

Diferenciación sexual: el factor de Jost

Ana M.^a Pascual-Leone Pascual*

* Académica de Número y Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Conferencia impartida el 16 de abril de 2009.

RESUMEN

El estudio de la diferenciación sexual de los mamíferos es, sin duda, un ejemplo relevante de proceso epigénético producido por la interacción entre genoma y hormonas secretadas por los testículos fetales: la testosterona y la hormona anti-Müllerian.

La diferenciación sexual se produce a nivel periférico, en las gónadas y, también, a nivel cerebral, hipotálamico, en dos vertientes: la neuroendocrina y la de conducta sexual. Ambas vertientes del dimorfismo sexual cerebral pueden ser estudiadas en rata. La primera, por la ovulación, o no, que se produce en un ovario trasplantado en la cavidad abdominal de ratas hembras o en machos, los cuales son, ambos, castrados, previamente al nacimiento, y, la segunda, por la postura de *lordosis*, que presentan las ratas hembras, debidamente diferenciadas sexualmente, frente al macho. Se han localizado las diferentes zonas cerebrales en donde existen receptores para estrógenos.

En la diferenciación periférica o gonadal el diferenciador es el testículo fetal que secreta dos hormonas. La testosterona que mantiene y diferencia los canales Wolff en vasos deferentes, epidídimo y vesículas seminales y la hormona anti-Müllerian (AMH) que provoca la regresión de los canales de Müller, todo ello, en el embrión genéticamente macho. En el cual se diferencian, previamente, los testícu-

los en la etapa fetal de desarrollo de gónadas. En el embrión hembra, sin testículos, y consecuentemente sin testosterona ni AMH, los canales de Wolff involucionan y los de Müller, de forma espontánea, se diferencian en útero, tronpas de Falopio y parte superior de la vagina.

El conocimiento y aclaración de dichas cuestiones pudo establecerse por el descubrimiento, en fetos de conejos, hecho por el Profesor Alfred Jost, en París (1947-50), de la hormona anti-Müllerian (AMH).

Actualmente, la AMH se presenta con múltiples funciones, aunque la más fundamental sea la de regresión de los canales Müllerian en los fetos genéticamente masculinos. Esta hormona es, además, un marcador de patologías como las neoplasias ováricas o la anormal esteroidogénesis del ovario y su hallazgo aclara todo el heterogéneo grupo de patologías de intersexualidad gonadal.

Se ha clonado su gen y se han preparado sus anticuerpos. Por pertenecer a la familia del TGF β (factor de crecimiento transformante β) cuyos miembros están implicados en procesos neoplásicos está siendo, actualmente, muy estudiada. Tanto sus posibles aplicaciones en terapéutica, como sus funciones en adulto, son aún investigaciones abiertas al futuro.

Palabras clave: Genes; Testículos; Canales Wolff y Müller; Testosterona; Hipotálamo; Hormona anti-Müllerian (AMH).

ABSTRACT

Sexual differentiation: the Jost factor

Sexual differentiation in mammals is a good example of the epigenetic process produced by the interaction between the genome and hormones secreted by the fetal testes: testosterone and anti-Müllerian hormone (AMH).

Sexual differentiation takes place in the gonads and brain (hypothalamus) in two branches: neuroendocrine and sexual behavior. Both branches of the cerebral sexual dimorphism can be studied in the rat. The former by the ovulation pattern of an ovary

transplanted in the abdominal cavity of male or female rats which are castrated at birth. The latter can be examined by the response of *lordosis* of female rats with plain sexual differentiation in front of the male. The different brain regions containing estrogen receptors have been localized.

Fetal testes regulate gonadal differentiation through two hormones; testosterone an anti-Müllerian hormone. Testosterone differentiates Wolff channels in deferent vessels, epididimus and seminal vesicles, and AMH induces the regression of Müller channels in the genetically male embryo, in which testes are previously differentiated in the last fetal stage of gonad development. In the female, with no testosterone or AMH, the Wolff channels undergo involution and those of Müller spontaneously differentiate to uterus, Fallopian trumps and upper part of vagina.

The credit for the knowledge of these matters should be given to Prof. Alfred Jost (Paris, 1947-50), who discovered AMH in rabbit fetuses. Currently, AMH has been endowed with many biological functions, the most important being the involution of Müllerian channels in genetically male fetuses. AMH is a biomarker of diseases such as ovarian tumors and abnormal steroid synthesis in ovary and its finding helped explain a heterogeneous number of sexual-related pathologies.

AMH gene has been cloned and anti-AMH monoclonal antibodies obtained. Since AMH has been associated with the transforming-growth factor beta (TGF- β) family, whose members are involved in cancer processes, its biological functions and potential therapeutic applications are currently and will certainly be subject of intense studies.

Key words: Genes; Testes; Wolff and Müller ducts; Testosterone; Hypothalamus; Anti-Müllerian hormone (AMH).

1. PALABRAS PREVIAS

Actualmente, está completamente establecida la interacción, durante el desarrollo de los mamíferos, entre factores ambientales y genoma para la proliferación celular y diferenciación de órganos

que, finalmente, darán lugar a un organismo adulto. Es decir, está establecido que, durante el desarrollo tiene lugar una *programación ambiental génica* de la cual, además, va a depender la futura salud y enfermedad del organismo adulto (1, 2).

En esta programación tienen un papel primordial los nutrientes porque no solamente son el sustrato energético necesario en etapas de crecimiento, sino que, como hemos expuesto en otras ocasiones en esta Corporación (3-5), los nutrientes modulan la secreción de hormonas genéticamente establecidas para regular el crecimiento.

Pero hoy vamos a exponer cómo, entre estos factores ambientales decisivos en dicha programación, las hormonas ocupan, igualmente, un lugar muy importante y, quizá, uno de los ejemplos más claros de ello sea la diferenciación sexual de la cual vamos a hablar.

Uno de los investigadores que más han contribuido a la comprensión de la diferenciación sexual en los mamíferos y que, además, es reputado en todo el mundo científico como uno de los investigadores pioneros de la endocrinología fetal fue Alfred Jost. El cual hasta el final de su vida, murió en febrero 1991, y ocupando los laboratorios de Monod, del Premio Nobel en el Colegio de Francia, estuvo dedicado, fundamentalmente, a la diferenciación sexual, ya que había descubierto, ya en 1947 (6), una hormona, la *hormone inhibitrice*, tal como él la llamó, en su primera publicación, al factor del cual vamos a hablar en la segunda parte de la exposición y que hemos denominado *factor de Jost*.

2. DIFERENCIACIÓN SEXUAL

En la diferenciación sexual de los mamíferos hay que distinguir:

- a) Diferenciación periférica o gonadal.
- b) Diferenciación cerebral: neuroendocrina y de conducta sexual.

a) Diferenciación sexual periférica o gonadal

No se pretende hacer una exposición exhaustiva de la diferenciación sexual, sino describir sus etapas más relevantes para poder

destacar, posteriormente, en la segunda parte de esta exposición, la importancia que tiene el descubrimiento del factor de Jost. Por otra parte, vamos a tratar de exponer, en esta primera parte, los conocimientos científicos actuales de la diferenciación sexual para aclarar y explicar, científicamente, las preguntas que surgen, y que han sido planteadas en esta Corporación en distintos Seminarios, acerca de las bases científicas que explican la existencia de individuos en los cuales su sexo legal, establecido en su nacimiento, no coincide, en ocasiones, con la identidad sexual vivida por su organismo.

Desde tiempo, se conocen las distintas etapas de la diferenciación sexual en lo referente a diferenciación de gónadas, que podríamos llamar diferenciación periférica y también se conoce el papel esencial en la diferenciación sexual masculina, de la testosterona fetal; tanto a nivel periférico, en diferenciación de genitales, como a nivel central en el cerebro modulando allí secreciones neuroendocrinas y conducta sexual (7, 8).

Los genes situados tanto en el cromosoma X como en el cromosoma Y e incluso en los autosomas, genes no sexuales, deben estar en situación funcional para que comience la diferenciación sexual en ambos sexos. La diferenciación sexual que hemos llamado periférica comprende cuatro etapas principales: *a)* la determinación del sexo genético, *b)* la formación de estructuras sexuales indiferenciadas, *c)* el desarrollo de sexo gonádico y, finalmente, *d)* el desarrollo del fenotipo sexual.

1. *Establecimiento del sexo genético*

Actualmente, el establecimiento del sexo genético, y todas las etapas de la fecundación de un ovocito, son muy conocidas por los estudios citológicos realizados en las fecundaciones *in vitro*.

El sexo genético es determinado en el momento de la fecundación por la unión de dos células haploides: el ovocito, que contiene, en humano, 23 cromosomas, entre los cuales está el cromosoma X y un espermatozoide que podrá ser, o bien 23 X o 23 Y. En la fecundación de un ovocito, de forma normal, se suelen distinguir unas siete etapas. A partir de la quinta se ha formado primero un pronúcleo proveniente del ovocito y, posteriormente, otro proveniente de la cabeza del

espermatozoide. Ambos pronúcleos se fusionan luego para formar un óvulo fecundado 46 XX o 46 XY en una fecundación normal.

2. *Formación de estructuras indiferenciadas en ambos sexos y posterior desarrollo del sexo gonádico*

Ambas etapas, enunciadas en este apartado, la formación de estructuras indiferenciadas y la diferenciación de órganos sexuales, van encaminadas, en los organismos femenino y masculino, a la conformación de los genitales. Sin embargo, en ambos sexos, aunque tengan diferente dotación genética, adquirida en la fecundación, comienzan por aparecer las mismas estructuras absolutamente indiferenciadas en hembra y macho. Estas estructuras indiferenciadas, que surgen, en humano, aproximadamente, en la tercera semana de gestación, son, en primer lugar, células germinales primitivas localizadas en las paredes del saco vitelino, al nivel de unión con el alantoides. El estudio de estas estructuras indiferenciadas, su orden de aparición y sus funciones, corresponden a la etapa embrionaria del desarrollo. En humano, a partir de la sexta semana de gestación las células germinales, en ambos sexos, migran a lo largo del alantoides, a través del mesenterio dorsal, para llegar a las llamadas crestas genitales. Finalmente, en el comienzo de la sexta semana de la vida embrionaria, los embriones, sean de sexo genético femeninos o masculinos, tienen los dos un par de canales internos los canales de Wolff y de Müller.

Los canales de Wolff toman nacimiento partiendo del sistema excretor tubular del riñón.

Los canales de Müller se desarrollan a partir del epitelio celómico, cerca de las crestas genitales, y son más exteriores que los de Wolff (Figura 1). No entran en contacto con las gónadas, sino que se unen en su extremo distal para, finalmente, formar, en la diferenciación femenina, el canal útero-vaginal (7).

Ambos canales, Wolff y Müller, son básicos para pasar a la fase siguiente de la diferenciación sexual, o sea, al desarrollo del sexo gonádico, porque en esta etapa los canales de Müller formarán, en las hembras, el conjunto de útero, trompas de Falopio y parte superior de la vagina, mientras que los de Wolff se diferenciarán en vasos deferentes, epidídimo y vesículas seminales en los machos (9).

Ambos canales son conocidos desde hace mucho. La primera descripción de lo que posteriormente se ha conocido como canales de Müller se debe al anatomista alemán J. Müller (1801-58), y los de Wolff a otro alemán, Caspar F. Wolff (1733-94) (9).

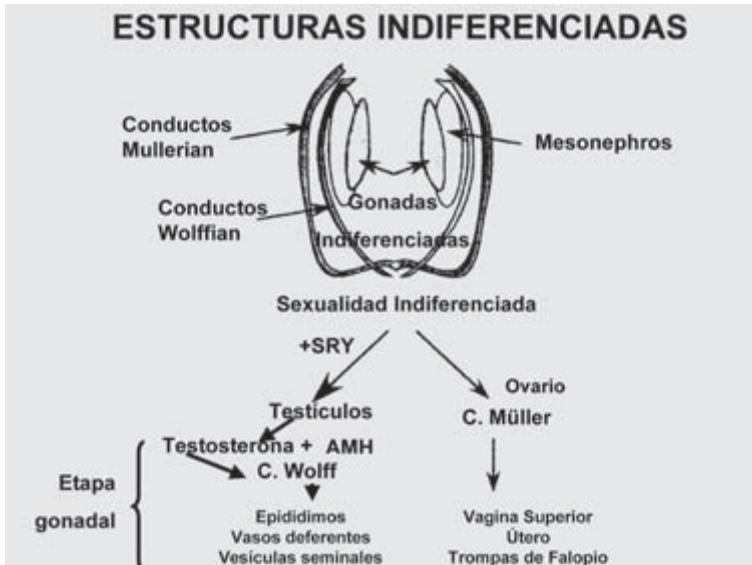


Figura 1. Conjunto urogenital agonal de estructuras indiferenciadas sexualmente que desarrollan tanto los embriones genéticamente masculinos como los genéticamente femeninos. Figura modificada de cita (9).

