

03088

5  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE  
BIOTECNOLOGIA  
UACPYP/CCH

"Expresión del gen del tumor de Wilms' en el sistema urogenital y durante el proceso de regeneración y desarrollo de los miembros del ajolote *Amblystoma mexicanum*"

TESIS

Que para obtener el grado de

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Presenta

M.C Katia Del Rio Schtulmann

Cuernavaca, Morelos 1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

**COMITE TUTORIAL**

Dr. Horacio Merchant-Larios

Dr. Gladys Cassab

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Dr. Patricio Gariglio

Dr. Panagiotis Antonios Tsonis

**JURADO DE EXAMEN**

**PRESIDENTE:** Dr. Alejandro Alagón Cano

**SECRETARIO:** Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

**VOCAL:** Dr. Horacio Merchant-Larios

**VOCAL:** Dr. Vicente Madrid Marina

**VOCAL:** Dr. Gustavo Pedraza

**SUPLENTE:** Dr. Federico Arturo Liévano Mendoza

**SUPLENTE:** Dr. Alejandro García Carrancá

## INDICE

RESUMEN	1-2
<b>I. GENERALIDADES</b>	
A. TRES ORGANOS INTIMAMENTE RELACIONADOS: MESONEFROS, GONADAS Y EXTREMIDADES	3-9
B. GENES QUE JUEGAN UN PAPEL DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA UROGENITAL	9-13
C. GEN DEL TUMOR DE WILMS' (WT1)	13-25
1) El gen de WT1	13-16
2) Expresión de WT1	16-19
3) Presencia del producto del gen WT1	20-21
4) Tumores de Wilms' y síndromes asociados	21-23
5) Modelo animal para el estudio de WT1	24-25
D. MODELOS PARA ESTUDIAR EL PAPEL DE WT1 EN EL AJOLOTE	
1) Espermatogénesis	25-31
2) Nefrogénesis	31-35
3) Mutante Short toes	35-37
E. REGENERACION DE LAS EXTREMIDADES EN URODELOS	37-40
<b>II. OBJETIVOS</b>	40-41
A. A LARGO PLAZO	40
B. ESPECIFICOS	40-41
<b>III. RESULTADOS</b>	42-60

V. CONCLUSIONES \_\_\_\_\_ 60-62

VI. PERSPECTIVAS \_\_\_\_\_ 62-63

VII. MATERIALES Y METODOS \_\_\_\_\_ 63-71

A) ANIMALES \_\_\_\_\_ 63-64

B) HISTOLOGIA \_\_\_\_\_ 64

C) IN SITU \_\_\_\_\_ 64-65

D) RIBOSONDAS \_\_\_\_\_ 66

E) INMUNOHISTOQUIMICA \_\_\_\_\_ 66-68

F) RTPCR \_\_\_\_\_ 68-70

G) CLONACION \_\_\_\_\_ 70-71

VIII. REFERENCIAS \_\_\_\_\_ 72-95

IX. ANEXO FIGURAS

X. APENDICE

A) ARTICULO " REGULATION OF THE WILMS' TUMOR GENE DURING SPERMATOGENESIS". DEVELOPMENTAL DYNAMICS 207: 372-381 (1996)

A. EXPRESION DE WT1 DURANTE EL PROCESO DE ESPERMATOGENESIS EN EL AJOLOTE 42-44

- 1) Expresión del mensajero de WT1
- 2) Presencia del producto de WT1

B. EXPRESION DE WT1 EN LOS OVARIOS DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES" 44-45

- 1) Expresión del mensajero de WT1
- 2) Presencia del producto de WT1

C. EXPRESION DE WT1 EN LOS RIÑONES DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES" 45-47

- 1) Expresión del mensajero de WT1
- 2) Presencia del producto de WT1
- 3) Clonación de WT1 en el ajolote "s"

D. EXPRESION DE WT1 EN LOS MIEMBROS DEL AJOLOTE EN PROCESO DE REGENERACION Y DESARROLLO. 47-49

- 1) Estudios de regeneración de extremidades
- 2) Miembros en proceso de desarrollo

IV. DISCUSION 49-60

A. EXPRESION DE WT1 DURANTE EL PROCESO DE ESPERMATOGENESIS EN EL AJOLOTE 49-52

B. EXPRESION DE WT1 EN LOS OVARIOS DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES" 52-54

C. EXPRESION DE WT1 EN LOS RIÑONES DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES" 54-56

D. EXPRESION DE WT1 EN LOS MIEMBROS DEL AJOLOTE EN PROCESO DE REGENERACION Y DESARROLLO. 56-60

- 1) Estudios de regeneración de extremidades
- 2) Miembros en proceso de desarrollo

## RESUMEN

En este estudio se analizó el patrón de expresión del gen del tumor de Wilms' (WT1) en el ajolote *Amblystoma mexicanum*. La principal aportación del estudio se relacionó al patrón de expresión en el sistema urogenital, dada la importancia de WT1 en el desarrollo de los riñones y de las gónadas en ratón. Además de estudiar específicamente el riñón y el testículo, también se estudiaron las extremidades durante el proceso de desarrollo y durante regeneración. Seleccionamos este anfibio como modelo por las siguientes razones: 1) la existencia de un mutante que se desarrolla con anomalías en su sistema urogenital y extremidades; 2) la organización de su testículo facilita la identificación la interacción entre células somáticas y germinales.

La expresión de WT1 fué detectada utilizando varias técnicas que incluyeron RT-PCR, hibridación *in situ* e inmunodetección en riñones y testículos de ajolotes silvestres y mutantes. En estos últimos se observó diferencia en el patrón de expresión de WT1 en algunas regiones de los riñones de los ajolotes mutantes en donde se encontró expresión en ciertos grupos de células desordenadas que parecían ser glomérulos que fallaron en formarse; en estos casos, WT1 parece ser un marcador de la mutación. En el testículo, no hubo diferencia en la expresión y se localizó en las células de Sertoli. Se encontró un patrón muy interesante en este tejido, pues WT1 parecía expresarse de una manera regulada, es decir, solo las

células de Sertoli asociadas con células germinales en el estadio de espermatogonia expresaron WT1. A través de hibridación *in situ* e inmunodetección, no se detectó el ARNm de WT1 en estadios más avanzados que el de espermatogonia, sin embargo el producto de WT1 también se detectó en células Sertoli asociadas con espermátocitos, espermátidas y espermatozoides. Estos resultados implican que WT1 pudiera estar involucrado en el proceso de maduración de las células germinales, y especialmente en la transición de mitosis a meiosis.

Se observó expresión de WT1 durante el desarrollo y regeneración de las extremidades de este urodelo. WT1 parece expresarse en los estadios más avanzados del desarrollo de las extremidades, cuando los cartílagos de los dedos se están formando.



## ABSTRACT

The expression of WT1 was analyzed in the axolotl *Amblystoma mexicanum*. The objective of the study was to determine the pattern of expression in the urogenital system, since Wilms' tumor gene (WT1) is known to be essential for the development of the kidneys and gonads in mouse. The kidneys and testis as well as the developing and regenerating limbs of the axolotl were chosen for this study. This amphibian was chosen as a model for the following reasons: 1) there exists a mutant axolotl that develops with abnormal urogenital system and limbs; 2) the unique organization of the testis facilitates the study of the different germ cell-somatic cell interactions.

A variety of techniques were utilized, including RT-PCR, *in situ* hybridization and immunodetection. The expression of WT1 was detected in the kidneys and testis of the wild type and mutant axolotls. The only difference in the pattern of expression was evident in the kidneys of the mutant axolotls, where WT1 expression was also detected in groups of disorganized cells that seemed to have failed to form glomeruli. In this respect, WT1 could be used as a marker for the mutation. In the testis, the expression pattern was similar in both the mutant and wild type axolotls, and it was localized in the Sertoli cells. A very interesting pattern of

expression was found in this tissue, where WT1 seemed to be regulated. Sertoli cells associated with a particular germ cell stage were the only ones expressing WT1. These were Sertoli cells associated only with spermatogonia. WT1 expression was not detected in latter stages of spermatogonia when they were analyzed via *in situ* hybridization and immunodetection. On the other hand, the product of WT1 was detected in Sertoli cells associated with spermatocytes, spermatids and spermatozoa. These results imply that WT1 could be involved in the process of germ cell maturation through Sertoli cells and in particular the transition from mitosis to meiosis.

WT1 expression was observed during limb development and regeneration in this urodele. WT1 seems to be expressed in the later stages of limb development and regeneration during cartilage formation of the skeletal elements of the distal limb.

## I. GENERALIDADES

### A. TRES ORGANOS INTIMAMENTE RELACIONADOS: MESONEFROS, GONADAS Y EXTREMIDADES

El sistema urogenital esta formado por los riñones, órganos sexuales, y los respectivos ductos asociados. Tienen un origen común durante el proceso de desarrollo embrionario, a partir del mesoderma intermedio y lateral que eventualmente se diferencian en las células que constituyen estos órganos.

