécula mensajera que difunda para organizar el testículo (v. gr., los túbulos seminíferos).

Por otro lado, Palmer y Burgoyne (1991) a partir de sus estudios en ratones XX \leftrightarrow XY e integrándolos con el Sry, plantean el siguiente modelo de la diferenciación gonadal masculina (Fig. 5). En un estadio determinado del desarrollo embrionario masculino, se expresa el gen Sry en las células que conformarán la línea celular de soporte. Siendo estas las células de Sertoli, que son las primeras en diferenciarse durante la morfogénesis del testículo (McLaren, 1991; Magre y Jost 1991). Las células de Sertoli regularán durante la morfogénesis del testículo: i) la estructuración de los cordones testiculares; ii) la diferenciación de la línea germinal en proespermatozonias; iii) la producción de un factor inhibidor de la meiosis; iv) la diferenciación de la línea esteroidogénica en células de Leydig, y v) la estructuración del tejido conectivo que dará origen a la túnica albugínea y a los vasos sanguíneos. Por otra parte, aunada a la serie de procesos regulados por las células de Sertoli antes mencionados, Münsterberg y Lovell-Badge (1991) sugieren que en estas células el péptido Sry regula la expresión del gen de la HAM.

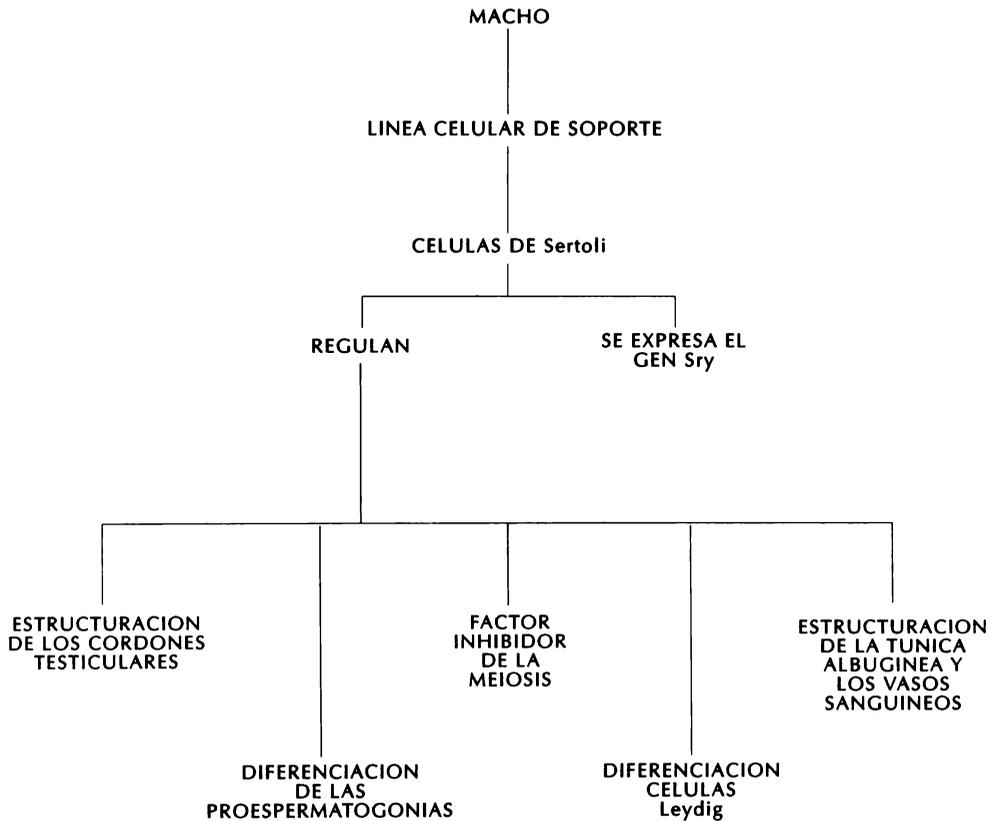


Figura 5

Hipótesis de la diferenciación testicular en el ratón propuesta por Palmer y Burgoyne (1991). Sry = sex-determining region of the Y chromosome.