3. Desarrollo del sexo gonádico

Una etapa muy importante de la diferenciación sexual es la transformación de la gónada indiferenciada en testículos en los embriones machos. Para dicha transformación es absolutamente necesaria la presencia del cromosoma Y. Esta transformación se produce, sin embargo, también, en presencia de más de un cromosoma X como en el síndrome de Klinefelter (cariotipo 47 XXY) o también se produce en la presencia de más de un cromosoma Y, como en el síndrome 47 XYY. Por consiguiente, anomalías en el cromosoma Y pueden ser fundamentales para la formación anómala de los testículos, dando fenotipos feminoides con alteraciones gonádicas. Se piensa que el gen del cromosoma Y, responsable de la diferenciación testicular

está situado en el brazo corto de dicho cromosoma. La proteína específica se llamó primero «determinante específico del cromosoma Y»/Td-Y) y actualmente al gen sobre la región del cromosoma Y que determina el sexo llamado SRY (*sex determining region*). En el cromosoma Y existe también un gen que expresa un factor de histocompatibilidad (H-Y) por el cual un macho admite injertos de piel femeninos, cosa que no ocurre en las hembras ante los injertos masculinos. Pero, finalmente, se cree que las proteínas Td-Y y H-Y se expresan por genes distintos en el cromosoma Y. Hay que hacer notar que en el hombre, por estudio de alteraciones gonadales, se conoce que en el desarrollo testicular de la diferenciación masculina hay un gen sobre el cromosoma X cuya existencia es necesaria para un desarrollo adecuado de los testículos. En este desarrollo cooperan, sin duda, también, expresión de genes autosomales.

A la séptima semana de la gestación, los cordones sexuales del testículo pierden su relación con la superficie celómica, y la parte epitelial de los cordones se desarrolla formando el complejo celular de los tubos seminíferos y las células de Sertoli adyacentes, mientras el tejido mesenquimatoso situado entre los tubos seminíferos dará lugar a las células de Leydig, responsables de la producción de esteroides, fundamentalmente testosterona (7, 9).

4. *Diferenciación del sexo fenotípico*

La próxima etapa de diferenciación sexual, la fenotípica, está dirigida a la formación de los canales sexuales internos y la diferenciación de los órganos de los genitales externos. Y ambas cosas, en la diferenciación sexual masculina, necesitan de la presencia de la testosterona producida en los testículos fetales por las células de Leydig. Sin dicha testosterona no se produce, en los embriones masculinos, la transformación de los canales de Wolff, en epididimo, vasos deferentes y vesículas seminales. Los canales de Wolff, en los embriones machos, involucionan o se desarrollan mal, o parcialmente, dependiendo de la cantidad de testosterona secretada por su testículo fetal. Por la misma causa, en la diferenciación femenina, cuyos embriones no secretan testosterona porque no tienen testículos (10) el canal de Wolff involuciona.

Pero, además, en los embriones femeninos, los canales de Müller, de forma espontánea, en la ausencia de testosterona, se diferencian en útero, tubos de Falopio y parte superior de la vagina mientras, en los embriones masculinos, con testículos y testosterona, involuciona el canal de Müller. Y es ese dimorfismo de diferenciación sexual que se produce entre los embriones femenino y masculino, a pesar de que parten ambos de estructuras similares en el estadio de gónadas indiferenciadas, lo que queremos destacar.

Durante años no se tuvo claro cuál era la secreción, ni el proceso, por el cual el canal de Müller involuciona en los embriones masculinos, ya que la presencia de testosterona, que es necesaria para la transformación y evolución del canal de Wolff, no parecía, de forma clara, ser el motor por el cual en estos embriones involuciona el canal de Müller. Y es, precisamente, en este punto cuando los experimentos del Profesor Jost, en París, vinieron a aclararlo, con el descubrimiento de una hormona, el factor de Jost del que vamos a hablar en la segunda parte de esta exposición.

Es decir, el descubrimiento de Jost vino a aclarar el proceso y las secreciones testiculares que rigen la diferenciación sexual masculina en la etapa fenotípica y, como veremos, como consecuencia, el porqué y el modo de cómo se podían producir las patologías, descritas por la clínica, de anomalías morfológicas en genitales masculinos. Pero, además, sus descubrimientos abrieron el campo a investigaciones todavía en curso.

b) Diferenciación sexual cerebral: neuroendocrina y de conducta

Desde muy antiguo se sabe que animales castrados alteran sus manifestaciones sexuales en dos niveles: el de secreciones neuroendocrinas y el de conducta, los cuales requieren, ambos, un control cerebral. Como relata Bruce S. McEwen en 1976 (11), ya en 1849, Arnold A. Berthold de la Universidad de Göttingen encontró que gallos castrados dejaban de tener conducta de machos en la pelea, o frente a una hembra, y que si trasplantaban testículos en su cavidad abdominal, la conducta de macho reaparecía. Como no había hecho ninguna conexión nerviosa, dedujo que, por vía sanguínea, sustancias que secretaba el testículo viajaban por la sangre y llegaban al cerebro.

En 1936, Pfeiffer publicó un trabajo en el cual se exponía que si a una rata hembra recién nacida se le trasplantaba un testículo o se le ponían inyecciones de andrógenos los primeros días de vida, se producía más tarde una permanente anovulación (12). Sin embargo, aunque el verdadero desarrollo de estos trabajos se produjo a finales de los años sesenta, comenzó su interés a partir del setenta (13).

Hoy, sabemos que la testosterona, desdoblada en las propias neuronas en dihidrotestosterona y estradiol (Figura 2) por acción enzimática, es la que directamente influencia la diferenciación sexual del cerebro. En las neuronas existen receptores nucleares del estradiol, de igual estructura que en los de tejidos periféricos, y es el estradiol, proveniente de la testosterona, el que uniéndose a sus receptores neuronales incide sobre los circuitos nerviosos configurándolos en el cerebro inmaduro y de forma irreversible en la edad adulta. En el cerebro adulto el papel de las hormonas sexuales se limita a influenciar la eficacia funcional de los circuitos neuronales que dichas hormonas crearon durante el desarrollo (14, 15).



Figura 2. Acciones de la testoteron secreta por el testículo fetal y de sus metabolitos estradiol, dehidrotestosterona y β-androstanos, en distintos lugares durante la diferenciación sexual fetal en los embriones genéticamente masculinos.

La configuración de los circuitos neuronales, por las hormonas sexuales en etapas inmaduras, concretamente por el estradiol, proveniente de la testosterona, en los embriones machos en desarrollo, tiene consecuencias en dos vertientes regidas por el cerebro. Una neuroendocrina, en este caso, producida por la hormona hipotalámica del axis gonadal LRH que rige y estimula las secreciones gonadales en la hipófisis, y otra, igualmente regida por el cerebro, la de la conducta sexual. Las secreciones de la hipófisis en el axis gonadal, concretamente la LH (hormona luteotropa) se secreta, en los mamíferos, de forma distinta en machos que en hembras. La secreción de la hormona luteinizante hipofisaria LH en las hembras es cíclica, y por ello se produce la ovulación mensual y el aumento en los ovarios de la secreción de estradiol, mientras en los machos la LH se secreta de forma tónica para estimular en los testículos la secreción de testosterona. La otra secreción hipofisaria gonadal, la FSH, hormona estimulante del folículo, produce la maduración del folículo ovárico en las hembras y estimula la espermatogénesis en los machos.

En la rata hembra ambas vertientes, la neuroendocrina y la de conducta sexual, pueden ser observadas y valoradas por un observador externo. La neuroendocrina por la capacidad de estimular la ovulación de un ovario trasplantado, en dicha rata hembra previamente ovariectomizada, puede ser una prueba observable de tener un hipotálamo feminizado, por tanto, capaz de estimular en la pituitaria la secreción cíclica de LH. Y la conducta sexual de hembra se manifiesta, frente al macho, por una postura especial llamada de *lordosis*.

Un trabajo muy esclarecedor de todo ello fue el realizado por Gorski en 1965 (16). En él mide el índice de feminización del hipotálamo por la capacidad de ovulación que se manifiesta en ovarios trasplantados en la cavidad abdominal tanto en ratas hembras como en machos. Este investigador castraba, previamente, los animales machos el primer día de su vida e inyectaba testosterona o estradiol a las hembras recién nacidas. Así comprobó que las hembras que recibían testosterona o estradiol los tres primeros días de vida, tuvieran o no sus ovarios intactos, no eran capaces de producir ovulación en el ovario trasplantado como sucede con un macho normal, porque esas hembras, como los machos normales, habían masculinizado su hipotálamo por la llegada al cerebro de la testosterona o estradiol.

Por el contrario, el ovario trasplantado ovulaba en machos castrados el primer día de vida como ocurre con una hembra normal, porque ese macho al no recibir testosterona en el momento de su desarrollo cerebral, tenía un hipotálamo feminizado como una hembra y, por tanto, era capaz de producir en su hipófisis la secreción cíclica de LH. De estas experiencias parece deducirse, como se ha comprobado posteriormente, que los hipotálamos nacen potencialmente femeninos y es la llegada de la testosterona, en etapas de inmadurez, la que los masculiniza (Figura 3).

Hemos dicho que en periodo adulto, en todas las especies, las hormonas sexuales solamente refuerzan los circuitos neuronales establecidos en etapas inmaduras y de forma transitoria. Por ello, en cuanto a conducta, un macho castrado el primer día de vida, se comporta, en periodo adulto, como una hembra normal, es decir, refuerza levemente su conducta masculina, por razón y acción de la testosterona que recibe, y, grandemente, la conducta de hembra por acción del estradiol, mostrando postura de lordosis frente a otro macho. Y, de igual forma, una hembra que recibe testosterona los primeros días de vida, se comporta como un macho normal, o sea refuerza su conducta de macho en periodo adulto cuando recibe testosterona, y, sin embargo, levemente la conducta de hembra cuando, en etapa adulta, recibe estradiol y no muestra la postura de lordosis frente al macho. Lo cual, concuerda totalmente con las conclusiones y efectos obtenidos, en vertiente neuroendocrina, observado en las experiencias de ovarios trasplantados expuestas anteriormente (Figura 3). En el trabajo de Gorski, en 1965, se planteaba la cuestión de porqué las inyecciones de estradiol, hormona femenina, masculinizan a las hembras igual que las de testosterona y, por otra parte, la cuestión de que si el estradiol masculiniza, cómo se protegen los fetos hembra de sus estrógenos o los de su madre.

Hoy parece que dichas preguntas están contestadas, ya que lo que masculiniza el hipotálamo es el estradiol que proviene del desdoblamiento de la testosterona en estradiol y dihidrotestosterona (Figura 2) y además, se conoce la existencia de una α -fetoproteína que parece fijar en los fetos hembra el estradiol (14).



Figura 3. Experimentos de Gorski castrando ratas macho el primer día postnatal o dando testosterona los 3-5 días de vida postnatal a ratas hembra. Y consiguiendo, a nivel cerebral, en etapa adulta, una feminización en el primer caso del macho o masculinización de la hembra tanto en vertiente neuroendocrina como en conducta sexual. Cita bibliográfica (16).

1. *Localización de estrógenos en áreas cerebrales y diferenciación sexual del hipotálamo: importancia del área preóptica*

Los estudios sobre localización de estrógenos o sus receptores en áreas cerebrales tuvieron su máxima eclosión, también, a partir de los años setenta (17). Las dificultades que se encontraron fueron la heterogeneidad del tejido cerebral y la dificultad de localización de receptores de hormonas, pero, afortunadamente, los receptores citoplasmáticos, que se traslocan al núcleo de las hormonas esteroides, se encuentran muy concentrados en regiones específicas y ello facilitó la labor. Se combinaron informaciones recogidas en diferentes vertientes de investigación, por ello, la búsqueda de células sensibles a las hormonas esteroides se mezcló con información recogida implantando las hormonas en distintas regiones específicas del cerebro y, también, recogiendo información eléctrica de la actividad de dichas células nerviosas, antes y después, de la administración de drogas que alteran dicha actividad eléctrica. Con todo ello se formaron cuadros

de circuitos de células nerviosas envueltos en el control de la conducta sexual estudiada en determinados modelos animales.

Se hicieron tres tipos de experimentos: 1) inyecciones de testosterona o estradiol marcados con tritio a animales castrados; 2) trasplantes de testículos u ovarios al mismo tipo de animales, y 3) implante directo de dichas hormonas gonadales marcadas con tritio en ciertas zonas cerebrales (14).