El sistema renal se inicia con la formación de los pronefros, seguido por los mesonefros (riñones funcionales en anfibios). En amniotes, estos últimos desarrollan metanefros, que forman los riñones permanentes (fig# 1). Estos tres tipos de riñones se originan de la cuerda nefrogénica, derivada del mesoderma intermedio segmentado.

Durante la formación de los pronefros y mesonefros que ocurre a lo largo de la cresta urogenital, el mesénquima nefrogénico es inducido por el ducto néfrico, que se encuentra adjunto, para formar los túbulos mesonéfricos. La formación de los metanefrones ocurre a través de una inducción mutua entre las células "stem" del mesénquima y las células epiteliales del primordio del uréter (extensión de los ductos mesonéfricos), para formar los túbulos del

riñón al igual que los glomérulos (Saxen, 1987).

En los amniotes, las gónadas se forman a partir de un engrosamiento de la zona epitelial celómica derivada del mesoderma lateral, que está íntimamente asociada con los mesonefros; esta area se convierte en la cresta genital. La proliferación celular en esta area conduce a la formación de los cordones sexuales primitivos, que eventualmente son invadidas con células germinales. Por otro lado, existe una migración de células estromales provenientes de los mesonefros. Estas células, que conectan el tejido mesonéfrico y las gónadas, se denominan el rete ovarii (hembra) o el rete testis (macho).

Experimentalmente se ha demostrado que los mesonefros influyen el desarrollo, morfogénesis y función de las gónadas (Buehr et al, 1993; Merchant-Larios et al, 1993; Byskov y Hoyer, 1994). Las gónadas indiferenciadas pronto se diferencian en ovarios o testículos. En el macho, la invasión de células mesenquimales derivadas del mesonefros inducen una serie de eventos de diferenciación, incluyendo la formación de los cordones seminíferos y la diferenciación de los diferentes tipos celulares: Sertoli, Leydig, mioide. En la hembra, los cordones sexuales primitivos y el mesénquima de la médula se degeneran, mientras que el epitelio celómico continúa proliferando para producir cordones sexuales secundarios; estos cordones formarán los folículos primarios

(oogonia cubierta de células granulosas). En el ovario las células germinales entran en meiosis mientras que en los testículos, estas se arrestan en el estadio de pre-espermatogonia (Byskov y Hoyer, 1994).

Se ha demostrado que el mesonefros también influye en el desarrollo y la diferenciación de las células germinales del ovario, pues si el rete ovarii (proveniente del mesonefros) se remueve de un ovario fetal indiferenciado de ratón, y este ovario se transplanta subcutáneamente en un ratón, la diferenciación y el proceso de meiosis no prosigue (Byskov, 1974), por lo tanto existe una influencia de parte del mesonefros que permite el proceso de meiosis en el ovario.

Los primordios de las extremidades, de los riñones y de las gónadas tienen una localización muy cercana. Estos tejidos también comparten un precursor común, el mesoderma. El desarrollo de las extremidades comienza por la migración de las células mesenquimales, derivadas de la zona lateral del plato mesodérmico (que originan los precursores del esqueleto), y de las somitas (que originan a los precursores musculares) bajo tejido epidérmico en el estadio de neurula. Las extremidades se desarrollan a través de una inducción por el mesonefros, el cual dirige la proliferación de las células mesenquimales en los estadios más tempranos. Estudios en anfibios han demostrado que al remover los mesonefros, el tamaño de

las extremidades se reduce (Stephens *et al*, 1991; Geduspan y Solrush, 1992). Por ejemplo, si se cultivan *in vitro* extremidades en vitro en la presencia de mesonefros, las células mesenquimales proliferan y llegan a condensarse, para diferenciarse en cartílago con características parecidas al esqueleto normal (Geduspan y Solursh, 1993). Por otro lado, estudios de Moreno-Mendoza *et al* (1995) muestran que las células de las extremidades pueden substituir a las células del mesonefros para inducir la formación de cordones seminíferas en el macho.

Existe una serie de mutaciones que afectan por lo menos dos de los tres tejidos en discusión. Por ejemplo, los ratones con mutaciones en el locus de "limb deformity", se desarrollan con defectos en las extremidades y en los riñones. En las extremidades se observan syndactalismo (fusión de dígitos), oligodactalismo (ausencia de dígitos post-axiales), fusión de carpos, tarsos, metacarpos y metatarsos, y fusión de ulna-radio/tibia-fíbula (Woychikot *et al*, 1985); en los riñones de estos animales se observa una penetración incompleta de agenesia renal (Maas *et al*, 1994). Se ha determinado que el producto de "limb deformity", formina, es esencial para el crecimiento próximo-distal y anterior-posterior del primordio del miembro, al igual que para el crecimiento del primordio del uréter, el cual se requiere para la inducción del mesénquima metanéfrico y la subsecuente formación del

riñón permanente (Zeller et al, 1989; Maas et al, 1994). En humanos, se han publicado tres reportes de pacientes con anormalidades en las extremidades y en los riñones, parecidos a los que se observan en los ratones mutantes de "limb deformity" (Dieker y Opitz, 1969).

Los estudios de Evans et al (1992) reportan 75 casos de pacientes con defectos en las extremidades, acompañados por anormalidades en el sistema renal. Entre las anormalidades de las extremidades se incluyen microamelia (extremidad rudimentaria), amelia (ausencia de extremidad), deficiencias en radio/tibia o ulna/fíbula, y malformación de los dígitos. Las anormalidades más comunes en el sistema renal incluyeron, agenesia renal unilateral y bilateral, hidronefrosis, displasia cística, "horseshoe kidney", ectopía renal y hiposplasia renal. También existen varios síndromes en los que ocurren defectos en las extremidades y en los riñones; estos incluyen al síndrome de Fanconi, en el que se observa anemia aplásica con displasia ó aplasia del radio/pollex acompañada por defectos renales, y el síndrome de Meckel que consiste en disencefalia splancocística, acompañada por riñones poliquísticos (Dieker y Opitz, 1969).

Por otro lado, existen síndromes en donde los riñones y los genitales se encuentran afectados. En el síndrome de Denys-Drash en humanos, los pacientes sufren de nefropatía, y ya sea

anormalidades en la formación de los genitales y/o tumores de Wilms' (nefroblastomas). La nefropatía resulta de anormalidades en los glomérulos, esencialmente esclerosis del mesangio. Las anormalidades en los genitales varían, desde genitales externos ambiguos, hasta genitales internos mosaicos/displásticos. En estos pacientes se ha encontrado que el gen de Tumor de Wilms' posee mutaciones puntuales (Little et al, 1992).

Existe otro síndrome en donde el gen del Tumor de Wilms' también se encuentra afectado. Este es el síndrome de WARG (predisposición a Wilms' Tumor, Aniridia, Retardo Mental, y anormalidades en los Genitales). En este caso existen deleciones constitutivas en solo una copia del cromosoma donde el gen WT1 se localiza (Park et al, 1993). Los pacientes con WAGR sufren de anormalidades en el desarrollo del iris del ojo (aniridia), además de anormalidades en los genitales que incluyen hipospadias, criptorquidismo y pseudohermafroditismo (Pelletier et al, 1991a).

Los riñones, las gonadas, y las extremidades también mantienen una interacción entre mesénquima-epitelio, incluyendo el proceso de inducción, el cual resulta en la transdiferenciación de un tipo celular a otro, como es el caso del riñón en donde el blastema mesenquimal es inducido por el primordio del uréter para formar tejido epitelial. Este tipo de transformación de mesénquima mesodérmico a tejido epitelial, también se ha sugerido en los



estadios tempranos de las gónadas (Merchant y Taketo, 1991).

Por otro lado, en las extremidades existe una relación íntima entre las células epiteliales inducidas por el mesénquima, y las células mesenquimales. En respuesta, las células epiteliales mandan señales inductivas a las células mesenquimales, que responden con el crecimiento y formación correcta del patrón próximo-distal de la extremidad (Saunders et al, 1957).

Estos tres tejidos comparten no solo un origen común, pero también, quizá, mantienen mecanismos parecidos para diferenciarse y desarrollarse en órganos funcionales.

#### B. GENES QUE JUEGAN UN PAPEL DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA UROGENITAL

Existen varios genes que se expresan durante la formación del sistema urogenital, incluyendo: Syndecan, Pax-2, Pax-8, c-ret, Wnt-4, Formina, SF-1 (Steroidogenic Factor-1), SRY (Sex-determining region Y), SOX-9 (miembro de la familia de SRY), MIS (Müllerian Inhibiting Substance), y WT1 (Wilms' Tumor). Por ejemplo, durante la formación del riñón se expresan syndecan, Pax-2, Pax-8, c-ret, Wnt-4 y formina, mientras que SF-1, SRY y MIS se expresan durante la formación de los órganos sexuales. SOX-9 y WT1, por el otro lado, se expresan durante la formación de ambos y representan un

punto molecular entre estos dos órganos (Maas, et al, 1994; Dressler, 1995; Ryner & Swain, 1995; Kent et al, 1996).