SRY Y LA DIFERENCIACIÓN TESTICULAR

En mamíferos el desarrollo testicular se inicia a partir de la expresión del gen SRY/Sry (Hacker *et al.*, 1995), cuyo transcrito es una proteína que tiene una alta homología con proteínas nucleares no histonas de alta movilidad (HMG1 y HMG2) (Payen y Cotinot, 1993). La proteína SRY/Sry se une a un motivo o sitio de unión a determinadas secuencias de ADN (Giese *et al.*, 1994) a través de un mecanismo aún desconocido. En base a los hallazgos anteriores, se ha propuesto que la proteína SRY/Sry es un factor de transcripción (péptido) (Nasrin *et al.*, 1991) que dirige la acción de otros genes, como por ejemplo del gen Sox9 (Morais da Silva *et al.*, 1996), a partir de los cuales se desencadena la cascada de eventos moleculares que controlan el desarrollo testicular (Bianchi, 1991).

Para explicar la diferenciación sexual gonadal masculina en los mamíferos, McElreavey *et al.*, (1993) propusieron la hipótesis de la "regulación en cascada". En esta hipótesis se propone la participación de dos genes, el SRY y el "Z", localizado este último en un cromosoma autosómico. La regulación de ambos genes induciría la diferenciación testicular. Al transcribirse el gen SRY la proteína SRY al unirse al gen "Z" reprimirá su transcripción provocando el "encendido" de los genes testículo determinantes. Por otro lado, en ausencia del gen SRY se expresará el gen "Z" inhibiendo o "apagando" su proteína los genes testículo determinantes, resultando el desarrollo de los ovarios.

Otra proposición que trata de describir la ontogenia de los eventos involucrados en la diferenciación testicular del ratón es el ofrecido por Shen *et al.*, (1994). Una vez llevada al cabo la transcripción del gen Sry, se inicia el primer evento morfológico de la diferenciación testicular: el rearrreglo de las células de Sertoli en los cordones medulares. Simultáneamente las células de Sertoli por acción de la proteína Sry, se regulará la transcripción y secreción de la HAM. De manera paralela a la secreción de la HAM, la proteína Sry en las células de Leydig regulará la expresión de algunas enzimas involucradas en la producción de HES. Siendo las HES los moduladores en la morfogénesis gonadal (Luo *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994). Sin embargo, aún no se conoce en que línea(s) celulare(s) de la gónada indiferenciada se expresa el gen Sry y como se regula su expresión. Desconociéndose además los mecanismos a través de los cuales la proteína Sry regula la transcripción de los genes involucrados en la cascada de eventos de la morfogénesis y diferenciación testicular.

DISCUSION

En las hipótesis y teorías anteriormente descritas, se aprecian tres corrientes en común. La primera es la participación de las HES en la diferenciación sexual gonadal; la segunda es la referente a los mecanismos morfogenéticos implicados en la diferenciación del PG en un testículo o en un ovario y, la tercera, es la regulación de la expresión y el mecanismo de acción del péptido del gen SRY/Sry durante la diferenciación testicular.

Las HES no sólo son piezas clave en la fisiología reproductiva de los vertebrados, sino que también actúan en la diferenciación sexual. A este respecto, está bien establecido su papel en la reversión sexual gonadal en peces (Hunter y Donaldson, 1983), anfibios (Villalpando y Merchant, 1990), reptiles (Merchant *et al.*, 1997), aves (Scheib, 1983) y mamíferos (marsupiales) (Burns, 1961), así como su participación en el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios (Lobaccaro y Sultán, 1992).

También se ha demostrado que hay una correlación entre el evento morfológico de la diferenciación gonadal y el metabolismo particular de esteroides sexuales (peces: Feits *et al.*, 1990; reptiles: Desvages *et al.*, 1993; aves: Imataka *et al.*, 1988).

Recientemente demostramos en una tortuga marina (*L. olivacea*) cuyo sexo se determina por efecto de la temperatura de incubación, en el periodo de determinación sexual, hay un metabolismo diferencial de HES. En las gónadas de los machos y las hembras se favorece el metabolismo de los andrógenos; siendo mayor en las gónadas de las hembras. Por su parte, en el cerebro de los machos y las hembras se favorece el metabolismo de los estrógenos; siendo mayor en el cerebro de las hembras (Salame-Méndez *et al.*, 1997). Sugiriéndose que el cerebro en esta especie de tortuga, es uno de los sensores primarios de la determinación del sexo. En esta misma especie de tortuga marina, Merchant *et al.*, (1989) describieron la presencia de terminaciones nerviosas en las gónadas femeninas en diferenciación. Las dos evidencias anteriores, han permitido proponer al sistema nervioso central, como modulador en la morfogénesis gonadal en quelonios sexo-termodependientes a través de los estrógenos.