Fue la técnica de autorradiografía la que permitió hacer visibles, bajo el microscopio, las neuronas sensibles a las hormonas esteroides. Ratas, a las que previamente se quitaron los ovarios, se inyectaron, intravenosamente, con estradiol marcado con tritio y, se sacrificaron dos horas después. Posteriormente, se seccionaron sus cerebros y se congelaron. Los distintos cortes cerebrales se pusieron en contacto con una emulsión fotográfica, y se almacenaron por espacio de 3-12 meses. La radiactividad del tritio va impresionando la placa fotográfica y revela, con bastante precisión, dónde ha quedado localizado el estradiol marcado con tritio (17). El estrógeno radiactivo se concentra, específicamente, en la rata, en células del área preóptica, en el hipotálamo y en la amígdala. Estas son áreas del primitivo cerebro «archipallium», el cual se sabe que juega un papel importante en los procesos sexuales de conducta. En estas tres regiones se ha establecido que pueden existir, en cada núcleo aislado celular, de tres mil a cinco mil moléculas de estradiol, mientras en la hipófisis se cuantifican alrededor de doce mil moléculas; cantidad similar a la capacidad del receptor encontrada en las células del útero. También existen diferencias individuales en la capacidad de unión de los receptores en dichas tres zonas cerebrales. Estos estudios, sobre la capacidad de ciertas zonas en el cerebro, para fijar el estradiol, y, por tanto, la localización de los receptores específicos, se han ampliado, siempre con técnicas de autorradiografía, a peces, anfibios o pájaros, encontrándose implicadas, en todos ellos, la mismas zonas cerebrales. Finalmente, se ha hallado que la distribución de receptores estrogénicos en el cerebro del mono, en dichas zonas, es similar a las encontradas en el cerebro de la rata, lo que parece hacer extensiva la localización de estrógenos al cerebro humano (16).

Fueron Naftalin y sus colaboradores (18) los que encontraron, en el cerebro de rata recién nacida, la dotación enzimática para desdo-

blar la testosterona en estradiol y dihidrotestosterona. Zigmond (19) encontró grandes cantidades de tritio, proveniente del estradiol en los núcleos de células aisladas del cerebro de ratas hembras a las cuales previamente se les había dado estradiol marcado con tritio. Y Lieberburg encontró en el área preóptica de rata recién nacida, a la que, previamente, había inyectado testosterona marcada con tritio, estradiol tritiado (18). Es, pues, el estradiol que proviene de la testosterona el que masculiniza el hipotálamo y lo hace en doble vertiente, neuroendocrina y en cuanto a conducta sexual.

2. *Modulación de neuronas cerebrales por las hormonas gonadales y conclusiones*

Resumiendo, podemos decir que el hipotálamo nace potencialmente femenino, en ambos sexos, y es la llegada de la testosterona proveniente de los testículos fetales, secretada por sus células de Leydig, en los embriones genéticamente machos, lo que lo masculinizan. Todo ello en épocas de inmadurez del Sistema Nervioso Central, permaneciendo de forma irreversible en etapa adulta dicha masculinización.

Consecuentemente a ello, en los embriones de la rata, genéticamente hembras, pero que reciben dosis de testosterona o de estradiol los primeros días de su vida, la diferenciación sexual se produce por modificación neuroendocrina, la cual masculiniza el hipotálamo. Entonces se conforma el hipotálamo, en la secreción de su hormona LRH, para la desaparición de la secreción cíclica de LH (*hormona luteotrópica*) en pituitaria y, por tanto, en dichas hembras, existirá luego una anovulación permanente en etapa adulta (Figura 3). Pero, además, en la vertiente de la conducta sexual, en estas ratas hembras adultas, desaparece la postura de lordosis frente al macho.

Hoy conocemos que las células alrededor del núcleo ventromedial del hipotálamo facilitan en la rata hembra la postura de lordosis y, también, que lesiones en estas células conducen a la pérdida de dicha postura. Así, pues, las células del hipotálamo integran en el organismo las respuestas de conducta sexual con los aspectos neuroendocrinos, lo cual se establece en la diferenciación sexual perinatal (14, 16), pero perdura en periodo adulto.

En los animales adultos, uno de los más importantes efectos de las hormonas gonadales es reforzar la conducta sexual, de forma transitoria. Se ha visto que en las ratas hembras que habían sido castradas el aumento de la receptividad frente al macho, y por tanto la adopción de la postura de lordosis, después de una inyección de estradiol, se produce al cabo de veinte horas. Este retraso es independiente de la dosis de estradiol inyectada y es similar al tiempo que transcurre entre el ciclo del estro y el incremento de la secreción de estradiol por los ovarios. Este lapso de tiempo entre la inyección y los resultados en la conducta, en la rata hembra adulta, ha permitido estudiar los acontecimientos intracelulares. Se ha mostrado que en las doce primeras horas, después de la inyección de la hormona, los receptores en el núcleo celular de las zonas del cerebro, hipotálamo, área preóptica y amígdala, son ocupados por la hormona. Como los efectos sobre la conducta tardan veinte horas, todo parece indicar que la inyección de estradiol inicia cambios metabólicos dentro de las neuronas diana que son responsables de la posterior conducta de los animales. Esto hizo pensar que síntesis de RNA y de proteínas debía producirse en el proceso, de modo similar a como se sabe que actúan las hormonas esteroides en otros órganos diana periféricos, como el útero o el oviducto de gallina. Es decir, incidiendo, una vez unidos a sus receptores e introducidos en el núcleo celular, en el ADN (ácido desoxirribonucleico), y modificando posteriormente la síntesis del ARN (ácido ribonucleico) con el consiguiente cambio en la síntesis de proteínas que luego serán responsables de la respuesta a la hormona. Para ello se hicieron experiencias infundiendo en el área preóptica actinomicina D, que es un inhibidor de la síntesis de ARN, o cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, y se observó que, en ambos casos, se bloqueaba la acción del estradiol sobre la conducta sexual, impidiendo que las ratas adoptaran la postura de lordosis frente al macho a pesar de haber recibido estradiol (20). Se puede concluir que la acción de los estrógenos sobre la conducta reproductora o sexual desencadena una secuencia de acontecimientos que comienzan con la entrada de estrógenos en el cerebro y su acumulación en receptores específicos en determinadas áreas ya conocidas. Todo ello modula la actividad de la célula nerviosa y su respuesta.

2.1. Investigaciones actuales sobre dimorfismo sexual cerebral. Reflexiones

Los estudios de dimorfismo sexual a nivel cerebral comenzaron a finales de los años setenta, fundamentalmente, por Gorski y colaboradores (21), los cuales encontraron que núcleos del área preóptica del hipotálamo que llamaron SDN-POA (*sexually dimorphic nucleus of the preoptic area*) examinados con técnicas de tinción, presentaban un volumen mayor en machos que en hembras. Y, posteriormente, mostraron que el mayor volumen era debido a que tenían mayor número de células (22).

Sin embargo, la era moderna de estudios sobre la diferenciación sexual en el cerebro se inauguró en 1971 cuando Raisman y Field identificaron la primera clara diferencia sexual en la conectividad neuronal utilizando el microscopio electrónico (23). Aunque anteriormente se creía que modos estereotípicos de conducta sexual eran dependientes de la organización de conexiones neuronales, los encuentros de dichos autores, acerca de que los modelos sexualmente diversos de sinapsis podían ser revertidos por tratamiento con testosterona, fueron la primera evidencia de que el papel de las hormonas esteroides sobre la conducta podía tener una base estructural. Y esta hipótesis se confirmó, más tarde, por Gorski y colegas (21, 22), cuando mostraron que las acciones de las hormonas sexuales no se limitan, en periodos de desarrollo, a sutiles alteraciones en la organización sináptica, sino a dimorfismo en el tamaño de las células en el área preóptica media.

Todas estas investigaciones han llevado a establecer una cuestión básica y rectora de la diferenciación sexual y es que el cerebro nace bipotencial, cualquiera que sea la dotación genética del embrión, pero se desarrolla de forma diferente en machos y en hembras durante el periodo perinatal bajo la influencia de hormonas esteroides sexuales. En la rata macho, la secreción de andrógenos desde los testículos fetales diferenciados presenta dos elevaciones en plasma de testosterona, la primera ocurre en el día dieciocho de gestación, y la segunda aproximadamente dos horas después del nacimiento (24). Hoy se puede afirmar que es el ambiente de hormonas sexuales, la testosterona o mejor sus metabolitos dihidrotestosterona y estradiol, durante el periodo perinatal, lo que causa en el cerebro un cambio en su estructura y función sexual. El ambiente perinatal esteroideo determi-

na, interactuando con el cerebro en desarrollo, conducta reproductora masculina o femenina a la vez que determina que la hipófisis no tenga en machos y sí en hembras un aumento cíclico, preovulatorio, de gonadotropinas. Es decir, no secreción cíclica en machos y sí en hembras de LH. Secreción de LH pituitaria que, en el axis gonadal, está estimulada por la hormona hipotalámica LRH (*luteotropin-releasing hormone*) secretada en el núcleo arcuato (25).

Actualmente se están estudiando en los mamíferos, un gran número de dimorfismo morfológicos y neuroquímicos cerebrales en diversas especies (26, 27).

En modelos animales se ha mostrado que el estradiol modula el funcionamiento de casi todos los sistemas de neurotransmisores como el serotoninérgico, dopaminérgico, adrenérgico y colinérgico (28-30). Además de actividad límbica diferencial y tiene una gran influencia sobre el funcionamiento del axis hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) (*hypothalamus-pituitary-adrenal*) (30, 31).

También se ha mostrado la existencia de dos receptores para el estradiol el alfa y el beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) ambos están abundantemente expresados en el sistema límbico y en áreas cerebrales como amígdala, hipotálamo, stria terminalis, área preóptica y córtex prefrontal y su distribución puede variar entre estas regiones, lo que puede explicar los diferentes efectos del estrógeno en el cerebro (32, 33).

Las principales diferencias sexuales estructurales entre los cerebros masculinos y femeninos se han encontrado, los últimos años, en el núcleo hipotalámico medio preóptico (MPN) y en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del hipotálamo, los cuales están conectados con las rutas sensoriales límbico-hipotalámicas que modulan la conducta reproductora y, algunas de ellas, entre sistema límbico e hipotálamo, permiten que, en la conducta sexual, intervengan impresiones olfativas, cuyas conexiones al hipotálamo están más desarrolladas en los organismos masculinos (34). En el núcleo hipotalámico medio preóptico (MPN) el número de células es más grande en los machos, contrariamente a lo que ocurre en el núcleo AVPV. Núcleo, este último, muy secretor y cuyo número de células parece ser más grande en los organismos femeninos. Gorski y colaboradores han estudiado el mecanismo por el cual la testosterona, en etapas inmaduras, provoca estas diferencias en el número de células de

determinados núcleos hipotalámicos, llegando a la conclusión que actúa inhibiendo la apoptosis o muerte celular programada (35).

El hipotálamo juega un papel crítico en coordinar la expresión de la conducta reproductiva integrando respuestas fisiológicas y sugerencias ambientales. La relación fisiológica y anatómica con la glándula hipófisis es un medio efectivo para coordinar procesos homeostáticos a través de la regulación neuroendocrina de secreciones hormonales. Pero el hipotálamo también tiene conexiones fuertes con la región límbica, hipocampo y amígdala, por ello puede coordinar respuestas neuroendocrinas con sugerencias sensoriales que regulan las motivaciones de la conducta sexual.

Actualmente la región más estudiada ha sido el área preóptica, y se comienzan a conocer las pautas que siguen estas coordinaciones hipotalámicas, pero indudablemente estamos aún al comienzo de conocer todos estos dimorfismos sexuales cerebrales, que en el futuro redundaran, sin duda, en una mejor comprensión de dimorfismos psicológicos y diferencias de conducta en ambos sexos.

Hasta épocas muy recientes no se ha tenido conciencia, ni ha interesado a los investigadores básicos, en investigaciones preclínicas, estudiar el dimorfismo sexual cerebral, pero actualmente por el estudio de dicho dimorfismo ante situaciones de estrés, parece claro que ello será muy necesario en el futuro para tratar depresiones, ya que muchas veces se aplican terapéuticas estudiadas y estandarizadas para cerebros masculinos v/a, organismos femeninos, los cuales responden al estrés por mecanismos diferentes (30).

Esta estructuración neuronal que se realiza en el cerebro, a través de las hormonas esteroides durante el periodo fetal y de forma irreversible para el adulto, es la que permite al hipotálamo poder integrar información del ambiente externo con sugerencias internas que reflejen el estado fisiológico de los organismos. Y ello es imprescindible para elaborar respuestas adaptativas neuroendocrinas y de conducta para la supervivencia de los organismos. Pero dicha coordinación cerebral hipotalámica es absolutamente imprescindible para los procesos reproductivos. Para la propagación de la especie la conducta sexual deberá producirse en situación fisiológica adecuada en los organismos de ambos sexos. En situación neuroendocrina propicia en ambos sexos. Deberá producirse la conducta sexual paralelamente a

las secreciones neuroendocrinas de la hormona hipotalámica gonadal LRH (*luteotropin-releasing hormone*), que es la que estimula en hipófisis la secreción cíclica en hembras y tónica en machos de la luteotropina o LH, que rige la existencia de la menstruación y aumenta estrógenos en ovario para que, finalmente, se produzca la ovulación en las hembras, y en los machos se estimule la secreción de testosterona en las células Leydig del testículo y la espermatogénesis.