Pax-2 es un regulador transcripcional que contiene una caja "paired" y que se expresa durante el desarrollo del pronefros, mesonefros y metanefros en los dos compartimientos del riñón: en los ductos y en el mesénquima, que son derivados del mesoderma intermedio (Dressler et al., 1990). En estudios en donde se generaron mutantes nulos de Pax-2 en ratón, se demostró que Pax-2 es esencial para la diferenciación de los componentes de los ductos y del mesénquima del mesonefros (Torres et al, 1995). Los mutantes homocigotos nacen sin uréter, riñones y tracto genital. Las hembras no tienen oviductos, útero y vagina, y los machos carecen de ductuli eferentes, epididimis, vas deferens y vesícula seminal, Los homocigotos no tienen gónadas, sino solo residuos del primordio genital; los heterocigotos solo sufren de defectos en los riñones.

Estudios *in vitro*, con oligonucleótidos antisentido específicos para Pax-2, sugieren que este gen es esencial para la transformación epitelial, durante la formación de los túbulos metanéfricos (Rothenpieler y Dressler, 1993). Al madurar, los túbulos epiteliales muestran una reducción en la expresión de Pax-2, y es aquí donde los niveles de WT1 incrementan. Estos datos, acompañados con el hecho de que WT1 puede represar el gen de Pax-2, y que Pax-2 se encuentra expresado altamente en tumores de

Wilms' (Dressler y Douglas, 1992), muestran que WT1 es un regulador negativo de Pax-2.

Pax-8 es otro regulador transcripcional que también se expresa en el mesénquima inducido y condensado y en los componentes epiteliales que se derivan de esta inducción (Plachov et al, 1990; Poleev et al, 1992).

C-ret, un receptor de tipo proteína cinasa, se requiere para el crecimiento y ramificación del uréter. Este gen se expresa en el ducto Wolffiano y en la punta del primordio del uréter. Ratones nulos para el gen de c-ret, mueren por falta de desarrollo de los riñones (Shuchardt et al, 1994).

Wnt-4, que es un factor secretado, se requiere para la formación de los túbulos del metanefros. Este gen se expresa en el mesénquima del riñón condensado, después del proceso inicial de inducción, y continua hasta el estadio de formas S, a partir del cual su expresión disminuye. Ratones mutantes sin Wnt-4 no forman agregados pretubulares, sin embargo el uréter sí se ramifica, lo cual sugiere que este factor no es necesario durante los primeros eventos inductivos, pues el mesénquima se condensa y el uréter se bifurca (Stark et al, 1994).

El gen de Formina, que codifica a una proteína nuclear, es requerido para la formación del metanefros, pues en mutantes ld/ld se observa formación tardía y hasta falta de formación del

primordio uterino, el cual es el inductor del mesénquima metanéfrico, resultando en agénesis renal (Maas *et al*, 1994).

SF-1 es un factor que regula enzimas esteroidogénicas en las gónadas y en la corteza suprarrenal, pero su carencia en ratones causa la ausencia de gonadas y de glándulas suprarrenales. También se ha demostrado que la proteína de SF-1 puede interactuar con el gen de MIS y activar su transcripción (Ryner y Swain, 1995).

MIS, por otro lado, es producido por las células de Sertoli del testículo, y es responsable de la regresión de los ductos Mülllerianos (Behringer *et al*, 1990). Este factor también se regula por SRY, que es el gen determinante del testículo en mamíferos. SRY se expresa en las células somáticas de la gonada indiferenciada, y causa la diferenciación de esas células a células de Sertoli (Haqq *et al* 1994; Hacker *et al*, 1995). El gen de SRY contiene un dominio con una caja denominada HMG, que es responsable de la capacidad de SRY de regular otros genes. Mutaciones puntuales en esta región son suficientes para causar la reversión de sexo en humanos (Berta *et al*, 1990; Jager *et al*, 1990).

El gen SOX-9, que es un miembro de la familia de SRY, recientemente se ha implicado en la determinación del sexo. Esto lo sugiere su patrón de expresión en las gonadas masculinas y testículos adultos, y la presencia de mutaciones en pacientes con el síndrome de "campomelic displasia" (CD), quienes, además de

sufrir de anomalías en los elementos del esqueleto, sufren también de reverso sexual (Wagner et al, 1994). Este gen se expresa durante la formación de las gonadas masculinas, durante la formación de los riñones y durante el proceso de condrogénesis (Wright et al, 1995; Kent et al, 1996).

Es posible que exista una cascada de activación/represión de genes que incluyan reguladores transcripcionales (WT1, Pax-2, Pax-8, SF-1, SRY, SOX-9), proteínas secretadas (Wnt-4, MIS), e incluso receptores membranales (c-ret).

El gen del tumor de Wilms', (WT1), es esencial en la formación de los riñones y gónadas (Kriedberg et al, 1993), y se ha observado su expresión durante el desarrollo de las extremidades en ratón, gallina y cocodrilo (Kent et al, 1995; Hastie, comunicación personal; nuestras observaciones). Esto convierte al gen de WT1 en un buen candidato para el estudio de las relaciones evolutivas entre estos tres órganos.

#### C. GEN DEL TUMOR DE WILMS' (WT1)

##### 1) El gen WT1

El gen del Tumor de Wilms, (WT1), es un gen supresor de tumores que codifica una proteína nuclear con cuatro dominios tipo "zinc fingers", o dedos de zinc. La proteína de WT1 interactúa con

secuencias que contienen series de "G's". Estos motivos son muy parecidos a los que se encuentran en los factores de transcripción SP1, EGR1 (Early Growth Response Gene-1), y EGR2 (Early Growth Response Gene-2). Se ha observado que WT1 puede reprimir o activar la transcripción de genes reguladores del proceso de crecimiento, dependiendo de la arquitectura de la zona promotora del gen regulador o de las isoformas de WT1 seleccionados (Bickmore et al, 1992, Madden et al, 1993). La actividad represora está regulada por la región abundante en prolinas/ glutaminas de la zona N-terminal de la proteína (Madden et al, 1991). Algunos genes candidatos que son regulados por WT1 en ensayos de transfección in vitro incluyen "insulin-like growth factor 2" (IGF2), los receptores de "insulin-like growth factor 1 / 2" (IGF1/IGF2R), "platelet-derived growth factor cadena A (PDGFA), "colony stimulating factor 1 (CSF1) (Hastie, 1994) y "early growth response gene-1" (EGR-1). En estos ensayos se demostró que EGR-1 es regulado negativamente por WT1 (Madden et al, 1991). Estudios que corroboran la regulación negativa de EGR-1 por parte de WT1 incluyen estudios de hibridación *in situ* donde se ha observado que, en las zonas donde WT1 se expresa más intensamente durante el desarrollo del riñón permanente, el mensajero de EGR-1 se encuentra reducido (Rackley et al, 1995).

El mensajero de WT1 es un transcrito procesado

alternativamente, capaz de producir cuatro tipos diferentes de ARNm, que incluyen la inclusión/ exclusión del exón #5 (17 amino ácidos), y la inclusión/exclusión de 3 amino ácidos entre el dedo de zinc 3 y 4 (KTS). Se ha comprobado que las isoformas -KTS y +KTS reconocen diferentes secuencias en ADN, y que la isoforma -KTS tiene una afinidad más alta hacia el ADN (Rauscher et al, 1990; Drummond et al, 1994). La distribución de estos transcritos no parece estar regulada durante el proceso de desarrollo (Drummond et al, 1994). El procesamiento alternativo del transcrito solo se ha conservado parcialmente en algunas especies pues no existe la inserción del exón # 5 en especies, de animales no mamíferos (gallina y cocodrilo). Por otro lado, la inserción de la secuencia KTS localizada en el exón # 9 si se ha encontrado en todos los animales vertebrados examinados (humanos, ratón, rata, gallina, cocodrilo, Xenopus y pez zebra) (Kent et al, 1995).

Este gen también posee edición a nivel de ARN y, por lo tanto, se pueden producir hasta 8 isoformas diferentes de WT1 en mamíferos al combinar esta función con el procesamiento alternativo del transcrito. El nucleótido que se edita es el uracilo # 839 que se modifica en citosina, lo que resulta en el cambio de una leucina por una prolina. Esta edición se localiza en la zona transreguladora del gen, y se ha comprobado que este cambio reduce la capacidad represora del producto de WT1. Parece ser un requisito

el que exista una región conservada que flanquea la zona a editar (Sharma et al, 1994), por lo tanto es posible que esta edición no se encuentre conservada en reptiles y pájaros, pues el nucleótido blanco se encuentra al lado de una inserción de 6 nucleótidos que no se encuentran en los mamíferos estudiados (Kent et al, 1995). (Ver la Fig # 2 en la sección del anexo para estructura del gen WT1).