Aunado a las evidencias antes mencionadas, se ha demostrado que durante la diferenciación gonadal, hay diferencias en la expresión de genes productores de enzimas esteroidogénicas (Greco y Payne, 1994; Lee y Taketo, 1994). En aves demostramos que el gen de la enzima citocromo P450-aromatasa (enzima que biotransforma andrógenos en estrógenos), se transcribe en las gónadas de hembras durante la etapa de gónada indiferenciada (Villalpando obs. pers.). La temprana presencia de la aromatasa y del E2 sugiere que este estrógeno podría participar en el encendido de otros genes autosómicos y/o sexuales que regularían la morfogénesis y diferenciación sexual del ovario en las aves. Apoyando por una parte la hipótesis de la diferenciación ovárica estrógeno dependiente de Wolff y Ginglinger (1935 a, b), así como la de Bogart (1987) sobre la relación de estrógenos y andrógenos para la diferenciación gonadal femenina.

Otra estrategia experimental que ha permitido constatar la participación de las HES en la diferenciación sexual gonadal, es hacer mutaciones dirigidas en genes productores de enzimas esteroidogénicas. Esta estrategia experimental permitió a Luo *et al.*, (1994) demostrar en el ratón que al mutar el gen de las hidroxilasas no hay desarrollo gonadal. Sin embargo, falta realizar un análisis ultraestructural con microscopía de transmisión, que permitiría saber los tipos celulares somáticos que prevalecen en estos ratones. A partir de lo cual, se podrían esclarecer un poco más los mecanismos celulares y moleculares de la morfogénesis gonadal.

La acción de las HES como de otros ligandos es regulada por receptores localizados en el núcleo celular, los cuales son péptidos gen específicos denominados factores de transcripción. Entre los factores de transcripción se encuentran receptores llamados huérfanos porque su ligando se desconoce. Uno de estos receptores nucleares es el denominado factor esteroidogénico-1 (SF-1). Este factor es clave en la regulación de la función endócrina del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, de la corteza adrenal, así como de ser un factor esencial en la diferenciación sexual (Parker y Schimmer, 1997). Nelson y colaboradores(1993) sugieren que el SF-1 regula la

expresión del gen Cyp11A siendo su producto una enzima citocromo P450 esteroide-hidroxilasa, responsable de desprender la cadena lateral hidrocarbonada del colesterol (Lala *et al.*, 1992). Esta reacción es el paso limitante en la biosíntesis de las HES, y la enzima responsable se denomina 20,22-desmolasa (20,22D o P450scc).

Durante la diferenciación sexual gonadal del ratón, Ikeda *et al.*, (1994) estudiaron la expresión de los genes SF-1 y 20,22D (Cyp11A). Constatando que el gen SF-1 se expresa en el PG de ambos sexos a partir de los 9 días postcoito (dpc), así como en las gónadas indiferenciadas de 11 dpc y diferenciadas de 12.5 dpc. Por su parte, el gen de la 20,22D tiene una expresión diferencial entre las gónadas de ambos sexos. En los testículos se hace evidente a partir de embriones de 12.5 dpc, mientras que en los ovarios se expresa a partir de los de 17.5 dpc.

Estudiando la producción de HES durante la diferenciación sexual gonadal del ratón, se ha demostrado lo siguiente (Salame-Méndez obs. pers.). Las gónadas de embriones XY y XX de 10.5 dpc producen pregnenolona (P5), que es el esteroide sexual a partir del cual se inicia la biosíntesis de las HES. A los 11.5 dpc tiempo en que se expresa el gen Sry, las gónadas de los embriones XY producen progesterona (P4), no así las gónadas de los embriones XX. A partir de los 12.5 dpc, tiempo en que se inicia la expresión del gen de la HAM en las células de Sertoli y su proteína inicia la apoptosis de los conductos de Müller, los testículos producen T. Mientras que los ovarios de los fetos de la misma edad solamente producen P5 y P4. Estos resultados nos permiten tener una secuencia en la biosíntesis de la T durante la diferenciación testicular del ratón. En las gónadas XY de 10.5 dpc al haber P5, es evidente la participación de la enzima 20,22D, la cual biotransforma el colesterol en P5. A los 11.5 dpc al producir P4 indica la actividad de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β -HED), que biotransforma la P5 en P4. Al producir los testículos T a partir de los 12.5 dpc, indica que la P4 debe ser biotransformada en 17 α -P4 por acción de la enzima citocromo P450 hidroxilasa (P45017 α).