Por último, estas investigaciones acerca de la importancia de la interacción, en periodos de inmadurez, entre la testosterona de los testículos fetales y el cerebro, configurando la conducta sexual y secreciones neuroendocrinas, cualquiera que sea la dotación sexual genética de los embriones, son la base científica que explica las anomalías estructurales que pueden producirse cuando dichos procesos diferenciadores se producen mal en etapas fetales. Ello, finalmente, lleva a los organismos a que el sexo legal, establecido al nacimiento, no sea la identidad sexual que siente un organismo en su etapa adulta, porque sus estructuras cerebrales hipotalámicas no se configuraron adecuadamente a la dotación genética sexual que heredaron (Figura 4).



Figura 4. El no cumplimiento de la diferenciación normal de canales internos o de diferenciación cerebral sexual, imposible de detectar por observación al nacimiento, es lo que explica la no coincidencia, en ocasiones, entre el sexo legal establecido al nacer y la identidad sexual sentida por el individuo en periodo adulto. Figura modificada de cita bibliográfica (7).

3. EL FACTOR DE JOST

Cuando hablamos de la etapa de diferenciación del sexo fenotípico, en la cual se produce la diferenciación de los canales internos y de los órganos genitales externos, ya anunciamos que las investigaciones del Profesor Jost en París, a partir de los años 1947-50 (6, 36) habían venido a aclarar muchas cuestiones en dicha etapa. Decíamos que los embriones masculinos, para la diferenciación del canal de Wolff en epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales, necesitan la presencia de la testosterona proveniente de los testículos fetales, secretada por sus células de Leydig. Por ello, en los embriones hembra, aunque en su etapa de «gónada indiferenciada» existe como en los embriones masculinos el canal de Müller y el canal de Wolff, el canal de Wolff involuciona por carecer de la presencia de testosterona. Sin embargo, el canal de Müller en embriones femeninos, de forma espontánea, da lugar al útero, tubos de Falopio y parte superior de la vagina. En la ausencia de testosterona, sin embargo, dicho canal involuciona en los embriones masculinos. Siempre se pensó, en el pasado, que la involución del canal de Müller no parecía ser, solamente, una consecuencia de la presencia de testosterona, pero se desconocía la causa rectora de la involución del canal de Müller en la diferenciación fenotípica de los embriones masculinos.

3.1. Experimentos de Jost: su importancia

Las experiencias fundamentales del Profesor Jost sobre dicho tema se pueden resumir en tres grupos y se realizaron en feto de conejo:

1. Comprobó que la castración de fetos masculinos o femeninos, en etapas tempranas de la gestación, tiene como consecuencia la desaparición de los canales de Wolff en ambos sexos, sin embargo, igualmente en ambos, los canales de Müller persisten.
2. Implantó un cristal de testosterona unilateralmente en un feto masculino, previamente castrado, y observó que el canal de Wolff del mismo lado se desarrolla pero, además, persistían los canales de Müller de ambos lados.

3. Trasplantó un testículo, en fetos masculinos, previamente castrados, en la cavidad abdominal de un lado, y ello produjo el desarrollo del canal de Wolff y la regresión del canal de Müller del mismo lado del injerto. En el lado opuesto, no injertado con testículo, encontraba una persistencia del canal de Müller mientras podía o no desarrollarse el canal de Wolff de dicho lado no injertado.

Las conclusiones que se desprenden de sus trabajos muestran que el testículo produce un andrógeno, la testosterona, en los fetos masculinos, la cual es imprescindible para el desarrollo de los canales de Wolff y un factor que llamó «hormone inhibitrice» [Müllerian inhibiting factor para los anglosajones (MIF)], que parece ser la causante de la regresión de los canales de Müller en los fetos masculinos. También deduce de sus trabajos que los ovarios, existan o no, no parecen ejercer ningún estímulo, ni regresión, en periodo fetal, ni sobre los canales de Wolff ni de Müller.

Además, estos trabajos muestran que son la testosterona y la MIF los que actúan, respectivamente, sobre el desarrollo de sendos canales Wolff y Müller con una acción local.

En sus publicaciones inglesas (36), Jost llamó a la hormona descubierta «Müllerian inhibitor», pero actualmente es conocida, además de cómo MIF, *inhibiting-substance* (MIS) o con un término más amplio *anti-müllerian hormone* (AMH), como ya se ha mencionado.

Las investigaciones del Profesor Jost han constituido realmente la base de la comprensión del desarrollo del fenotipo masculino. En escritos de 1988 el mismo Jost, sin duda uno de los padres de la endocrinología fetal, nos dice, en transcripción hecha por sus discípulos N. Josso, B. Vigier (37):

«Desde un punto de vista biológico era un desafío que los andrógenos producían una muy parcial masculinización del feto. Ellos, los andrógenos, no duplicaban la condición “freematin” encontrada en el ganado. Era especialmente intrigante que uno no obtiene la desaparición de los canales Müllerian (femeninos) en animales tratados con andrógenos. Yo decidí abordar esta cuestión de un modo no ortodoxo e investigar la actividad endocrina —si había alguna— de las gónadas del feto, utilizando cirugía sobre el feto intraútero. Esto no había sido hecho pre-

viamente, y el primer éxito no fue obtenido hasta duros meses de trabajo, año y medio después. Costó tan largo tiempo no solamente porque en aquel momento era difícil encontrar suficientes conejos para investigar, sino también, porque yo tenía poca experiencia en cirugía refinada. Fue encontrado que cualquiera que fuera el sexo genético de los fetos, el tracto genital se convierte en femenino en la ausencia de gónadas. El testículo fetal es el diferenciador sexual: impone masculinidad contra un programa inherente del cuerpo. Los testículos producen un factor el cual inhibe los conductos müllerian femeninos y los andrógenos que masculinizan el tracto genital. El esquema, el cual explicaba las anomalías sexuales humanas, fue primero publicado en 1950 (Jost, 1950) (36) y más tarde enriquecido por importantes descubrimientos hechos por otros, pero las bases del concepto expuesto permanecen».

La condición «freemartin», encontrada en el ganado, y aludida por Jost anteriormente, fue reportada y descrita por Lillie ya en 1916 (38), en los terneros. Un freemartin es el producto masculinizado del gemelo femenino en una pareja heterosexual de gemelos, los cuales comparten una placenta por anastomosis placentar. El gemelo hembra está masculinizado en conducta y tiene ovarios no funcionales y por tanto es infértil. Este fenómeno fue clasificado durante tiempo como un ejemplo de quimerismo inmunológico y ha sido biológicamente importante para la comprensión de los procesos reproductivos. La hembra de este par de gemelos muestra regresión de los conductos müllerian, está masculinizada externamente y, por supuesto, es infértil. Hoy sabemos que, presumiblemente, ello es debido a los factores solubles producidos por los testículos fetales del gemelo macho que a través de su placenta anastomosada pasan al gemelo femenino. Y ahora conocemos que estos factores son la MIS y la testosterona.

En sus experimentos Jost usó fragmentos de testículos embrionarios que implantó en embriones femeninos de conejo, antes del tiempo de diferenciación sexual de dichos embriones femeninos, y encontró, como en el ternero freemartin, que estos embriones femeninos estaban masculinizados externamente y, por ello, mostraban estimulación en el canal de Wolff para la diferenciación masculina y también, a la vez, regresión en los conductos müllerian. Pero cuando él reemplazó los testículos por pellets de testosterona encontró que el embrión femenino se masculinizaba, aunque no presentaba regresión de los conductos müllerian. Fueron estos experimentos los que le in-

citaron a proponer la existencia de la hormona antimüllerian (AMH) o MIS secretada por los testículos fetales como la testosterona (36).

Estas interesantes conclusiones, y haber descubierto la existencia del MIS secretado por los testículos fetales, le permitieron dar explicación, jamás hasta entonces lograda, a los diferentes fenotipos anómalos encontrados en pacientes con anormalidades intersexuales. Por ejemplo, anormalidades en los genitales externos femeninos por tener hiperplasias adrenales, con producción de excesiva testosterona de origen adrenal, lo cual, sin embargo, no afecta al desarrollo de los conductos müllerian de forma normal, o síndromes de insensibilidad a los andrógenos, lo que provoca, en embriones genéticamente masculinos, feminización testicular. Aunque, a pesar de su feminización, sus testículos continúan produciendo MIS de forma normal, con lo cual existe una buena regresión de los conductos müllerian en dichos pacientes (39).

Jost realizó sus experimentos durante la II Guerra Mundial, y por la escasez de animales de laboratorio, utilizaba conejos salvajes del Bois de Boulogne, esos animales eran muy fuertes, por ello cuando se trataron de repetir los experimentos en conejos blancos de Nueva Zelanda de laboratorio, los abortos, después de la cirugía, eran muy frecuentes y la repetición de sus experimentos difícil. Pero, en 1969 (40) Regine Picon, en el laboratorio de Jost, desarrolló un ensayo de cultivo de órganos *in vitro*, que permite co-cultivar los conductos urogenitales agonadales, no diferenciados, del embrión de rata con testículos fetales, y se pudo comprobar la regresión del canal de Müller en los primeros. El ensayo de Regine Picon, fallecida en septiembre de 2008, fue decisivo para estas investigaciones. En 1972 lo único que realmente se sabía del MIS, u hormona anti-müllerian (AMH), era que se trataba de otra secreción de los testículos fetales diferente a la testosterona, por ello, el ensayo *in vitro* de Regine Picon fue decisivo para progresar en su conocimiento.

3.2. Lugar de secreción de MIS, naturaleza y estructura

El MIS se secreta en las células de Sertoli de los testículos fetales. La primera evidencia de ello se debe a Nathalie Josso (41), discípula de Jost, que separó los tubos seminíferos de las células intersticiales

del testículo fetal y las cultivó, separadamente ambas, *in vitro* junto a los conductos müllerian agonadales, o no diferenciados, de rata fetal de catorce días de gestación. Encontró que solamente los tubos seminíferos producían la regresión de los conductos müllerian, aun en el caso de que tuvieran éstos pocas células germinales (42). También N. Josso encontró que los conductos müllerian de rata fetal agondales, o no diferenciados, respondían al MIS de cualquier especie de animal que se utilizara (37). Y por ello fue elegido el testículo de las vacas para la extracción y purificación del AMH o MIS debido a su gran tamaño. El bovino MIS o AMH es una macromolécula no dializable. Es una glicoproteína. Fue purificada por inmunocromatografía con un anticuerpo monoclonal (43). Actualmente se utilizan técnicas de ADN recombinante para la producción de MIS (37). La hormona anti-müllerian (AMH) también es secretada en las células granulosas del ovario, y se encuentra en los ovarios y en el fluido folicular de muchas especies (9, 10). En contraste a la pauta de secreción generalizada que tiene en las células de Sertoli de los testículos, MIS está claramente localizada en las células granulosas de los folículos preantrales y antrales nunca en otras etapas foliculares, ni en el cuerpo lúteo, y en humano aunque se expresa en ovario a las 32 semanas de gestación, no es valorable antes del nacimiento. En la rata aparece al tercer día postnatal (44, 45). O sea, que en el ovario ambas cosas, la expresión de MIS o su inmunoreactividad, son dependientes del grado de maduración folicular más que de la edad del animal (37). Pero cualquiera que sea el grado de maduración folicular, o la edad del animal, la producción de AMH por las células granulosas es baja comparada con la producción en las células de Sertoli inmaduras del testículo. Sin embargo, medida la actividad anti-müllerian de ambas secreciones, a igualdad de concentración, una vez purificada la hormona procedente de testículos o de ovarios, tienen la misma actividad y el lugar donde se inicia la transcripción es el mismo en ambos tejidos, sugiriendo igual promotor en testículos y ovario (37).

Aparte del ensayo *in vitro* de Picon, ya mencionado, actualmente se mide su producción por inmunocitoquímica y también por un inmunoensayo enzimático llamado ELISA (*enzyme-linked immunoassay*). Se han establecido ya los anticuerpos monoclonal y policlonal de MIS y actualmente se utilizan para análisis de Western

blot, inmunohistoquímica y para el específico y sensitivo ELISA (9). En humano, en los fetos masculinos, la secreción de AMH se encuentra alta en plasma en mitad de la gestación y cerca del nacimiento, pero en fetos femeninos nunca se encuentra. Lo cual muestra su papel masculinizador para la diferenciación sexual en los fetos machos.