## 2) Expresión de WT1

Durante el desarrollo del embrión de ratón, la primera señal de expresión de WT1 se localiza en el útero materno en un estadio embrionario temprano (día 8.5; Rackley et al, 1993). Más tarde, en el día embrionario 9, se observa expresión de WT1 en el mesénquima intermedio, lateral a la cavidad celómica. Entre el día embrionario 9.5-10.5, WT1 se localiza en el mesotelio del corazón, de los intestinos, del timo, del hígado, del pulmón, de la vesícula, en el mesotelio que cubre los órganos de la cavidad abdominal, y en el mesenterio de los intestinos dorsales. Expresión de WT1 en tejidos con mesotelio también se ha observado en embriones humanos. La cresta urogenital también expresa WT1 (Pritchard-Jones et al, 1990; Armstrong et al, 1992; Rackley et al 1993).



La expresión de WT1 durante el desarrollo del sistema urogenital se ha confirmado en diferentes especies de vertebrados (Pritchard-Jones *et al*, 1990; Armstrong *et al*, 1992; Sharma *et al*, 1992; Rackley *et al* 1993; Kent *et al*, 1995). En los riñones de ratón y humano, WT1 se expresa muy tempranamente en pronefros y mesonefros (día embrionario 10.5 en ratón). Durante el desarrollo del metanefros, WT1 se expresa en niveles muy bajos en el mesénquima no inducido/ no condensado, y la expresión aumenta dramáticamente cuando el mesénquima se condensa. Esta expresión se mantiene en la región posterior del nefrón en desarrollo, y continúa aún en el nefrón maduro; el mensajero se localiza en las células epiteliales del glomérulo (células podocitas). El uréter y los ductos colectivos nunca muestran expresión de WT1 (Pritchard-Jones *et al*, 1990; Armstrong *et al*, 1992; Rackley *et al*, 1993).

Durante el desarrollo de las gónadas del ratón, WT1 se expresa muy temprano en la cresta genital, y más tarde se localiza en las células epiteliales de los cordones sexuales, tanto de machos como de hembras, al igual que en la túnica albugínea y en el rete testicular en del macho. En el feto de ratón macho, la expresión de la túnica albugínea desaparece, aunque la expresión en los cordones seminíferos y en el rete testicular continúa (Armstrong *et al*, 1992). Las células que expresan WT1 en los túbulos seminíferos del ratón y del humano son las células de Sertoli (Pelletier *et al*,

1991b; Armstrong *et al*, 1992; Rackley *et al*, 1992; Mundlos *et al*, 1993). En la hembra, WT1 se expresa en la zona basal del ovario que contiene células epiteliales. La expresión dentro de los folículos se localiza en las células granulosa, y esta expresión aumenta con la maduración de los folículos. También existe expresión en el útero embrionario y en el endometrio (Pelletier *et al* 1991b; Rackley *et al*, 1993). En ambos sexos, las células que expresan WT1 son las células nutridoras, que apoyan y dirigen la maduración y sobrevivencia de las células germinales.

Otros lugares de expresión durante el desarrollo del ratón incluyen la región cerebral del cuarto ventrículo, en donde la expresión de WT1 se limita al divertículo de la capa ependimal más cercana a la parte rostral de la médula oblongata (15dpc). Otra zona de expresión de WT1 se localiza en la médula espinal a partir del estadio 11dpc y esta se localiza entre la capa ependimal y el manto. La expresión continúa hasta el día embrionario 15, en donde la expresión se limita al cuerno ventral de la médula espinal, y este dominio de expresión se extiende en una dirección anterior-posterior hasta llegar al nivel de las extremidades traseras (Armstrong *et al*, 1992; Rackley *et al*, 1993). Otra zona de expresión de WT1 se observa durante el desarrollo de las extremidades en ratón (Hastie, comunicación personal), cocodrilo (Kent *et al*, 1995) y gallina (nuestras observaciones). También se

ha detectado ARNm de WT1 en el músculo de la pared abdominal, en la retina del ojo humano y en el ojo y lengua de ratón (día embrionario 12.5) (Armstrong et al, 1992; Rackley et al, 1993).

En tejidos adultos se ha detectado WT1 en los testículos, ovarios, riñones, corazón, vesícula, timo, pulmones, ojo y lengua (Buckler et al, 1991; Armstrong et al, 1992).

WT1 también se expresa en tumores de Wilms' en estructuras tubulares y en células blastema pero no en regiones con células de estroma, lo que equivale a tipos celulares que normalmente expresan WT1 durante el desarrollo normal del riñón (Pritchard-Jones et al, 1990).

Tomando en cuenta las diferentes regiones de expresión de WT1 durante el desarrollo de un embrión, estas se pueden clasificar en dos grupos de tejidos. Uno incluye a los tejidos que se derivan del mesoderma y que pasan por una transición de mesénquima a epitelio como lo son los riñones, las gónadas, la lengua, y el mesotelio de los diferentes órganos (como el del corazón, el de los pulmones, el de los intestinos, el del hígado, etc.), o los tejidos que requieren interacciones mesénquima-epitelio para su proceso de diferenciación como es en el caso de las extremidades. El otro grupo incluye a tejidos de origen ectoderma como lo son la médula espinal, el cerebro y parte del ojo.

### 3) Presencia del producto del gen WT1

Estudios hechos por Mundlos et al (1993) utilizando microscopia confocal han mostrado la localización nuclear de WT1 en los distintos tipos celulares. Por ejemplo, en el mesonefros, la proteína se localiza en las células podocitas del glomérulo. En el metanefros, la proteína de WT1 se detecta en el cuerpo "S", el cuerpo "U" y finalmente en el periferio de los glomérulos, en las células podocitas. La proteína de WT1 se ha detectado en riñones de humano adulto, aunque el mensajero no se pudo detectar vía hibridación *in situ* (Mundlos et al, 1993; Rackley et al, 1993).

En los testículos en proceso de desarrollo, se observó producto de WT1 en las células de Sertoli de los túbulos seminíferos y en el rete testicular. Durante el desarrollo de los ovarios de humanos, se ha detectado la proteína de WT1 en estadios embrionarios, en células epiteliales del cortex, pero no en la médula, y en recién nacidos en las células granulosas que rodean a los ovocitos (Mundlos et al, 1993).

En Tumores de Wilms', la proteína se detecta en células de blastema y en estructuras circulares que se parecen a glomérulos. No se observa proteína en el estroma o en estructuras tubulares (Mundlos et al, 1993).

También se ha confirmado la presencia del producto de WT1 en

la columna vertebral (Rackley et al 1993).

#### 4) Tumores de Wilms' y síndromes asociados

En algunos pacientes con Tumores de Wilms' (tumores en los riñones o nefroblastomas), este gen se encuentra afectado, ya sea con una delección en el cromosoma 11p13, o por mutaciones puntuales en la zona de los dedos de zinc. La enfermedad del tumor de Wilms' es una condición que se manifiesta muy tempranamente durante el desarrollo del riñón, y en los casos donde el gen de WT1 es responsable de esta condición, es necesario la inactivación de las dos copias de este gen para la formación de tumores. En algunos casos se ha encontrado que la aparición o predisposición a tumores de Wilms' tiene cierto tipo de relación con la condición de aniridia (defectos en el desarrollo del iris del ojo), con anormalidades de los órganos genitales, y con retardo mental. Esto en conjunto se conoce como el síndrome de WAGR (Wilms', Aniridia, Genitourinary Malformations, Mental Retardation). Los pacientes con WAGR heredan delecciones de uno de sus padres y mantienen el otro cromosoma 11 normal. Por esto, estos pacientes tienen predisposición a formar tumores en los riñones (Francke et al, 1979). Solo el 1-2% de los casos que desarrollan nefroblastomas con WAGR se han atribuido a delecciones homocigotas en WT1. Por otro

lado, el 2% de casos con tumores de Wilms se asocian con el Síndrome de Denys-Drash, en donde se han encontrado mutaciones puntuales en WT1.

En el síndrome de Denys-Drash, los pacientes tienen predisposición a formar tumores de Wilms', pero también sufren de anomalías en las gónadas incluyendo: "streak gónadas" (meséquia no diferenciado), machos genéticos XY que pueden tener genitalia interna y/o externa femenina, o pseudohermafroditismo. Estos pacientes también sufren de nefropatía glomerular, en donde las células del mesangio que contactan las arterias del glomérulo, depositan material fibrótico, causando que estas arterias se colapsen y causen hipertensión. También se han encontrado, que las células podocitos del glomérulo que expresan WT1, no se desarrollan completamente (Jadresic et al, 1990).