Tomando en consideración las evidencias anteriormente descritas, así como los esquemas planteados por Jost (1953), y por Palmer y Burgoyne (1991), damos la siguiente sinopsis de la diferenciación sexual masculina del ratón (Fig. 6).

En las gónadas indiferenciadas de embriones XY, a partir de los 11.5 dpc se llevarán al cabo los siguientes eventos. El gen Sry se expresará en la línea celular comprometida a ser esteroideogénica (pre-Leydig) y/o en la comprometida a ser de soporte (pre-Sertoli). En las células pre-Leydig el péptido Sry regulará la expresión del gen SF-1, y este factor de transcripción regulará la expresión del gen Cyp11A. El producto del gen Cyp11A, que es la enzima 20,22D, ésta efectuará la biosíntesis de la P5. Como consecuencia, se incrementará la actividad de la enzima 3 β -HED, que biotransformará a la P5 en P4.

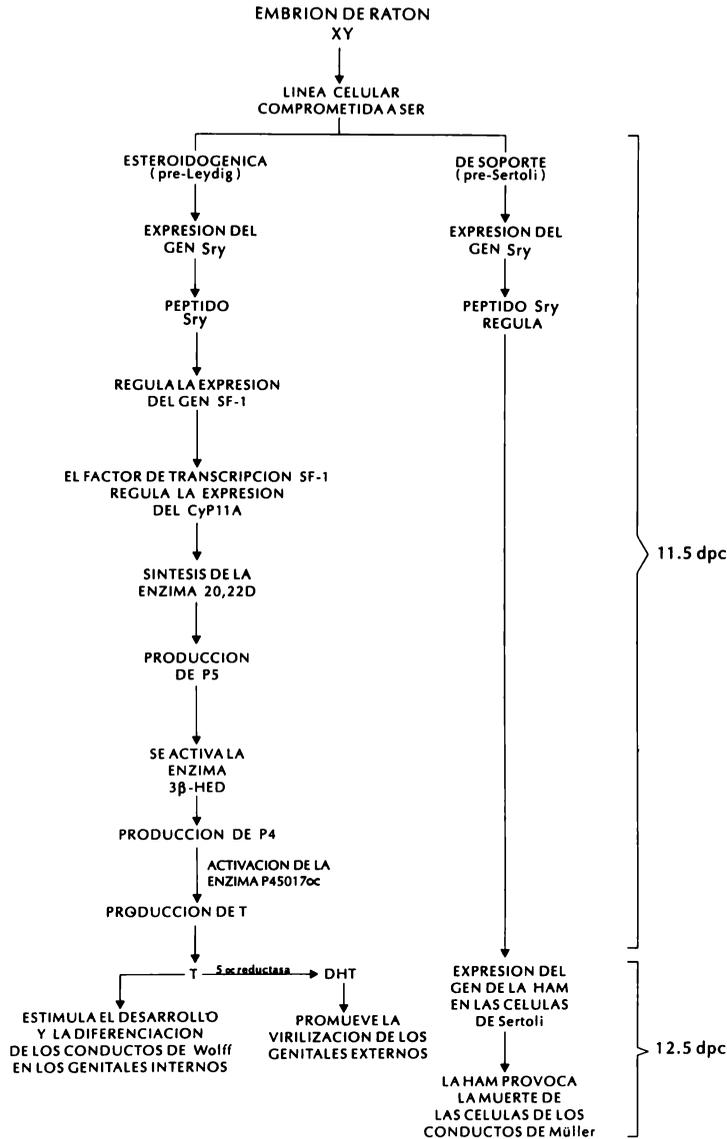


Figura 6

Esquema de la diferenciación sexual masculina en el ratón. XY = sexo heterogamético; Sry = sex-determining region of the Y chromosome; SF-1 = factor esteroideogénico 1; Cyp11A = gen que regula la síntesis de enzimas citocromo P450 hidroxilasas; 20,22D = enzima 20,22 desmolasa; P5 = pregnenolona; 3β-HED = enzima 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; P4 = progesterona; P45017α = enzima citocromo P45017α-hidroxilasa; T = testosterona; DHT = 5α-dihidro-testosterona; HAM = hormona anti-Mülleriana.