Evidentemente, la pauta cronológica de la expresión de AMH es muy importante para una diferenciación sexual normal en embriones masculinos y femeninos. En los primeros *debe estar* presente antes que los conductos müllerian pierdan su capacidad de respuesta a ella y, por tanto, no puedan involucionar, y ello sucede antes de las ocho semanas post-coito en humano, y antes de los quince días post-coito en rata. Por otro lado, en los embriones genéticamente hembras, es necesario que *no esté presente* en periodo fetal, de otra forma los órganos reproductivos femeninos serían destruidos, por involución de los conductos de Müller (46). Establecida esta pauta cronológica, necesaria para la diferenciación sexual normal, en ambos sexos, se puede deducir cómo la existencia de esta hormona ha venido a explicar muchas de las anomalías de diferenciación sexual denunciadas por la clínica.

El MIS maduro experimenta glicosilación y dimerización y se secreta como un dímero de 140 kilodaltons (kDa) de tamaño de dos idénticas subunidades unidas a bisulfitos (10). Una más profunda proteólisis lleva la molécula a los fragmentos, 57 kDa N-terminal y al C-terminal de 12,5 kDa, de los cuales este último es el activo.

Estructuralmente, la hormona anti-müllerian es un miembro de una gran familia multigénica de glicoproteínas envueltas en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (47, 48) y, por tanto, una familia sumamente interesante en los estudios de prevención de las neoplasias. Por ello, en los últimos años, está siendo la AMH muy estudiada. Esta familia de glicoproteínas, además de la AMH, comprende: la TGF β (factor de crecimiento transformante β) (49), la inhibina, la activina, el *Xenopus Vg-1*, la *Drosophila decapentaplegia* complex, el factor de la morfogénesis ósea (BMPs) y por último los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs). Todos ellos tienen una homología C-terminal. Y, además, alrededor de siete residuos de cisteína altamente conservados (47). Muchas de estas proteínas son producidas como precursores diméricos, que, para su activación ex-

perimentan procesos similares post-translacionales, los cuales requieren rotura y disociación para secretar C-fragmentos terminales con unión de disulfitos bioactivos (9).

Las AMH o MIS son muy conservadas a través de las especies animales. Son sintetizadas con 553 aminoácidos precursores en la rata y 575 en las vacas. A través de las especies, MIS tiene 11 a 12 cisteínas, de las cuales siete están en el dominio C-terminal. El dominio C-terminal tiene la homología más fuerte entre especies con 108 de los 112 últimos aminoácidos conservados entre vacas y humanos y 104 de los 112 conservados entre rata y humano.

El DNA genómico y complementario de MIS ha sido clonado en humano, bóvidos, rata y ratón (9, 10). Los genes de MIS, a través de las especies, tienen similares estructuras intrón/exón. En bóvidos, humanos y ratas, los genes en las regiones que codifican tienen 65-80% de sus nucleótidos homólogos y de 70-75% de homología en la región del promotor. El gen humano de MIS ha sido situado en el cromosoma 19 y el de ratón en el cromosoma 10 (10).

En contraste con los otros miembros de la familia TGF β , en los cuales el polipéptido activo debe ser obtenido por rotura a partir de grandes moléculas precursores, en la hormona anti-müllerian (AMH), la completa molécula, en toda su longitud, es activa en el cultivo de órganos (37).

El TGF β es un regulador bipotencial del crecimiento celular el cual inhibe el crecimiento normal de células epiteliales normales o malignizadas, sin embargo, estimula la proliferación del tejido conectivo. Por ello sus efectos son más ubícuos y los procesos translacionales más difíciles de seguir mientras en la AMH sus acciones son más dirigidas a estructuras gonadales y por ello está sirviendo su estudio para comprender los procesos moleculares de secreción de esta familia de glicoproteínas tan interesante para establecer estrategias terapéuticas de procesos neoplásicos.

3.3. Control hormonal

El control hormonal de la MIS ha sido estudiado en modelos animales y en sistemas de cultivo de tejidos. Testículos de ratas recién

nacidas, tratados con antisuero de la hormona hipotálamica gonadal LHRH tienen una mayor bioactividad de MIS que los testículos tratados, solamente, con vehículo del ensayo (50), y el tratamiento de los recién nacidos, cinco días después del nacimiento, con hormona pituitaria FSH revertían dicha acción. Sin embargo, la hormona placentaria gonadotropina coriónica (hCG) no tenía efecto (51). Parece que existe un papel en la regulación de MIS a través del axis gonadal (51). Y otros datos confirman la inhibición de MIS por FSH, pareciendo que dicha modulación es mediada por vía transcripcional (52). Por otra parte, la testosterona y hormona placentaria hCG (gonadotropina coriónica) y el LH (luteotropina pituitaria), en contraste con FSH (hormona pituitaria folicular) regulan el MIS post-translacionalmente, ya que aceleran el proceso de rotura de MIS en los fragmentos N y C-terminales (52).

En cultivo de células de Sertoli o de testículos tratados con FSH se encuentra un aumento de AMP (adenosín-monofosfato) cíclico pero, en cultivos, ni la gonadotropina coriónica (hCG) ni el FSH tenían efecto sobre la expresión de mRNA (ácido ribonucleico mensajero) de MIS. No obstante, en cultivo de células granulosas de ovario, fue inducido mRNA de MIS, por AMP cíclico y por gonadotropina coriónica, pero no por FSH, insulina o progesterona (53). Estas experiencias siguen en curso para poder establecer la modulación hormonal de la expresión de mRNA de MIS por dichas hormonas.

En los últimos tiempos otra cuestión que ha llamado la atención científica es la inversa correlación que existe entre los niveles plasmáticos postnatales, en los machos, de testosterona y de MIS, en diferentes etapas postnatales. Ello, intuitivamente, parece indicar una regulación andrógena de la expresión de MIS o bien de los equilibrios de testosterona por MIS o ambos. Sí que hay una regulación de la testosterona por MIS en las células de Leydig y actualmente parece que los bajos niveles de testosterona o alteraciones de los equilibrios de su expresión modifican la expresión de MIS. Sin embargo, hay que decir que en este momento la regulación hormonal de MIS es un mecanismo intrincado que no está establecido a pesar de la mucha investigación realizada al respecto (9). Y dicho conocimiento sería útil para poder restaurar la expresión de MIS en ovarios en edades avanzadas, como terapéutica para la curación de cánceres postmenopáusicos femeninos (9).

3.4. Receptores

El estudio de los mecanismos moleculares implicados en la transducción de señal de MIS ha ido en paralelo, aunque con un progreso más lento al estudio de los de la familia del TGF β (54). La transducción de señales de los miembros de esta familia es un proceso complejo hoy bastante establecido que trataremos de resumir a continuación.

La transducción de señales por los miembros de la familia de TGF β de homodímeros de glicoproteínas ocurre en una secuencia de acontecimientos característica que se inicia con la unión del ligando a un complejo heteromérico de serina/treonina quinasas transmembranares, terminando con la fosforilación del receptor tipo I (también llamado *activin-receptor like kinase*, ALK) por el receptor tipo II. Las rutas de transducción de señales utilizadas por la familia de TGF β presentan dos opciones, una la que utiliza el TGF β y el grupo de tipo activina de receptores tipo I (ALK-1, 4 y 5) y otra la utilizada por el grupo de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP) y factores de crecimiento y diferenciación (GDF) como las ALK-2, 3 y 6. Dentro de la familia, la especificidad viene determinada por el receptor tipo II, que une al ligando cooperativamente con el receptor tipo I en el caso de BMP/GDF, o bien recluta para el complejo al receptor tipo I apropiado en el caso de TGF β /activina. El receptor tipo II activado por el ligando fosforila al receptor tipo I, lo cual, a su vez, activa así su actividad quinasa latente para la consiguiente iniciación de la vía intracelular de las proteínas Smad, que normalmente se translocan al núcleo para activar la expresión génica (55).

Existen tres clases de proteínas Smad, las reguladas por receptores R-Smads (Smads inhibitoras), y la Smad común (Smad 4) (55). Las R-Smads 2 y 3 son fosforiladas por los receptores tipo I TGF β /activin (ALK-4 y 5), mientras que las R-Smads 1, 5 y 8 son fosforiladas por los receptores tipo I BMP/GDF (ALK 2, 3 y 6). Una vez fosforiladas las Smad se dimerizan con la Smad 4 común para formar complejos heteroméricos que se translocan al núcleo y ejercen sus respectivas funciones por su unión al elemento de respuesta a Smad (CAGAC). Bien uniéndose en solitario con una baja especificidad o formando un supercomplejo con cofactores que modulan la expresión génica de forma específica para cada ligando, como ocurre con la proteína ligadora del elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB) (56).

3.4.1. *Receptor de MIS tipo II*

El ARN mensajero del receptor de MIS tipo II fue localizado por primera vez por hibridación *in situ* en el conducto de Müller en el momento en que estaba efectuándose su regresión. Las células de Sertoli en el macho, y las células granulosas en la hembra rodean a las células germinales y producen MIS, la expresión del ligando y el receptor por la misma célula sugiere una actividad autocrina que se da en el periodo fetal en la gónada del macho y, en periodo postnatal en la gónada de ambos. En los testículos perinatales no hay una gran expresión, siendo elevada solamente en el periodo embrionario y postpuberal (57). Dado que el ratón hembra *knock-out* homocigoto del receptor tipo II del MIS presenta una fertilidad y fecundidad normales, parece que el MIS no se requiere para la implantación del blastocisto ni para el desarrollo fetal o embrionario.

Parece que el único factor de transcripción esencial para la expresión del receptor tipo II de MIS es el SF-1 (58). La región del promotor del gen que expresa el receptor tipo II contiene dos sitios de unión del SF-1 que funcionan independientemente. Incluso se ha descrito que la unión simultánea de ligando a ambos sitios SF-1 daría como resultado una inhibición de la expresión.

La eliminación homocigótica de Wnt-7, un miembro de la familia de proteínas Wg/Wnt, que determinan el destino y polaridad celular y la conformación en etapas tempranas, produce la pérdida de la expresión del receptor tipo II de MIS en el conducto Müller (59). Estos ratones, sin dichas proteínas, fueron estériles porque los conductos de Müller, que no han desaparecido, bloquean el paso del espermatozoide en machos y alteran la diferenciación de los oviductos y el útero en hembras.

3.4.2. *Receptor tipo I del MIS*

Aunque se han clonado varios receptores tipo I de la familia TGF β , la identidad del receptor tipo I del MIS está todavía siendo objeto de estudio. La localización del ARN mensajero de ALK2 en el mesénquima que rodea el conducto de Müller embrionario en el momento de su regresión le convierte en un potencial candidato (9). La utilización

de oligonucleótidos antisentido de la secuencia que codifica el ALK2 bloqueó de forma específica la regresión del conducto de Müller (60). También la localización del ARN mensajero de ALK2 con el receptor tipo II del MIS en el mesénquima que rodea el conducto de Müller apoya la identidad de ALK2 como receptor tipo I del MIS (60).

Existen evidencias recientes que indican que Smad 1, 5 y 8 que transducen señales para varios ligandos de BMP/GDF transducen, también, señales para el MIS (60). Es muy probable que las proteínas Smad reguladas por el receptor de MIS formen parte de la ruta BMP/GDF, pero también es posible que la elección de una Smad determinada sea específica de cada tejido o célula. Por todo ello, sería muy interesante conocer la ruta de transducción de la señal del MIS en cada tejido y en distintas situaciones, como desarrollo y tumorigénesis, con el objeto de buscar posibles agentes potenciadores o inhibidores de MIS los cuales tendrían potencial terapéutico.

Como se ve por este resumen, el único receptor de MIS hallado es el II, pero no cabe duda de que el estudio molecular de la transducción de señales de esta hormona aportará un interesante conocimiento a la compleja señalización de esta familia.

3.5. Acciones de la hormona anti-müllerian (AMH) o MIS y su utilidad actual en clínica

La principal acción de AMH o MIS es, por supuesto, la regresión, en los embriones masculinos de los conductos müllerian. En la rata pre-células de Sertoli, en las gónadas indiferenciadas, se concentran alrededor de células germinales y forman cordones seminíferos, en el día 13 postcoito. Por la tarde del 13, y antes de ser detectada la testosterona en las células de Leyding, mRNA de MIS y proteína son detectadas en las inmaduras células de Sertoli (6, 9). Por el día 15 postcoito en la rata, la actividad hialuronidasa aumenta y los constituyentes de la matriz extracelular, tales como fibronectina, empiezan a desaparecer alrededor del mesenquima. Es así como comienza la disolución de los conductos Müllerian (61) (Figura 5).



Figura 5.

Sobre el día 17 postcoito los conductos müllerian han desaparecido y solamente permanecen células mesenquimatosas. Esta cronología en el tiempo de aparición de esta hormona existe, antes o después, según que sean especies más precoces en desarrollo o menos, pero en todas las especies existe un momento de aparición del MIS, que es precisamente el comienzo de la diferenciación sexual en los machos. Por eso se dice que dicha hormona actúa como un marcador biológico de la diferenciación sexual, del mismo modo que tiene un periodo de acción, pasado el cual, no habría regresión de conductos müllerian porque serían insensibles a ella. De aquí una de las causas de las anomalías morfológicas posibles en los embriones masculinos (10).