Se ha clasificado a WT1 como el agente causa del síndrome de Denys-Drash. La mayoría de las mutaciones puntuales en el síndrome de Denys-Drash están en la región de los dedos de zinc, o si bien causan una mutación "nonsense", en la que la proteína de WT1 se produce sin los últimos 2-3 dedos de zinc. Ambas mutaciones afectan la región de interacción con el ADN, que normalmente regula a otros genes. Como solo un alelo se encuentra afectado (dando como resultado la variación de condiciones en el riñon y en los organos sexuales mencionados), se propone que WT1 actúa en una forma

dominante-negativa en donde la proteína mutante y la normal se dimerizan, y se pierde su capacidad de regular genes blanco (Pelletier et al, 1991). Por otro lado, para la formación de tumores es necesario que la segunda copia de WT1 también se encuentre afectada. Algo interesante de notar es que pacientes con el síndrome Denys-Drash con las mismas mutaciones puntuales, muestran una variabilidad en la penetración de la mutación. Se piensa que esto se debe a la constitución genética de cada individuo, o quizá al estadio en que se manifiesta la mutación durante el desarrollo (Coopes et al, 1992).

El otro 5-7% de los casos con tumores de Wilms' no se asocia con ningún síndrome, pero tienen algún tipo de predisposición heredable, aunque solo la mitad de los casos se asocian con alguna mutación en WT1. Por lo tanto, solo 15% de los casos con tumores de Wilms' han sido contribuídos por mutaciones en WT1 (Hastie, 1994).

Se han detectado mutaciones del gen WT1 en tumores presentes en tejidos donde WT1 se expresa normalmente, e incluyen gonadoblastomas en niños con WARG, y tumores en las células granulosas del ovario en niñas con el síndrome de " Denys-Drash" (Pelletier et al, 1991a; Hastie, 1994). Los mesoteliomas también han sido atribuídos a mutaciones en WT1 (Park et al, 1993b).

##### 5) Modelo animal para el estudio de WT1

Se ha creado un ratón, vía disrupción génica por recombinación homóloga, que tiene el primer exón del gen WT1 suprimido, causando inactivación de este gen. El resultado es una mutación nula, en la que los homocigotos mueren a la mitad de su período de gestación. Estos animales se desarrollan sin riñones y gónadas, pero mueren por edema, como resultado del daño causado al corazón a consecuencia de problemas en la formación del mesotelio que normalmente lo rodea. El mesonefros sí se forma en estos mutantes, aunque sufre una reducción de 2-3 veces en la cantidad de túbulos mesonéfricos. Durante la formación del riñón permanente, el blastema metanéfrico se forma, pero nunca se diferencia, y pasa por el proceso de apoptosis. El primordio del uréter, en ausencia de señales inductivas del blastema, se degenera y falla la formación completa del riñón (Kriedberg et al, 1993).

Durante el desarrollo normal del ratón, en el día embrionario 11, las primeras señales de formación de la gónada son aparentes, al ocurrir un engrosamiento del epitelio en la zona celómica de la cresta urogenital. En el mutante mencionado se observa una reducción de este engrosamiento, y el desarrollo subsecuente de la gónada es abortada, mientras que la formación y migración de células germinales no se compromete (Kriedberg et al, 1993).



Otros órganos afectados son el corazón, el diafragma, en donde las cavidades del tórax y del abdomen no se encuentran completamente separadas, y en los pulmones. Todos estos órganos poseen mesotelio, que parece ser uno de los tejidos blanco de esta mutación, donde el gen de WT1 juega un papel importante en la formación o mantenimiento del mesotelio. Es importante mencionar que el gen de WT1 se encuentra expresado en todos los tejidos afectados. Los heterocigotos tienen apariencia normal y nunca forman nefroblastomas (Kriedberg et al, 1993).

#### D. MODELOS PARA EL ESTUDIO DE EXPRESION DE WT1 EN EL AJOLOTE

##### 1) Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso por el cual las células germinales masculinas maduran para producir espermatozoides viables. En los mamíferos ocurre dentro de los túbulos seminíferos del testículo. Las células germinales en contacto directo con sus células nutridoras, las células de Sertoli, se desarrollan pasando por un proceso continuo de mitosis, después del cual entran a un ciclo meiótico en donde se convierten en células haploides, que entran al proceso de espermiogénesis, en el que las células se preparan y equipan para convertirse en espermatozoides maduros

(Sharpe, 1994).

Las células germinales de mamíferos, se dividen por mitosis y se diferencian en distintos estadios de espermatogonia, que entran al ciclo meiótico en donde se convierten en espermátocitos. Después de la segunda división meiótica, estos se convierten en espermátidas haploides, que eventualmente se convierten en espermatozoides. Hay interacciones celulares y hormonales esenciales para que este proceso de maduración ocurra. Las células somáticas que se encuentran dentro del testículo, incluyendo las células de Sertoli y de Leydig, juegan un papel muy importante en el mantenimiento, sobrevivencia y maduración de las células germinales.

Es a través de las células de Sertoli que la hormona estimuladora de folículos (FSH) trasmite sus efectos a las células germinales. Las células de Sertoli mantienen contacto directo con las células germinales a través de " gap junctions ", y es a través de estos contactos que las células de Sertoli regulan la mayor parte del proceso de desarrollo de las células germinales (Sharpe, 1994). Las células de Leydig también afectan el desarrollo de las células germinales, pues son estas las células que producen la hormona testosterona que actúa sobre el desarrollo del espermatozoide (Sharpe, 1994).

En el mamífero, la regulación directa que una célula de

Sertoli ejerce sobre una célula germinal en particular y viceversa es difícil de establecer, pues dentro de los túbulos seminíferos, una célula de Sertoli se encuentra asociada con más de una célula germinal, y esta puede encontrarse en cualquier estadio de su desarrollo (Grier, 1993; Sharpe, 1994). En los anfibios urodelos, la estructura y organización del testículo es única, pues el testículo esta compuesto de cistos (unidades conteniendo células de Sertoli y células germinales masculinas rodeado por una membrana) que están dentro de lóbulos, los cuales equivalen a los túbulos seminíferos en un mamífero (fig# 3). Cada lóbulo esta conectado a ductos eferentes que eventualmente encuentran a un ducto colectivo más grande, el cual se conecta con el vas efferentia. Dentro de cada cisto se encuentra solo un tipo de células germinales, o sea solo un estadio de maduración y por lo tanto cada célula de Sertoli que se encuentre en el cisto estará asociada unicamente con un solo estadio de célula germinal (Lazard, 1974, 1979; Lofts, 1984). Este sistema brinda la oportunidad de estudiar el papel de las células de Sertoli en cada paso de maduración.

En el testículo del ajolote *Amblystoma mexicanum* se han descrito 5 zonas diferentes: 1) Una zona de división mitótica (espermatogonia); 2) una zona de división meiótica (espermatocitos); 3) una zona con espermátidas; 4) una zona con espermatozoides y 5) una zona glandular, en donde las células

intersticiales (Leydig) se encuentran alrededor de nidos de células germinales y células de Sertoli. Más tarde las células agrupadas en esta zona dan lugar a nuevos cistos. En general, esta regionalización tiene una distribución céfalo-caudal (fig # 3), en donde las células menos maduras se encuentran en la región cefálica, mientras que zonas en donde se encuentran células más maduras se localizan en la región caudal (Lazard, 1974, 1979; Lofts, 1984).

Las espermatogonia primarias representan las células germinales más grandes, con un núcleo grande y de forma irregular (fig 2B,D/Dev Dyn). Estas células se dividen mitóticamente produciendo espermatogonia secundaria, las cuales se mantienen en contacto entre sí, dado que las células de Sertoli que las rodean, producen una membrana alrededor del cisto. Los cistos que contienen espermatogonias entran en divisiones meióticas en una forma sincronizada, dando lugar a los espermatocitos. Más tarde, estas células entran al proceso de espermiogénesis, en el que células germinales se elongan y se agrupan produciendo espermatidas, que eventualmente darán lugar al espermatozoide viable. Los espermatozoides finalmente entran al proceso de espermiación, en donde son desalojados del lumen del lóbulo a los ductos eferentes (Lofts, 1984).

Por otro lado, existen células que se localizan alrededor de

los lóbulos que se conocen como "lobule boundary cell". En las zonas conteniendo espermatogonia o espermatocitos primarios, las células que se encuentran alrededor de los lóbulos tienen características parecidas a las células fibroblásticas (fig # 3), tanto en morfología como en contenido de organelos incluyendo abundantes cantidades de retículo endoplásmico rugoso, y mitocondrias con crestas laminares abarcando la mayoría del citoplasma; además estas células no contienen lípidos, ni colesterol. Estas células se separan de los cistos germinales por una membrana basal y una capa de colágena. Cuando los cistos maduran, estas células se vuelven hipertróficas (fig 5F/Dev Dyn), y esteroidogénicas pues contienen grandes cantidades de retículo endoplásmico liso y mitocondrias con crestas tubulares y además estas células son capaces de producir 3 $\beta$ -ol-hidroxiesteroide deshidrogenasa (Lofts, 1974; Tso y Lofts, 1977). Después de la espermiación, los lóbulos vacíos se convierten en tejido glandular en donde las células " Ledyig/ lobule boundary cells " se encuentran llenas de vacuolas con lípidos (Lofts 1984; Grier, 1993).