A partir de los 12.5 dpc las células de Leydig producen T, utilizando como precursor a la P4 a partir de la activación de la enzima P45017 α . La T secretada por las células de Leydig estimulará el desarrollo y diferenciación de los conductos de Wolff en los genitales internos. La T al ser 5 α -reducida en sus tejidos blanco, la DHT promoverá la virilización de los genitales externos. Por su parte, a los 12.5 dpc en las células de Sertoli se expresará el gen de la HAM, siendo regulada la expresión de este gen por el péptido Sry. Provocando la HAM la gradual muerte de las células de los conductos de Müller.

Aún cuando hoy sabemos un poco más sobre algunos aspectos genéticos, celulares y moleculares de la diferenciación sexual gonadal en los vertebrados, aún restan varias preguntas por resolver. Entre las cuales están, por ejemplo: ¿qué regula la expresión del gen Sry?; ¿en que líneas celulares somáticas se expresa el gen Sry?; ¿el péptido Sry que otros genes y cómo los regularía durante la morfogénesis testicular?; ¿cuáles son los mecanismos por los cuales los andrógenos y estrógenos regulan la diferenciación gonadal?. Estas preguntas dejan ver el estado del arte en que actualmente se encuentra este campo de estudio dentro de la zoología.

Por último, cabe señalar que la información actualmente obtenida en este tema, así como en otros temas dentro de las ciencias biológicas, pareciera ser totalmente original. Sin embargo, las evidencias y las conclusiones de ellas obtenidas se sustentan en previos antecedentes teóricos y experimentales muy bien fundamentados, los cuales para algunos investigadores son desconocidos y para otros han sido olvidados.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alondra Castro Campillo, a los Drs. Adolfo Rosado García y José Ramírez Pulido, así como a los dos revisores anónimos, nuestro agradecimiento por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo. Se agradece a la Srita. Laura Martínez Gómez por su asistencia secretarial y al Arq. Raymundo González Coronel por el desarrollo de las figuras. Los resultados de los trabajos mencionados han sido apoyados parcialmente por donativos CBS-UAMI-1403029 para ASM y DGAPA-UNAM-1N215296 para IVF.

LITERATURA CITADA

- Bianchi, N.O.** 1991. Sex determination in mammals. How many genes are involved?. *Biol. Reprod.* 44:393-397.
- Bogart, H.M.** 1987. Sex determination: A hypothesis based on steroid ratios. *J. Theor. Biol.* 128:349-357.
- Bouin, P. & P. Ancel.** 1903. Sur la signification de la glande interstitielle du testicule embryonnaire. *Com. Rend. Soc. Biol.* 55:1683-1684.