3.5.1. *Acción sobre actividad «aromatasa», maduración de células germinales y morfogénesis*

De todo lo expuesto se deduce que la AMH está producida exclusivamente por células somáticas gonadales en ambos sexos, sin embargo, existen grandes diferencias de secreción en ellos. Las células inmaduras de Sertoli sintetizan grandes cantidades de AMH que se acumula en el retículo endoplásmico rugoso, en los embriones mas-

culinos y, sin embargo, las células granulosas del ovario sintetizan la hormona de forma medible solamente después del nacimiento en el organismo femenino y siempre en pequeñas cantidades. No obstante se ha observado expresión de MIS en ovarios humanos de 32 semanas de gestación y en rata a los tres días postnatal (9).

Actualmente se han estudiado *in vitro* las acciones que ejerce en el ovario fetal la secreción de AMH. Se ha visto que cuando es añadida en cantidades altas la AMH, por una parte, inhibe el número de células germinales del ovario y, además, histológicamente, van diferenciándose los ovarios, apareciendo estructuras masculinizadas con cierto parecido a células de Sertoli de los testículos masculinos. Por otra parte, se ha medido en los medios de cultivos de ovario, en los que se añade, o no, AMH, la testosterona y el estradiol por radioinmunoensayo, así como la actividad enzimática «aromatasa», la cual es un miembro de la superfamilia del citocromo 450, que transforma la testosterona con 19 carbonos en estradiol con 18 carbonos (Figura 6).

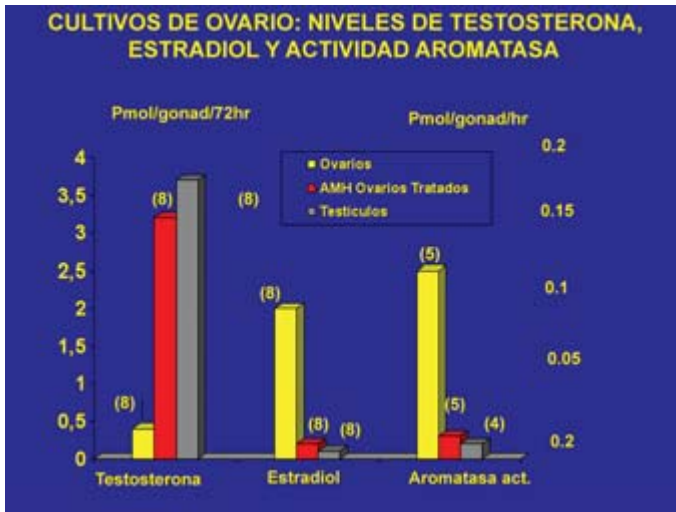


Figura 6. En cultivo de ovarios se mide la testosterona, el estradiol y la actividad enzimática «aromatasa» antes y después de añadir AMH. Se encuentra un paralelismo entre la disminución de dicha actividad enzimática y la disminución de estradiol. El AMH de las células granulosas del ovario, en exceso, disminuye la actividad aromatasa e impide el paso de testosterona a estradiol en el ovario. Esa alteración de la esteroidogénesis ovárica por aumento de AMH, viriliza los ovarios por exceso de testosterona. Figura modificada de cita bibliográfica (37).

Y se ha visto que la testosterona aumenta en los ovarios cultivados con AMH, y disminuye el estradiol que secretan los ovarios de forma paralela al descenso de la actividad aromatasa. La disminución de actividad aromatasa en los cultivos de ovarios se ha utilizado, también, para medir la actividad AMH (37). Por tanto, la habilidad de MIS para cambiar la secreción de los ovarios inmaduros, fetales, por inhibición de la aromatasa, impide la normal esteroidogénesis ovárica y el paso de testosterona a estradiol (Figura 3), lo que explica la virilización que se produce con la aparición de tubos seminíferos por acción de la MIS, ya que es debido, realmente, a la testosterona ovárica acumulada. Ello explica, también, la virilización del «freemartin» en los bóvidos, porque ese gemelo hembra recibe a través de la placenta, cuando tiene ovarios inmaduros, tasas altas de MIS y de testosterona de su gemelo masculino. Mostrando todo ello que los niveles adecuados de MIS son importantes, también para la normal esteroidogénesis ovárica. Recientemente, se están realizando estudios que muestran la utilidad de las acciones en ovario de la AMH para utilizar su dosificación como marcador en ovarios poliquísticos o de la función ovárica en otras patologías (62, 63).

Expresión del receptor II de AMH ha sido encontrado en las células de Sertoli (9). Pero, además, como continúa, después de la inhibición del canal de Müller, produciéndose en los testículos a lo largo de la gestación, Jost ya sugirió un papel de esta hormona sobre las células de Sertoli inmaduras y en plena formación. Experimentos posteriores mostraron, efectivamente, en las células de Sertoli, una acción de la MIS sobre el control de maduración de las células germinales.

También se ha encontrado una acción de MIS, de forma independiente de cAMP, sobre la meiosis de los ovocitos de rata, produciendo una inhibición que puede ser revertida por anticuerpo anti-MIS y por EGF (factor de crecimiento epidérmico) (64), lo cual muestra la especificidad de la acción. Estos encuentros sobre el control de MIS sobre la maduración de células germinales en ambos, machos y hembras, podrían, en el futuro, ser aplicables como anticonceptivo, con menor riesgo que los actuales.

De otros efectos de MIS, por exceso o defecto de la hormona, hablaremos al exponer las investigaciones con animales transgénicos

y en los que no expresan MIS (animales *knock-outs*). Pero de cualquier forma, estos resultados ilustran el crítico papel que MIS puede tener en la morfogénesis gonadal, lo cual puede afectar, secundariamente, a la diferenciación de los genitales externos.

3.5.2. *Acción sobre la maduración del pulmón y descenso de los testículos*

En humano, el síndrome de fallo respiratorio del recién nacido, el cual es secundario a inmadurez pulmonar por deficiencia de surfactante, ocurre más frecuentemente en machos que en hembras (65). Los andrógenos inhiben la síntesis de fosfatidilcolina, el cual es un fundamental componente del surfactante pulmonar (65). Como MIS tiene niveles altos en el feto en la última parte de la maduración del pulmón, en la que la testosterona desciende, se estudiaron los efectos de MIS sobre la acumulación de fosfatidilcolina. Fragmentos de pulmón de fetos femeninos se incuban con testículos fetales o con ovarios, o bien con concentraciones de MIS. Se obtiene que tanto los fragmentos de testículo fetal, o el MIS añadido, suprimen la acumulación de fosfatidilcolina cuando se comparan con los pulmones incubados con ovario o con buffer. Lo mismo se obtiene si a fetos de 19 días se les inyecta MIS. Se cree que el MIS actúa por existir sus receptores en el pulmón. Y esta cuestión se sigue investigando ya que sería la causa de la frecuencia en los neonatos masculinos de la deficiencia pulmonar. Actualmente, se sugiere que serían los pulmones un fácil órgano para el estudio de los receptores de MIS (9, 10). Además, la existencia de esos receptores han llevado al estudio de la posibilidad de utilización de AMH en cánceres de pulmón (9).

Por otra parte, la primera etapa de desplazamiento de las gónadas hacia los riñones ocurre muy pronto en la embriogénesis en ambos sexos, pero, después, el movimiento transabdominal de los testículos, como un resultado de su crecimiento, está bajo control de la MIS. Si bien, posteriormente, el desplazamiento testicular ya está regido por andrógenos. Todo ello es muy patente en pacientes con el llamado síndrome persistente de conductos müllerian (PMDS) (*persistent Müllerian duct syndrome*), en el que se secreta normalmente la sustancia inhibidora de müllerian o MIS, pero estos pacientes tienen resistencia a su acción por defecto del receptor de MIS o

por mutación del gen. En humano, este síndrome es heterogéneo, unos pacientes tienen niveles bajos de MIS, otros normales, o bien no, y otras veces carecen de MIS bioactivo por mutaciones en el gen de MIS o de su receptor (10). Y todas estas anomalías conducen a mala localización de los testículos con alto emplazamiento. Pero estos pacientes con testículos abdominales, no descendidos, se ha visto que tienen niveles anormales de MIS en plasma en diversas etapas de su desarrollo (10).

3.5.3. *MIS en el adulto*

Aunque la principal actividad del MIS es provocar la regresión del conducto müllerian en embriones machos, este factor se sigue produciendo en testículos adultos. Los ovarios empiezan a producir bajos niveles de MIS ya en etapas próximas al nacimiento, pero son difíciles, realmente, de detectar antes de la pubertad y periodo adulto porque es, entonces, cuando estos niveles son claramente medibles. Uno de los grandes desafíos de la investigación sobre la MIS es precisamente comprender las otras funciones de ella. Y ha sido el estudio de ratones transgénicos y *knock-out* de MIS lo que ha permitido señalar su importante papel en la esteroidogénesis y la función ovárica. Observando los fenotipos de ratones manipulados para sobre-expresar o anular MIS o su receptor II, se ha postulado un efecto paracrino del MIS en la diferenciación y funcionalidad de las células de Leydig. En particular, se ha implicado a MIS en la diferenciación desde células progenitoras a células de Leydig inmaduras (66).

3.5.4. *Estudios actuales sobre modelos de animales transgénicos y knock-out del MIS*

Actualmente, se han realizado ya multitud de estudios sobre animales que hiperexpresan MIS, transgénicos, o que no la expresan, *knock-out*, fundamentalmente en ratas y ratones. Estos estudios están aclarando muchas de las acciones que hemos ya descrito (Figura 7).

La sobre-expresión de MIS en ratones hembras provocó un fenotipo hembra con atrofia vaginal y ausencia de útero y trompas de

Falopio (46), confirmando *in vivo* que la expresión de niveles normales de MIS es suficiente y necesaria para la regresión del conducto mülleriano. Los machos que sobre-expresan MIS también presentan anomalías, como una escasa virilización externa, insuficiente desarrollo del conducto wolffiano y falta de descenso de los testículos, probablemente debido a una hipoplasia de las células de Leydig desencadenada por una exacerbada esteroidogénesis (46).

La función de MIS y la especificidad de su receptor tipo II ha quedado inequívocamente demostrada con la obtención de modelos *knock-outs* para MIS (67), e independientemente, en modelos *knock-outs* para el receptor tipo II (68), porque en ambos modelos se producen fenotipos idénticos con retención de los conductos müllerianos. Estos estudios han permitido revelar el papel de MIS y su receptor en el desarrollo y diferenciación de las células de Leydig. Produciendo la falta de MIS en adultos hiperplasia de dichas células y tumores de las células de Leydig que no son frecuentes.

**ESTUDIO SOBRE ANIMALES
TRANSGÉNICOS Y KNOCK-OUT**

- Exceso de AMH (transgénicos)

(Produce anomalías en fenotipo en ambos sexos)

- Defecto de AMH (knock-out)

a) Ambos anulaci ón de AMH o de su receptor
específico II retenci ón de conductos Müllarian en
machos

b) Aclaran papel de AMH y receptor II sobre células de
Leydig

Figura 7. El estudio de animales transgénicos que hiperexpresan AMH permite *in vivo* observar las consecuencias en adulto del exceso de AMH. Los animales *knock-out*, los que no expresan AMH o no expresan su receptor específico II, han permitido la observación *in vivo* de la regresión del canal de Müller como acción específica de la hormona AMH y, también, sus acciones reguladoras sobre las células de Leydig.

3.5.5. *Posible acción sobre la célula cancerosa*

En 1950 Hamilton y Teng (69) describieron el concepto de muerte celular programada o apoptosis, y, después, fue descrita la regresión de los conductos müllerian como un ejemplo clásico de apoptosis producida, durante la organogénesis, en la remodelación de tejidos. Este proceso es el que se sigue, en el mundo animal, para eliminar las membranas interdigitales en muchas especies, en la modelación de brácteas y en muchos otros órganos. Está caracterizado por la formación intracelular de partículas ricas en lisosomas, las cuales preceden a la fagocitosis por las células vecinas. Por el microscopio electrónico se puede seguir la regresión de los conductos müllerian y, claramente, visualizar el proceso de autofagocitosis. También se ha seguido el proceso en estudios *in vitro* realizados en cultivo con fragmentos de testículos fetales.

Uno de los primeros fenómenos que se aprecia es la rotura de las membranas basales, como primer signo de canales müllerian en regresión. La fragmentación va acompañada de desaparición de fibronectina y separación de células epiteliales que pasan hacia el mesénquima (9). Con la formación de una transformación epitelial-mesenquimal que se incorpora en el mesonephros, el cual, finalmente reabsorbido, también desaparece. Hay un cruzamiento entre capas epiteliales y mesenquimáticas para que los conductos müllerian desaparezcan. Actualmente, está totalmente establecido que MIS induce apoptosis en las células epiteliales de los canales müllerian por un mecanismo paracrino, ya que se ha encontrado el receptor II de MIS en zonas mesenquimáticas (9). También se conoce que la parte de los conductos müllerian que, en las hembras, se convierten en tubos de Falopio son más sensibles a la acción regresiva de MIS (70).