Las células de Sertoli, que rodean a las células germinales en la mayoría de los anuros y urodelos, tienen características de células epiteliales cuando constituyen la pared germinal de los cistos de espermatogonia y de espermatocitos primarios (fig

2B,D/Dev Dyn). Estas células tienen poco citoplasma, un núcleo ovalado, y contienen pocas mitocondrias y un retículo endoplásmico poco desarrollado. Sin embargo, a partir de los siguientes períodos de meiosis y maduración, estas células comienzan a hipertrofiarse y el núcleo se vuelve más redondo (fig 3D/Dev Dyn); también el retículo endoplásmico se desarrolla bien y consiste principalmente de retículo liso, igualmente el número de mitocondrias aumenta. La barrera de células de Sertoli (barrera sangre-testículo) que consiste en la formación de "tight junctions" entre las células, se empieza a formar en los urodelos a partir de los estadios de meiosis (Franchi et al, 1982; Bergmann et al, 1983). En mamíferos, esta barrera se forma cuando las células germinales entran a meiosis y migran de la lámina basal del túbulo al lumen (Grier, 1993). En urodelos, cuando comienza la espermiación, las células de Sertoli se vuelven altamente lipoides (Lofts, 1984), y más tarde tienen la capacidad de fagocitar a las células germinales en proceso de degeneración o a los cuerpos residuales. Las células de Sertoli pueden tener dos destinos: estas pueden desalojarse con los espermatozoides y degenerarse, o pueden transformarse en células epiteliales de los ductos eferentes, como ocurre en el pez Poeciliidae (Billard, 1969; Padney, 1969; van de Hurk et al, 1974; Grier, 1980, 1981).

El que en el testículo de este urodelo se pueda establecer una

relación directa entre las células de Sertoli y estadios específicos de maduración de las células germinales, lo hace un modelo particularmente útil, que permite el estudiar la comunicación entre estas células y las células germinales, que eventualmente responden madurando hasta terminar diferenciándose como espermatozoides. El gen del tumor de Wilms' parece ser un buen candidato en este contexto pues se encuentra expresado en las células de Sertoli en otras especies, y se ha demostrado que su expresión es esencial para la formación de las gónadas en el ratón (Kriedberg, 1993).

## 2) Nefrogénesis

El sistema néfrico de la mayoría de los animales vertebrados se desarrolla mediante la aparición sucesiva, tanto en el tiempo como en el espacio, de tres diferentes formas de riñón: los pronefros, los mesonefros y los metanefros (fig# 1).

Los pronefros forman parte del primer riñón, que se forma a partir de la parte más anterior del mesoderma intermedio. Este tipo de riñón es funcional en algunas especies de peces y en la forma larval de anfibios. En anfibios, la zona pronéfrica se determina en el estadio medio de neurula, y se localiza bajo los somitos 4, 5 (Pasteels, 1942; Saxen, 1987). El ducto pronéfrico se forma bajo el primordio pronéfrico en la zona de los somitos 5 a 7 (O'Connor,

1938). En la zona más anterior del ducto, las células mesénquimatosas en su proximidad se diferencian en unidades pronéfricas. Mientras tanto, el ducto pronéfrico se extiende posteriormente hasta conectarse con la cloaca. Este ducto, conocido como el ducto Wolffiano (ducto opistonéfrico en anfibios y peces), eventualmente pasa a ser la base de la formación de los otros dos tipos de riñones (Saxen, 1987).

Los productos de desecho se filtran a través de un estrecho vascular llamado glomus; este producto filtrado pasa por los túbulos al ducto pronéfrico y finalmente a la cloaca (Saxen, 1987).

Mientras que la formación de túbulos néfricos continúa en una dirección posterior, los túbulos más anteriores comienzan a degenerarse en la mayoría de las especies de animales (Saxen, 1987). En la zona media del ducto Wolffiano, las unidades mesonéfricas se forman a través de la inducción entre el epitelio del ducto y las células mesénquimatosas que se encuentran alrededor de este. La zona de iniciación del mesonefros en anfibios corresponde al estadio tardío de neurula, pero no es hasta el estadio de "tail- bud" en el que el ducto pronéfrico hace contacto con esta zona y se determina definitivamente (Humphrey, 1928).

El nefrón mesonéfrico se inicia cuando el mesénquima se condensa, y eventualmente forma cistos renales y cuerpos "S" al recibir señales inductivas del ducto Wolffiano (O'Connor, 1939;



Nieuwkoop, 1948; Fox, 1963). Más tarde, esta unidad néfrica se une al ducto Wolffiano, y consiste en túbulos y cápsulas que contienen una masa de capilares llamados glomérulos. La membrana basal del glomérulo esta dividida en componentes endoteliales y epiteliales, y es parecida a la membrana basal que se encuentra en la forma embriónica del glomérulo del metanefros (Tiedemann y Egerer, 1984; Saxen, 1987) (fig# 4). También se forman ductos colectivos derivados del ducto Wolffiano pero inducidos por el nefrón en proceso de desarrollo.

El material de desecho que se filtra a través del glomérulo, pasa por túbulos mesonéfricos en donde se reabsorben algunos iones, y eventualmente entra al ducto Wolffiano para ser descartado vía la cloaca. En mamíferos, reptiles y pájaros estas unidades mesonéfricas se degeneran, y al mismo tiempo comienza la formación del riñón permanente en la zona más caudal del animal. Este riñón permanente o metanefros consiste en un sistema de ductos colectivos que se derivan del ducto Wolffiano, a través de un mecanismo de crecimiento de este mismo ducto, iniciado en la zona más posterior cerca de la unión con la cloaca formando el futuro uréter, y en la formación de los túbulos néfricos. Estos túbulos se forman cuando el primordio del uréter llega a estar en contacto con el mesénquima nefrogénico en proximidad, el cual se condensa y forma el blastema nefrogénico. Inducciones recíprocas entre el uréter y el blastema

nefrogénico eventualmente darán lugar a los túbulos renales con sus respectivos glomérulos. (Saxen, 1987).

Existen tres niveles temporales en el riñón metanéfrico que son susceptibles a cambios/mutaciones. El primer nivel ocurre antes del proceso inductivo, en donde las células responden entrando a apoptosis, como ocurre en los ratones en donde se inactiva el gen de WT1 (Kriedberg et al, 1993). El segundo nivel es cuando el mesénquima ya ha sido inducido y, por lo tanto, una mutación resultaría en la formación de tumores, como en el caso de la enfermedad de Tumores de Wilms'. Finalmente la mutación puede ocurrir durante la formación del nefrón, en donde los eventos pueden interrumpir la formación propia de las unidades néfricas (Hastie, 1994) (fig# 5). Existe un mutante en el ajolote que se desarrolla con anomalías en los riñones. El mutante muestra reducción de glomérulos, quistes y en algunos casos malformación del glomérulo (Washabaugh et al, 1993; nuestras observaciones). Aunque estos anfibios no poseen riñones metanéfricos, es posible que exista un paralelo a la malformación del glomérulo durante la formación del mesonefros que pueda ser un resultado de la mutación en "Short toes".

### 3) Ajolote mutante "Short toes"

En 1967, Humphrey reportó al ajolote mutante "Short toes" (s), describiendo los defectos del esqueleto en las extremidades, y las anormalidades en el desarrollo del sistema urogenital (Humphrey, 1967). Estudios recientes muestran que los órganos afectados en una camada de ajolotes "s" muestran un gradiente de severidad en los defectos en todos los órganos afectados. Los mutantes con más defectos en el desarrollo de las extremidades, también muestran el mismo patrón de severidad en los riñones y ductos Mülerianos/Wolffianos. Este hecho también coincide con la mortalidad de estos ajolotes donde los más afectados mueren primero (Washabaugh et al, 1993).

Esta mutación induce una reducción en el tamaño de las extremidades de estos animales, siendo los dedos las estructuras más afectadas, al mostrar una reducción en el número de falanges. También existen anormalidades en los carpos/tarsos y metacarpos/metatarsos, y hay una reducción de tamaño en los huesos mayores de las extremidades (Humphrey, 1967; Del Rio-Tsonis et al, 1992; Washabaugh et al, 1993).

El mal funcionamiento renal es evidente por el edema que aparece en estos animales a punto de morir. Los riñones son de tamaño más pequeño al de los animales silvestres. Estudios histológicos de los riñones en los mutantes muestran una organización anormal de los glomérulos y de los túbulos nefróticos;

principalmente se observan cistos en sitios donde los glomérulos deberían de existir. Se evidencia también un patrón de variabilidad en la manifestación del factor "s", en donde los ajolotes menos afectados poseen riñones con varias unidades de glomérulos funcionales. En estos animales también se observa una desorganización de los túbulos y de los ductos en relación con los glomérulos. El ajolote más afectado muestra muy pocas unidades funcionales de glomérulos y un número elevado de cistos (Washabaugh et al, 1993).