- Burgoyne, P.S., M. Buher, P. Koopman, J. Rossant & A. McClaren.** 1988. Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XY \leftrightarrow XX chimaeric testes. *Development* 102:443-450.
- Burns, K.R.** 1961. Role of hormones in the differentiation of sex. *In*: E. Allen (ed) *Sex and Internal Secretions*. Williams and Wilkins Co., Baltimore. USA. 1st. ed. pp. 76-158.
- Desvages, G., M. Girondot & C. Pieau.** 1993. Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle *Dermochelys coriacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 92:54-61.
- Ewert, M.A. & C.E. Nelson.** 1991. Sex determination in turtles: diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia* 1:50-69.
- Feits, G., M.S. Fitzpatrick, J.M. Reeding & C.B. Schreck.** 1990. Sex steroid profiles of chosalmon, *Oncorhynchus kisutch*, during early development and sexual differentiation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:299-313.
- Gallien, L.** 1973. Différenciation et organogénèse sexuelle de métazoaires. *Masson et. C. Paris*.
- Giese, K., J. Pagel & R. Grosschedl.** 1994. Distinct DNA binding properties of the HMG domain of murine and human SRY. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:3368-3372.
- Greco, T.M. & A.H. Payne.** 1994. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135:262-268.
- Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Mustenberg, N. Vivian, P. Goodfellow & R. Lovell-Badge.** 1990. A member of a novel family of embryonically expressed genes mapping to the sex-determining region of the mouse y chromosome. *Nature* 346:145-150.
- Hacker A., B. Capel, P. Goodfellow & R. Lovell-Badge.** 1995. Expression of Sry, the mouse determining gene. *Development* 121:1303-1614.
- Hunter, G.A. & E.M. Donaldson.** 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. *In*: W.S. Hoar, D.J. Randall, and E.M. Donaldson (eds). *Fish Physiology*. Academic Press, New York/London. vol 9B. pp 223-303.
- Ikeda, Y., W.H. Shen, H.A. Ingraham & K.L. Parker.** 1994. Development expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8:654-662.
- Imataka, H., K. Susuki, H. Inano, K. Kohmoto & B. Tamaoki.** 1988. Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: the sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71:413-418.
- Jost, A.** 1953. Problems of fetal endocrinology: The gonadal and hypophyseal hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* 8:379-418.
- Keller, K. & J. Tander.** 1916. Über des Verhalten der Eihuate bei der Zwillingsstrichtigkeit des runder. Untersuchungen über die hungursache der geschlecht lichen unterentwicklung von weiblichen zwillingskalbern, welche neben einem männlichen kalbe zur entwicklung gelangen. *Wien Tierztl. Wchnschr.* 3:513.
- Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow & R. Lovell-Badge.** 1991. Male development of cromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.

- Lala, D.S., D.A. Rice & K.L. Parker. 1992. Steroidogenic factor-1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1. *Mol. Endocrinol.* 6:1249-1258.
- Le Douarin, N. & A. McLaren (eds) 1984. *Chimeras in Development Biology*. Academic Press. London and New York.
- Lee, C.H., T. Taketo. 1994. Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6.Ydom sex-reverse mouse gonad. *Developmental Biol.* 165:442-452.
- Lee, M.M., K. Tatsuo & P.K. Donahoe. 1993. Mullerian inhibiting substance. In: Claude Desjardins and Larry L. Ewing (eds). *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press. Oxford. pp. 108-126.
- Lepori, N.G. 1980. Sex differentiation, hermaphroditism and intersexuality in Vertebrates including man. *Peccini Medical Books, Padova. Italy*.
- Lillie, F.R. 1916. The theory of freemartin. *Science* 43:611-613
- , 1917. The freemartin: a study of the action of sex hormones in the fetal life of cattle. *J. Exp. Zool.* 23:371-452.
- Lobaccaro, J.M. & C. Sultán. 1992. La différenciation sexuelle normale: Génétique et endocrinologie moléculaires. *Com. Ren. Soc. Biol.* 186:314-331.
- Luo, X., Y. Ikeda & K.L. Parker. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- Magre, S. & A. Jost. 1991. Sertoli cells and testicular differentiation in the rat fetus. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19:172-188.
- Mittwoch, U. 1971. Sex determination in birds and mammals. *Nature* 231: 423-434.
- McElreavey, K., E. Vilain, N. Abbas, I. Herskowitz & M. Fellous. 1993. A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:3368-3372.
- McLaren, A. 1991. Development of the mammalian gonad: The fate of the supporting cell lineage. *BioEssays* 13:151-156.
- McLaren, A., E. Simpson, K. Tomonari, P. Chandler & H. Hogg. 1984. Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312:552-555.
- Merchant-Larios, H., S. Ruiz-Ramirez, N. Moreno-Mendoza & A. Marmolejo-Valencia. 1997. Correlation between thermosensitive period, estradiol response and gonadal differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107:373-385.
- Merchant-Larios, H. & T. Taketo. 1991. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19:158-171.
- Merchant-Larios, H. & I. Villalpando-Fierro. 1990. Effect of temperature on gonadal sex differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*: An organ culture study. *J. Exp. Zool.* 54:37-331.
- Merchant-Larios, H., I. Villalpando-Fierro & B. Centeno-Urruiza. 1989. Gonadal morphogenesis under controlled temperature in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Herpetological Monographs*. 3:43-61.
- Morais da Silva, S., A. Hacker, V. Harley, P. Goodfellow, A.A. Swain & R. Lovell-Badge. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.*, 14:6-68.
- Münsterberg, A. & R. Lovell-Badge. 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113:613-624.