Este papel de MIS, como inhibidor del crecimiento celular, despertó, en seguida, la sospecha de que quizá podría, postnatalmente, continuar su acción sobre tejidos que hubieran sido originados en los conductos müllerian, y se pensó que quizá podría, postnatalmente, continuar su acción sobre tejidos tumorales que hubieran sido originados en dichos conductos. Se sugirió que se podrían suprimir así proliferaciones neoplásicas. Es decir, el posible uso terapéutico de MIS como represor de tumores. Todo ello ha estimulado, sin duda, el estudio de esta hormona.

Realmente, hoy se piensa que el estudio de los mecanismos responsables de la regresión de los conductos müllerian debe facilitar, y ser un modelo, para encontrar terapéuticas para los tumores ováricos. La histología de los conductos müllerian coincide con la hallada en los carcinomas más corrientes de ovario, los cistadenocarcinomas, los cuales son llamados, frecuentemente, tumores müllerian (70).

Carcinomas epiteliales ováricos han sido estudiados, ya que ellos, histológicamente, aparecen como tejidos derivados de los conductos müllerian. Estos tumores representan, en humano, el 95% de los carcinomas ováricos y ocurren fundamentalmente en ovarios postmenopáusicos después que la producción de MIS en ellos cesa.

Se han realizado muchos estudios al respecto. Ya en 1979 fue inhibido un carcinoma humano ovárico por MIS bovino parcialmente purificado (71). También se encontró la inhibición de crecimiento de una colonia de células procedente de un carcinoma humano por MIS bovino (72) y, también, inhibe el MIS de bóvidos distintos cánceres ováricos, endometriales y de otro tipo, *in vitro* (9, 10). De todos estos estudios se concluyó que el método de purificación de la hormona anti-müllerian o MIS era muy importante para su acción inhibidora en los carcinomas ováricos. Se ensayaron purificaciones de la hormona por cromatografía de inmunoafinidad que parecía tener un 95% de pureza después de hacer una electroforesis en gel de poli-acrilamida. Se concluyó que la purificación por cromatografía de inmunoafinidad, seguida de una simple elución ácida (73) parecía ser efectiva para inhibir una variedad de tumores ginecológicos *in vivo e in vitro* (74). En todos estos trabajos se ha visto que es útil utilizar MIS en terapéutica de tumores sometiendo, previamente, la molécula a proteólisis, ya que, como mencionamos anteriormente, el fragmento C-terminal de la molécula de MIS es más activo. Pero una limitación de usar el fragmento C-terminal es que *in vivo* es más inestable que la molécula entera, porque la existencia del fragmento N-terminal da estabilidad a la molécula de MIS. Por ello parece que un sistema óptimo de utilización de MIS *in vivo* sería que la rotura y activación molecular de MIS ocurriera en el tumor mismo. Por esta causa se está trabajando para encontrar la enzima proteolítica endógena en los conductos müllerian que rompa la hormona MIS en ellos (9, 10).

3.5.5.1. MIS como marcador patológico

Finalmente hay que señalar la gran utilidad actual de utilizar los niveles plásmáticos de MIS como marcadores de tumores de ovario juveniles y postmenopáusicos. Los niveles de MIS son enormemente elevados en plasma en mujeres con tumores en las células granulosa ováricas (75) y lo mismo sucede en los hombres con tumores que tienen su origen en las células de Sertoli (76). Actualmente, el ensayo enzimático ELISA debe ser usado para detectar tumores incipientes que luego son explorados tomográficamente o por resonancia magnética. En tumores ováricos juveniles ello es más eficaz que utilizar los niveles de estradiol (75).

Y, evidentemente, es muy útil utilizar los niveles en plasma de MIS para evaluar y diagnosticar pacientes con desórdenes de intersexo (77), producidos por insensibilidad a los andrógenos o alteraciones en la esteroidogénesis, particularmente, en niños o jóvenes, en los cuales los niveles de testosterona son fluctuantes y sólo pueden ser evaluados estimulando con gonadotropina coriónica o LH (hormona pituitaria gonadal). La valoración de los niveles de MIS son definitivos en todos los casos de pacientes con ambigüedad genital masculina. Dada su importancia hay que señalar que en 1999 en *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* se publicó, firmado por treinta científicos, el estudio de 107 casos de pacientes con patología intersexual que utilizaron el MIS como marcador (77).

Todas estas funciones de MIS como marcador de patologías o en la terapéutica de tumores, así como el gran interés de su estudio para llegar a comprender sus posibles aplicaciones futuras, fueron denunciadas, en el 2006, en un artículo del *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (78).

4. CONCLUSIONES

De toda esta exposición hemos de destacar que el estudio de la diferenciación sexual de mamíferos es un muy relevante ejemplo de la interacción de genes con factores externos, hormonas, que producen toda una programación génica que es la causante del dimorfismo sexual. Esta interacción tiene como resultado, a nivel periférico,

la morfogénesis de gónadas masculinas y femeninas y, también, la diferenciación del hipotálamo a nivel cerebral. En la periferia las gónadas, sin la intervención de las secreciones de los testículos fetales, la testosterona y la hormona anti-müllerian, los embriones genéticamente femeninos (XX) o masculinos (XY) se desarrollarían femeninos.

En la diferenciación sexual cada etapa de diferenciación es una consecuencia de la anterior de forma muy dependiente y gradual. La etapa de desarrollo del sexo genético, durante la fecundación, con la existencia, o no, del cromosoma Y determinará la diferenciación del testículo en la etapa gonadal y, posteriormente, las secreciones de las gónadas rigen la determinación del fenotipo con todos los caracteres secundarios sexuales en ambos sexos.

Todo lo enunciado por el Profesor Jost en 1947 se ha cumplido exactamente. Después de los trabajos iniciados, fundamentalmente, por Gorski, en 1965, conocemos, además, que lo mismo que sucede en el dimorfismo gonadal por influjo de las secreciones del testículo fetal, también la testosterona fetal logra, a nivel cerebral, la diferenciación dimórfica del hipotálamo, en hipotálamo femenino y masculino, y como consecuencia modifica las secreciones neuroendocrinas y la conducta sexual. Dicho dimorfismo sexual cerebral estamos ahora aún comenzando a descubrirlo y estudiarlo. En este dimorfismo sexual cerebral se instalan diferencias de conectividad sináptica con implicación de neurotransmisores todavía no conocidas en toda su complejidad y sabemos, también, que la testosterona, o mejor el estradiol proveniente de ella, tiene acciones estructurales en determinadas zonas del cerebro, lo cual da diferencias en el volumen y número celular de ellas, parece ser que por inhibición de la apoptosis celular, con diferencias significativas en ambos sexos (35). También está claro que en periodo adulto las hormonas sexuales tienen una acción *activadora* de los circuitos neuronales cerebrales que ellas mismas son capaces de establecer, de forma irreversibles, en etapas inmaduras.

En estas épocas tempranas las modificaciones no se limitan pues, como se pensó en principio, a conformaciones sutiles de tipo conectividad cerebral sino a profundas conformaciones estructurales que modifican el volumen de determinadas zonas en el cerebro. Es decir,

en periodos inmaduros la acción de las hormonas gonadales a nivel cerebral es de *organizadoras* de los circuitos neuronales que se están conformando. Aunque, actualmente, muchos de estos procesos cerebrales nos son todavía desconocidos (34, 79).

Hoy, en el momento en que las finas técnicas de la biología molecular están permitiendo la clonación del gen de MIS y sus receptores, el descubrimiento de Jost planteado con visión estrictamente fisiológica, y realizado con técnicas quirúrgicas, resulta una aportación más sugestiva que nunca, con aplicaciones terapéuticas muy por encima de las que él podía vislumbrar. Además de su papel para aclarar patologías y anomalías de intersexualidad, con ser ya éstas enormemente útiles y necesarias, parece que, en este momento, estamos comenzando a descubrir facetas del *factor de Jost* que no sabemos aún donde nos llevarán.

En el año 1989 el Profesor Jost vino a Madrid a un Congreso Internacional de Bioquímica Perinatal organizado por el Doctor José Manuel Cuezva y por mí y subvencionado por la Fundación Ramón Areces (80), y dio una espléndida conferencia sobre su hormona. En el coloquio le pregunté qué más acciones se presumía que podía tener dicha hormona, sonriendo me dijo: «*probablemente acciones sobre las secreciones de la corteza suprarrenal*» ... no he encontrado, hasta el momento, nada realizado al respecto pero, sin embargo, son evidentes, ahora, sus acciones en la esteroidogénesis en el ovario, en periodo postnatal y, también, sobre las células de Leydig. El tiempo dirá si, también, las tiene sobre la esteroidogénesis de las hormonas suprarrenales.

Para terminar, y a título de sugerencia: ambas secreciones testiculares del feto, testosterona y MIS, producen y rigen el dimorfismo sexual gonadal, que hemos llamado periférico, pero sólo conocemos, hasta el momento, que la testosterona diferencia el hipotálamo, y aunque la hormona anti-müllerian actúa de forma paracrina en la regresión de los conductos de Müller y a pesar de ello, quizá podemos preguntar, ¿encontraremos en el futuro alguna acción de AMH en el cerebro? ¿existirán en él sus receptores que acabamos de descubrir?... Dejo la pregunta en el aire.

De cualquier forma que sea, el estudio de la hormona anti-müllerian nos está, sin duda, ayudando a aclarar esa intrincada familia de

las TGF β , absolutamente importantes en los procesos neoplásicos. Todas estas consideraciones ponen de relieve que el descubrimiento de la hormona anti-müllerian del Profesor Jost parece poder adquirir en el futuro dimensiones insospechadas.

5. AGRADECIMIENTOS

Esta revisión se dedica a la memoria del Profesor Jost por su Magisterio. Trabajé en su laboratorio, aproximadamente, cuatro años, y me considero una de sus muchos discípulos. El Profesor Jost, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Ciencias de París, recibió en 1965 el Premio Científico de la Ciudad de París. También se le otorgó, finalmente, la Legión de Honor. Alfred Jost nos visitó y dió una Conferencia en esta Academia: Jost, A. (1978), «Les facteurs endocriniens de la croissance prénatale et néonatale», *Anal. Real. Acad. Farm.*, vol. XLIV, núm. 3, págs. 561-80.



Medalla conmemorativa del homenaje ofrecido en la Sorbonne por sus discípulos al Profesor Jost en París con motivo de su jubilación y de su elección para el Colegio de Francia. En el envés, izquierda, el busto del Profesor Jost y en el revés, derecha, la fachada del Colegio de Francia.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Pascual-Leone, A. M. (2008) *Desarrollo de mamíferos a la luz de los conocimientos científicos actuales: su interés sanitario*. Discurso leído en Sesión Inaugural el 17 de enero 2008 en la Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, págs. 1-60.

2. Pascual-Leone, A. M. (2008) Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: alteraciones corticosuprarrenales, en *Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas*. Edts. A. M. Pascual-Leone y J. M. Medina, Monografía XXIII, Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España y Fundación Ramón Areces, págs. 27-69.
3. Pascual-Leone, A. M. (2005) Control neuroendocrino del balance energético: el adiposito secretor, en *Mecanismos moleculares y neuroendocrinos del balance energético: patologías*. Editor: A. M. Pascual-Leone. Monografía XVIII. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España, págs. 23-64.
4. Pascual-Leone, A. M. (1998) Nutrición y desarrollo: regulación de los factores de crecimiento IGFS. *Anal. Real. Acad. Farm.* 64: 347.
5. Pascual-Leone, A. M. (2007) Desarrollo fetal y neonatal, en *Procesos epigenéticos: postformación y factores externos*, págs. 45-89. Curso 23-26 de octubre de 2006. Coordinador: A. M. Pascual-Leone, Instituto de España, Madrid.
6. Jost, A. (1947) Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 36: 271-315.
7. Migeon, C. J. (1984) Organisation globale de la différenciation sexuelle masculine, en *Médecine de la reproduction masculine*. Ed. Schaison, G.; Bouchard, P.; Mahoudeau, J. F. Labrie Flammarion Médecine-Sciences, Paris, Francia, and Presses de l'Université de Montreal Canada, págs. 178-200.
8. Pfaff, D. W. (1970) Nature of sex hormone effects on rat sex behaviour: Specificity of effects and individual patterns of response. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 3: 49-358.
9. Teixeira, J., Maheswaran, S. & Donahoe, P. (2001) Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocrine Reviews*. 22 (5): 657-74.
10. Lee, M. M. & Donahoe, P. (1993) Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews*. 14: 152-64.
11. McEwen, B. S. (1976) Interactions between hormones and nerve tissue. *Scientifique American*, julio, págs. 48-58.
12. Pfeiffer, C. A. (1936) Sexual differences of hypophyses and their determination by gonads. *Amer. J. Anat.* 58: 195.
13. Hendricks, E. E. & Gerall, A. A. (1970) Effect of neonatally administered estradiol on development of male and female rats. *Endocrinology*. 87: 435.
14. Pascual-Leone, A. M. (1985) Efecto de las hormonas sobre la maduración cerebral, en *Curso Monográfico sobre Neuroquímica*. M. P. González, A. M. Pascual-Leone, M. J. López, B. Ribas, J. M. Culebras, M. T. Miras, Editorial Universidad Complutense de Madrid, pág. 71.
15. Pascual-Leone A. M. (1985) Interacciones entre el sistema nervioso y el endocrino, en *Curso Monográfico sobre Neuroquímica*. M. P. González, A. M. Pascual-Leone, M. J. López, B. Ribas, J. M. Culebras, M. T. Miras, Editorial Universidad Complutense de Madrid, pág. 303.
16. Gorski, R. A. & Wagner, J. W. (1965) Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. *Endocrinol.* 76: 226.
17. Pfaff, D. K. & Keiner, M. (1973) Atlas of estradiol concentrating cells in the Central Nervous System of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151: 121-156.