En los ajolotes mutantes, los ductos ya sean de machos (ductos Wolffianos) o de hembras (ductos Mülerianos), presentan defectos con variaciones de severidad; desde la falta de ductos, a la reducción de tamaño de estos, mostrando un deterioro en las células columnares y una compactación de las áreas vasculares. Los ovarios y los testículos de los mutantes nunca completan su estadio de maduración. Se observaron también defectos en los ovarios de los mutantes, específicamente se detectaron cistos dentro de la mayoría de los ovocitos (Washabaugh et al, 1993), sin embargo los testículos de estos animales parecen normales.

**¿ Cual es la relevancia de WT1 en el ajolote mutante "Short toes"?**

Existen similitudes entre las manifestaciones del mutante

"Short toes" con las manifestaciones de pacientes con Tumores de Wilms. Además, los patrones de expresión del gen WT1 coinciden con los patrones de las manifestaciones en los mutantes de "s" (sistema urogenital y extremidades). Por lo tanto es de interés estudiar la participación que WT1 pudiera tener en este ajolote mutante.

#### E. REGENERACION DE EXTREMIDADES EN URODELOS

Los anfibios son los únicos vertebrados que poseen la capacidad de regenerar sus extremidades al ser amputadas (Thorton, 1968; Wallace 1981; Tsonis, 1996). Algunos urodelos pueden regenerar sus extremidades durante su vida adulta. Entre estos se encuentran las familias Salamandriade (ie. *Noptthalmus viridecens*) y Ambystomatidae (ie. *Amblystoma mexicanum* = ajolote) (Scadding, 1977, 1980).

La mayoría de los anuros también pueden regenerar sus extremidades durante su vida joven, pero pierden esta capacidad después de su transición a metamorfosis (Scadding, 1980).

Los eventos involucrados durante el proceso regenerativo incluyen la curación de la herida, la formación de un cono de células mesenquimales, y la subsecuente diferenciación de estas células que reconstruirán los tejidos ausentes. Al amputarse las extremidades de estos animales a cualquier nivel del eje próximo-

distal, se observa una migración casi inmediata de células epiteliales que cubren la herida, formando una capa epidérmica. Esta capa epidérmica es esencial para que el proceso regenerativo ocurra, ya que si se interrumpe la interacción entre la epidermis y el mesénquima, el proceso regenerativo no continúa (Thorton, 1957).

Hay y Fishman observaron, a través de estudios de incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina que tres días después de la amputación, las células progenitoras del tejido regenerativo aparecen bajo la capa epidérmica. Los tejidos en el plano de amputación tales como músculo, cartílago, dermis y tejido nervioso pierden su morfología de origen, y producen una población de células de mesénquima llamadas blastema. La clave para la formación del blastema es la desdiferenciación de tejidos diferenciados terminalmente. El mecanismo de desdiferenciación no se conoce, sin embargo el proceso en sí se ha demostrado usando técnicas histológicas y radioactivas (Hay, 1959; Hay y Fishman, 1961), y con estudios utilizando marcadores celulares y moleculares (Wallace et al, 1974; Casimir et al 1988; Lo et al, 1993). La presencia de células de reserva sugerida por Cameron et al no puede ser descartada, pues estas células sí existen por lo menos en el tejido muscular, pero su participación en el proceso regenerativo no ha sido comprobada (Cameron et al, 1986).

Las células del blastema se dividen bajo la influencia del sistema nervioso por 2-3 semanas. Más tarde se rediferencianse y dan lugar a los diferentes tejidos que constituyen la extremidad (Singer, 1952). Es imperativo mencionar que la regeneración de las partes amputadas no ocurriría sin la dirección hormonal o de factores neurotróficos y que, al remover la glándula pituitaria ó al desnervar las extremidades se inhibe este proceso regenerativo (Singer, 1952; Liversage et al 1985). El proceso regenerativo tiene una duración de 6-8 semanas, dependiendo de la especie de urodelo, su edad, estadio de desarrollo y tamaño (Wallace 1974; Scadding, 1977; Tsonis, 1996).

Recientemente se ha descubrió un modelo que puede facilitar el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que dictan este proceso regenerativo. Este modelo hace uso de la incapacidad de regeneración de las extremidades del ajolote mutante "Short toes". Aunque "s" produce un cono regenerativo formado de células de mesénquima (blastema), el proceso regenerativo se interrumpe en este estadio y no aparecen señales de diferenciación. Las características más prominentes en "s" son la formación anormal de la membrana basal, que es exageradamente gruesa y ondulada, y la aparición en exceso de material extracelular en el blastema. Parece que la interacción entre el mesénquima-epitelio se ha interrumpido, parando el futuro proceso de diferenciación (Del Rio-

Tsonis et al, 1992).

Se ha involucrado a WT1 en una variedad de procesos inductivos que incluyen interacciones entre los tejidos mesénquima-epitelio (Hastie et al, 1994). El estudio de la expresión de WT1 en el ajolote mutante "Short toes", tanto en los riñones, como durante el proceso de regeneración de sus extremidades, quizá pueda aportar información importante sobre la posible participación de este gen tanto en esta mutación en particular, como en el proceso regenerativo en general.

## II. OBJETIVOS

Inicialmente este estudio se concentró en la caracterización del ajolote mutante "Short toes" y la posible participación de WT1 en este mutante, al igual que la participación de WT1 durante el proceso del desarrollo y regeneración de los miembros en el ajolote silvestre y mutante; sin embargo, al proseguir con el proyecto el enfoque principal cambió dado a las observaciones que se obtuvieron durante el estudio de la expresión de WT1 en el testículo del ajolote. La estrategia que se siguió para determinar el papel de WT1 en el fenotipo "s", durante el proceso de desarrollo y regeneración de los miembros, y durante el proceso de espermatogenesis en el ajolote silvestre, fué el de determinar el patrón de expresión de este gen.



A) GENERALES

1) Determinar la contribución del gen WT1 en el fenotipo del sistema urogenital y miembros del mutante "Short toes" del ajolote *Amblystoma mexicanum*.

2) Determinar el papel que juega WT1 durante el proceso de desarrollo y regeneración de los miembros en el ajolote *Amblystoma mexicanum*.

3) Determinar el papel que juega WT1 en el proceso de espermatogenesis del ajolote *Amblystoma mexicanum*.

B) ESPECIFICOS

1) Determinar el patrón de expresión de WT1 en los riñones del ajolote silvestre al igual que en los del mutante "Short toes".

2) Determinar el patrón de expresión del gen WT1 en los ovarios y testículos del ajolote silvestre al igual que en los del mutante "Short toes".

3) Determinar el patrón de expresión de WT1 durante el proceso de regeneración de los miembros del ajolote silvestre y mutante, al igual que en el desarrollo de las extremidades del ajolote silvestre.

### III. RESULTADOS

#### A) EXPRESION DE WT1 DURANTE EL PROCESO DE ESPERMATOGENESIS EN EL AJOLOTE

##### 1) Expresion del mensajero de WT1

Detectamos la presencia del ARNm de WT1 en tejidos de testículo de ajolotes silvestres por medio de RT-PCR (no mostrado). La organización única del testículo en *Amblystoma mexicanum* ha aportado un modelo para discernir la relación célula germinal-célula de Sertoli. Aprovechando la regionalización de las células germinales dependiendo de su estadio de maduración, se encontró, por medio de hibridación in situ y utilizando una sonda de WT de ajolote (AxWT1) generada vía RTPCR (Del Rio-Tsonis, 1996), que el gen del 'Tumor de Wilms' (WT1) se expresa únicamente en las células de Sertoli asociadas con espermatogonias. No se detectó expresión

del mensajero de WT1 en las células de Sertoli asociadas con espermatocitos, espermatidas o espermatozoides. Aún entre la población de las células de Sertoli asociadas con espermatogonia, solo los cistos de espermatogonias en las primeros ciclos de división mitótica expresan el mensajero de WT1 en la células de Sertoli. Parece que en los cistos con estadíos más avanzados de espermatogonia, los cuales han pasado por más divisiones mitóticas, o quizá cistos en los que las células germinales se están preparando para entrar al ciclo meiótico dejan de expresar el gen de WT1 en las células de Sertoli asociadas (fig # 2, Del Rio-Tsonis, 1996). Otro sitio de expresión fueron las células que forman los ductos eferentes en el testículo, y en los llamados cistos regenerativos, que estan compuestos de células de Sertoli que rodean a células germinales. Estos cistos regenerativos se observaron a través de las diferentes zonas del testículo (fig # 3, Del Rio-Tsonis, 1996). El patrón de expresión de WT1 en el mutante "Short toes" fué el mismo al del ajolote silvestre (no mostrado).

## 2) Presencia del producto de WT1

La proteína de WT1 se detectó por métodos inmunohistoquímicos utilizando un anticuerpo policlonal que reacciona con los últimos amino ácidos del producto humano de WT1 (Santa Cruz Biotechnology).