- Nasrin, N., C. Buggs, X.F. Kong, J. Carnazza, M. Goebel & M. Alexander-Bridges.** 1991. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature* 54:317-320.
- Nelson, D.R., T. Kamataki, D.J. Waxman, F.P. Guengerich, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, F.J. González, M.J. Coe, Y.C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda & D.W. Nebert.** 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell. Biol.* 12:1-51.
- Palmer, S. & P.S. Burgoyne.** 1991. In-situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly but not exclusively XY. *Development* 112:265-268.
- Parker, K.L. & B.P. Schimmer.** 1997. Steroidogenic factor: A key determinant of endocrine development and function. *Endocr. Rev.* 18(3):361-377.
- Payen, E.J. & C.Y. Cotinot.** 1993. Comparative HMG-box sequences of the SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Research* 21:2772.
- Raynaud, A. & C. Pieau.** 1985. Embryonic development of the genital system. *In: Gans, S. & Billie, F. (eds). Biology of the Reptilia.* B John Wiley and Sons., New York. vol. 15. Development. capítulo 4. pp. 149-299.
- Salame-Méndez, A.** 1997. Influencia de la temperatura de incubación en la determinación del sexo en quelonios. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* en prensa.
- Salame-Méndez, A., J. Herrera-Muñoz, N. Moreno-Mendoza & H. Merchant-Larios.** 1997. The diencephalon but not gonad responds to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *J. Exp. Zool.* en prensa.
- Scheib, D.** 1983. Effects and role of strogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 23 (Suppl.):S87-S92.
- Shen, W.H., C.C.D. Moore, Y. Ikeda, K.L. Parker & H.A. Igraham.** 1994. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the Müllerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade. *Cell* 77:651-661.
- Simpson, E., P. Chandler, E. Goulny, C.M. Disteche, M.A. Ferguson-Smith & D.C. Page.** 1987. Separation of the genetic loci for the H-Y antigen and for testis determination on the human Y chromosome. *Nature* 326:876-878.
- Sinclair, A.H., P. Bertha, M.S. Palmer, J.R. Hawkins, B.L. Griffiths, M.J. Smith, J.W. Foster, A.M. Frischauf, R. Lovell-Badge & P. Goodfellow.** 1990. A gene from the human sex-determining region encoding a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Vannini, E.** 1986. Recent ideas about the factors that regulate vertebrate gonadic sex-differentiation. *Boll. Biol.* 53:339-349.
- Villalpando, I. & H. Merchant.** 1990. Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *Int. J. Dev. Biol.* 3:281-285.
- Wilson, C.A., N. di Clemente, C. Ehrenfels, R.B. Pepinsky, N. Josso, B. Vigier & R. Cate.** 1993. Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding withing the transforming growth factor-b superfamily. *Mol. Endocrinol.* 7:247-257.
- Witschi, E.** 1934. Genes and inductors of sex differentiation in amphibians. *Biol. Rev.* 9:460-488.
- , 1951. Embryogenesis of the adrenal and the reproductive gland. Gonad Development and Function. *Recent. Prog. Horm. Res.* 6:1-27.

-----, 1956. *Development of Vertebrates*. W.B. Saunders. Philadelphia and London.

-----, 1967. Biochemistry of sex differentiation in vertebrate embryos. *In*: R. Weber (ed). *Biochemistry of Animal Development*. vol II. Academic Press. New York.

Wolff, E. & A. Ginglinger. 1935a. Sur la transformation des poulets mâles en iteséxues par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Arch. Anat. Hist. Embr.* 20:219-278.

-----, 1935b. Sur la production expérimtalle d'intersexués par l'injection de folliculine a l'embryon de Poulet. *C. r. Hebd. Séanc. Paris* 200:118.

Wolff, E. & E. Wolff. 1951. The effects of castration on bird embryos. *J. Exp. Zool.* 116:59-97.

Recibido: 17 de febrero 1997

Aceptado: 16 de octubre 1997