18. Pfaff, D. (1980) *Estrogen and brain function*. Edited by Spriger-Verlag, Heidelberg, Berlin.
19. Zigmond, R. E. & McEwen, B. S. (1970) Selective retention of estradiol by cell nucleus in specific brain regions of the ovariectomized rat. *J. Neurochem.* 17: 889-99.
20. Quadagno, D. M., Shryne, J. & OKerski, R. A. (1971) The inhibition of steroid induced sexual behaviour by intrahypothalamic actinomycin. *D. Horm. Behav.* 2: 1-10.
21. Gorski, R. A., Gordon, J. H. *et al.* (1978) Evidence for morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat. *Brain Res.* 148: 333-46.
22. Gorski, R. A., Harlan, R. E., Jacobson, C. D. *et al.* (1980) Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptica area. *J. Comp. Neurol.* 293: 529-39.
23. Raisman, G. & Field, P. M. (1971) Sexual dimorphism in the preoptica area of the rat. *Science.* 173: 731-33.
24. Corbier, P., Edwards, D. A. *et al.* (1992) The neonatal testosterone surge: a comparative study. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 100: 127-31.
25. Pascual-Leone, A. M. (1985) Hipotálamo: neuronas endocrinas y secreciones internas, en *Curso Monográfico sobre Neuroquímica*, M. P. González, A. M. Pascual-Leone, M. J. López, B. Ribas, J. M. Culebras, M. T. Miras, Editorial de la Universidad Complutense, Madrid.
26. Pfaff, D., Arnold, A. *et al.*, edits. (2002) *Hormones, Brain and Behaviour*. San Diego. Academic.
27. McEwen, B. S. (2001) Invited reviews. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanism. *J. Appl. Physiol.* 91: 2785-2801.
28. McEwen, B. A. & Alves, S. E. (1999) Estrogen action in the central nervous system. *Endocr. Rev.* 20: 279-307.
29. Sellix, M. T.; Egli, M. *et al.* (2004) Ovarian steroid hormones modulate circadian rhythms of neuroendocrine dopaminergic neuronal activity. *Brain Res.* 1005: 164-81.
30. Ter Horst, G. J. *et al.* (2009) Sex differences in stress response: focus in ovarian hormones. *Physiol. Behav.* doi: 10.1016/j.physiolbeh.2009,02.036.
31. Shupnik, M. A. (2002) Estrogen receptors, receptor variants and estrogen actions in the hypothalamic-pituitary-axis. *J. Neuroendocrinol.* 14: 85-94.
32. Rissman, E. F. (2008) Receptors alpha and beta in behavioural neuroendocrinology: beyond Yin/Yang. *J. Neuroendocrinol.* 20: 873-879.
33. Koehler, K. F.; Helguero, L. A. *et al.* (2005) Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocrin. Rev.* 26: 465-478.
34. Simerly, R. B. (2002) Wired for reproduction: Organization and development of sexually dimorphic circuits in mammalian forebrain. *Ann. Rev. Neurosci.* 25: 507-36.
35. Davis, E. C., Popper, P. & Gorski, R. A. (1992) The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Research.* 734: 10-18.
36. Jost, A. (1953) Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 8: 379-418.

37. Josso, N.; Cate, R.; Picard, J. Y. *et al.* (1993) Anti-Müllerian hormone: the Jost factor. *Recent Prog. Horm. Research.* 48: 1-58.
38. Lillie, F. (1916) The theory of freemartin. *Science.* 43: 611-13.
39. Wilson, D., Harrod, M. J., Golstein, J. L. *et al.* (1974) Familial incomplete male pseudohermaphroditism type I. Evidence for androgen resistance and variable clinical manifestation in a family with the Reifenstein syndrome. *N. Engl. J. Med.* 290: 1097-1103.
40. Picon, R. (1969) Action of the fetal testis on the development *in vitro* of the Müllerian ducts in the rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 58: 1-19.
41. Josso, N. (1973) *In vitro* synthesis of Müllerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. *Endocrinol.* 93: 829-34.
42. Blanchard, M. G. & Josso, N. (1974) Source of the anti-Müllerian hormone synthesized by the fetal testis: Müllerian-inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatric Res.* 8: 968-971.
43. Picard, J. Y. & Josso, N. (1984) Purification of testicular anti-Müllerian hormone allowing direct visualization of the pure glycoprotein and determination of yield and purification factor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 34: 23-29.
44. Bezdard, J., Vigier, B. *et al.* (1987) Immunocytochemical study of anti-Müllerian hormone in sheep ovarian follicles during fetal and post-natal development. *J. Reprod. Fert.* 80: 509-516.
45. Hirobe, S., He, W. W. *et al.* (1992) Expression of Müllerian inhibiting substance mRNA in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinol.* 131: 854-62.
46. Behringer, R. R., Cate, R. L. *et al.* (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature (London).* 345: 167-170.
47. Massagué, J. (1990) The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 597-64.
48. Lfíy, M. A. & Oliff, A. (1991) Transforming growth factor β -Müllerian inhibiting substance family of growth regulators. *Cancer Invest.* 9: 325-36.
49. Derynck, R., Jarret, J. A., Chen, E. Y. *et al.* (1985) Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transforming cells. *Nature.* 316: 791-705.
50. Bercu, B. B., Morikawa, Y. *et al.* (1978) Increased secretion of Müllerian inhibiting substance after immunological blockade of endogenous luteinizing hormone releasing hormone in the rat. *Pediatric Res.* 12: 139-43.
51. Bercu, B. B., Morikawa, Y. *et al.* (1979) Inhibition of Müllerian inhibiting substance secretion by FSH. *Pediatric Res.* 13: 246-49.
52. Kuruda, T. Lee, M. M. *et al.* (1991) Müllerian inhibiting substance production and rutura is modulated by gonadotropins and steroids. *Endocrinol.* 129: 2985-92.
53. Voutilainen, R. & Miller, L. M. (1987) Human Müllerian inhibitory factor messenger ribonucleic acid is hormonally regulated in fetal testis and in adult granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* 1:604-8.
54. Wrana, J. L., Attisano, L. *et al.* (1992) TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71: 1003-1014.

55. Kretzschmar, M. & Massagué, J. (1998) SMADS: mediators and regulators of TGF- β signalling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 691-96.
56. Chen X., Rubock, M. J. *et al.* (1996) A transcriptional partner for SMAD proteins in TGF- β signalling. *Nature.* 383: 691-96.
57. Teixeira, J., He, W. W., Shah, P. C. *et al.* (1996) Developmental expression of a candidate Müllerian inhibiting substance type II receptor. *Endocrinol.* 137: 160-165.
58. De Santa Barbara, P., Moniot, B. *et al.* (1998) Steroidogenic factor-1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 29654-550.
59. Parr, B. A. & McMahon, A. P. (1998) Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature.* 395: 707-710.
60. Visser, J. A., Olaso, R., Verhoef-Post, M. *et al.* (2001) The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Müllerian inhibiting substance signalling. *Mol. Endocrinol.* 15: 936-45.
61. Tsuji, M., Shima, H. *et al.* (1992) Effect of human recombinant Müllerian inhibiting substance on isolated epithelial and mesenchymal cells during Müllerian ducts regression in the rat. *Endocrinol.* 1331: 1481-88.
62. Chen, M. J., Yang, W. S. *et al.* (2008) The relationship between anti-Müllerian hormone, androgen and insulin resistance on the number of antral follicles in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 23(4): 962-957.
63. Lie Fong, S., Lugtembourg, P. J. *et al.* (2008) Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum. Reprod.* 23(3): 674-678.
64. Ueno, S., Manganaro, T. F. *et al.* (1988) Human recombinant mullerian inhibiting substance inhibition of rat oocyte meiosis is reverted by epidermal growth factor in vitro. *Endocrinol.* 123: 1652-59.
65. Torday, J. S., Nielsen, H. C. *et al.* (1985) Sex differences in fetal lung maturation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 123: 205-8.
66. Lee, M. M., Seah, C. C., Masiakos, P. T. *et al.* (1999) Müllerian inhibiting substance type II receptor expression and function in periphery rat Leydig cells. *Endocrinol.* 140: 2619-27.
67. Behringer, R. R., Finegold, M. J. *et al.* (1994) Müllerian inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 79: 415-25.
68. Mishina, Y., Rey, R. *et al.* (1996) Genetic analysis of the Müllerian inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes Dev.* 10: 2577-87.
69. Hamilton, T. H. & Teng, C. S. (1965) Sexual stabilisation of Müllerian ducts in the chick embryo, in De Haan, R. I., Ursprung, H. eds., *Organogenesis New York Holt. Rinehart and Winston*, 681-700.
70. Scuffy, R. E. (1970) Recent progress in ovarian cancer. *Hum. Pathol.* 1: 73-98.
71. Donahoe, P. K., Swan, D. A., Hayashi, A. *et al.* (1979) Müllerian ducts regression in the embryo correlated with cytotoxic activity against human ovarian cancer. *Science.* 205: 913-915.
72. Fuller, A. F. J. Guy, S., Donahoe, P. K. *et al.* (1982) Müllerian inhibiting substance inhibits colony growth of a human ovarian carcinoma line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54: 1051-55.

73. Ragin, R. C., Donahoe, P. K. *et al.* (1992) Human Müllerian inhibiting substance enhanced purification imparts biochemical stability and restores anti-proliferative effects. *Protein. Expression. Purif.* 3: 236-245.
74. Chin, T., Parry, R. L. & Donahoe, P. K. (1991) Human anti-Müllerian inhibiting substance inhibits tumor growth *in vitro* e *in vivo*. *Cancer Res.* 51: 2101-2106.
75. Rey, R. A., Lhomme, C., Marcillac, I. *et al.* (1996) Anti-Müllerian hormone as a serum marker of granulosa cell tumours of the ovary, comparative study with serum α -inhibin and estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174: 958-65.
76. Rey, R. A., Sabourin, J. C. *et al.* (2000) Anti-Müllerian hormone is a specific marker of Sertoli and granulosa cell origin in gonadal tumours. *Hum. Pathol.* 31: 1202-8.
77. Rey, R. A., Bellville, C., Nihoul-Fekete, C. *et al.* (1999) Evaluation of gonadal function in 107 intersex patients by means of serum anti-Müllerian hormone measurement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64: 627-31.
78. Al-Qahtani, A. & Groome, N. P. (2006) Anti-Mullerian hormone: Cinderella finds new admirers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (10), Editorial: 3760-3752.
79. García Segura, L. M. (1996) Mecanismos celulares de la diferenciación sexual del cerebro, en *Hormonas, Instintos y Emociones*, dirigida por Botella Lusiá, J., JAF Tresguerres. Curso de Verano de El Escorial. Editorial de la Universidad Complutense.
80. Cuezva, J. M., Pascual-Leone, A. M. & Patel, M. S. eds. (1990) *Endocrine and Biochemical Development of the Fetus and Neonate*. Publicación de ponencias del Annual Meeting of the Perinatal Biochemical Group of the Spanish Biochemistry Society on Biochemical Development of the Fetus and Neonate, 15-18 diciembre 1988, Madrid. Organizadores: Cuezva, J. M. y Pascual-Leone, A. M., subvencionado por la Fundación Ramón Areces. Plenum Press New York.

*** Información de contacto:**

Doctora Ana M.^a Pascual-Leone Pascual.

Académica de Número y Vicepresidenta de la Real Academia Nacional de Farmacia.
C/ Torrelaguna, 125-3.º D.

28043 Madrid.

Email: apl@ranf.com