Este anticuerpo reconoce a WT1 de varias especies, incluyendo humanos, ratones y anfibios (Larsson et al, 1995; Del Rio-Tsonis et al, 1996).

El producto de WT1 también se detectó en células de Sertoli asociadas con estadios específicos de espermatogonia, localizadas en cistos con espermatogonia que solo han entrado a los primeros ciclos mitóticas. Esto confirma los resultados obtenidos de la expresión del mensajero de WT1 (fig # 4, Del Rio-Tsonis, 1996). Sorprendentemente la proteína se detectó no solo en células de Sertoli asociadas con espermatogonia, pero también en células de Sertoli asociadas con espermatocitos, espermatidas y espermatozoides (fig # 5, Del Rio-Tsonis, 1996).

La presencia de la proteína de WT1 también fué evidente en células que constituyen ciertos ductos y en las células de Sertoli de cistos regenerativos (fig # 5 B&F, Del Rio-Tsonis, 1996).

Se ha observado que las células de Sertoli en lóbulos con espermatocitos migran hacia las orillas de los cistos, delineando el periferio del lóbulo, y preparándose para el proceso de espermiación (fig # 6).

El patrón de expresión del producto de WT1 tampoco cambió entre el ajolote silvestre y el mutante "Short toes" (no mostrado).

B) EXPRESION DE WT1 EN LOS OVARIOS DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL

## AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES"

### 1) Mensajero de WT1

No pudimos detectar ARNm de WT1 por hibridación *in situ* en muestras de ajolotes silvestres ni mutantes. Sin embargo, al utilizar muestras de ARN de ovarios de ajolotes silvestres en reacciones de RT-PCR se logró amplificar el producto esperado de WT1 de 172 pares de bases, verificando que el gen de WT1 sí se expresa en este tejido (fig # 7).

### 2) Producto de WT1

No se logró detectar la proteína de WT1 en muestras de ovario de ajolote silvestre y mutante.

## C) EXPRESION DE WT1 EN LOS RIÑONES DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES"

### 1) Mensajero de WT1

Por hibridación *in situ*, utilizando la sonda AxWT1 (Del Rio-Tsonis, 1996), estudiamos el patrón de expresión de WT1 en el riñón

del ajolote silvestre y en el mutante "Short toes". Se detectó el mensajero de WT1 en los glómerulos de ambos (fig# 8). En la figura 8 A y B se observa ARNm de WT1 en los glómerulos del ajolote silvestre. En el ajolote silvestre los glómerulos son entidades compactas y contienen células (podocitas) que tiñen más oscuro que los otros tipos celulares presentes (fig # 8 C y D). Los glómerulos de los ajolotes "s" muestran expresión de WT1 de una manera más dispersa, dado a que los glómerulos de estos mutantes se encuentran dilatados (fig # 8 E-F). En un caso particular de "Short toes", donde se encontraban solamente células desorganizadas en lugar de la estructura del glomérulo, se detectó ARNm de WT1 (fig # 9 A y B; # 11). Estas células tienen la apariencia de células podocitas, en base a su patrón de tinción con Hematoxilina-Eosina y Gomoris' Trichome . Las células podocitas tiñen más oscuro que las células endoteliales presentes en el glomérulo (fig # 9 B y D; # 8 C,D,G,H).

## 2) Producto de WT1

El producto de WT1 se detectó también en los glomérulos de ambos ajolotes (fig# 10). En la figura 10 A, C, E, G se observan glómerulos de ajolotes silvestres con células podocitas expresando el producto de WT1. Igualmente WT1 se localizó en las células

podocitas del glómerulo del ajolote "s" (fig # 10 B,D, F, H). Los glómerulos de los ajolotes "s" se encuentran también dilatados. También se detectó el producto de WT1 en las células desorganizadas del ajolote mutante (fig # 11).

### **3) Clonación del gen de WT1 en el ajolote mutante "s"**

A través de la técnica de RT-PCR se amplificó y clonó un ADNc parcial del riñón de ajolote "s" con una penetración de fenotipo medio. El ADNc de WT1 aislado contiene parte de los dedos de Zinc, y es la región equivalente al ADNc que originalmente se aisló del riñón del ajolote silvestre (Del Rio-Tsonis, 1993; Del Rio-Tsonis, et al 1996). Esta región es susceptible a mutaciones puntuales y por eso era de interés corroborar si existía alguna mutación en el WT1 del ajolote "s". Se aislaron 5 clones, y estos se secuenciaron. No se encontró ninguna diferencia entre el WT1 silvestre y el WT1 del mutante "s".

### **D) EXPRESION DE WT1 EN LOS MIEMBROS DEL AJOLOTE EN PROCESO DE REGENERACION Y DESARROLLO.**

#### **1) Estudios de regeneración de extremidades**

Por inmunodetección se estudió la distribución de la proteína WT1 en las extremidades en proceso de regeneración en los ajolotes silvestres y mutantes. Se incluyeron miembros de ellos después de 3, 7, 14, 25 días post-amputación. En este caso las edades de los ajolotes variaron entre 3-8 meses de edad. Tres días post- amputación representa la formación de la capa epidérmica, 7 días representa un blastema medio, 14 días representa el inicio de la elongación del blastema, 25 días representa la formación de los dígitos en donde ya existen elementos de cartílago en la parte distal del miembro. No se detectó la proteína de WT1 en los estadios tempranos de regeneración (3,7,14), pero sí después de que los eventos de diferenciación han tomado lugar. Más específicamente, se observó WT1 en las regiones con elementos condrogénicos (falanges, muñecas, etc). Las células teñidas más intensamente se localizan en la parte exterior del cartílago, en el pericondrio y en las células condroblásticas (fig # 12). Los miembros del ajolote "s", no regeneran y solo forman un cono de células mesenquimales en los estadios más avanzados (25 días). No se observó la presencia de WT1 en estos miembros.

## 2) Miembros en proceso de desarrollo

Se ha analizado, por inmunodetección, la presencia de WT1 en



miembros en proceso de desarrollo en el ajolote silvestre. Inicialmente se estudiaron miembros delanteros y traseros en tres diferentes estadios de desarrollo temprano: un estadio temprano, donde solo se delinear los miembros; otro medio, donde se puede observar un cono recién formado; y finalmente un estadio tardío en donde se puede observar un cono alargado. No se detectó una señal nuclear específica en estos miembros. Se extendieron los estudios para examinar estadios más avanzados, y se incluyeron tres estadios tardíos: uno en donde el cono se había extendido en paleta; el siguiente en donde los dígitos se delinear; y el último en donde los dígitos son aparentes. Se observó que WT1 se localizaba solo en estadios más avanzados en las estructuras condrogénicas, en las células que delinear el cartílago (pericondrio), al igual que en las células condroblásticas (fig # 12). Para confirmar estos resultados, también se utilizaron varios estadios de miembros en proceso de desarrollo en la gallina. Estos estadios incluían miembros de días 26, 27 y 28, los cuales representan estadios en donde los dígitos se delinear y forman (fig # 13).

#### **IV. DISCUSIÓN**

##### **A) EXPRESION DE WT1 DURANTE EL PROCESO DE ESPERMATOGENESIS EN EL AJOLOTE**

La organización del testículo en urodelos da un modelo excelente para el estudio de las interacciones entre células germinales y somáticas, durante el proceso de maduración de las células germinales (Del Rio-Tsonis *et al*, 1996). Se ha comprobado, a través de la producción de ratones nulos para WT1, que WT1 es un gen esencial para la formación de este órgano (Kriedberg *et al*, 1993), pero el papel que este gen juega en el testículo adulto no ha sido elucidado. En el ajolote solo se ha detectado expresión del gen de WT1 en las células de Sertoli asociadas con espermatogonias en las etapas tempranas de mitosis. La reducción o desaparición del mensajero de WT1 en las células de Sertoli asociadas con espermatogonias más maduras sugiere que WT1 quizá participe indirectamente en el proceso de diferenciación de las células germinales que pronto dará lugar (como parte de una cadena de eventos asociados con este cambio), puesto que, se sabe que el nivel del ARNm de WT1 se reduce en sistemas donde un proceso de diferenciación va a ocurrir, como en el caso de la diferenciación de las células promielocíticas HL60 a granulocitos o a monocitos (Sekiya *et al*, 1994). El mensajero de WT1 no se puede detectar en estadios más avanzados, aunque el producto de este gen reaparece después del evento meiótico. La proteína de WT1 se localiza en células de Sertoli asociadas con espermatocitos, espermatidas, y espermatozoides. La proteína también se encuentra en células de

Sertoli asociadas con espermatogonia en estadios tempranos, pero se encuentra ausente en células de Sertoli asociadas con espermatogonias que ya han pasado una serie de divisiones mitóticas y que pronto entrarán a un ciclo meiótico.

La expresión tanto del mensajero como de la proteína de WT1 se detectó en las células epiteliales de los ductos que se localizan a través del testículo. Se postula que estas células poseen una bipotencialidad, y se pueden convertir en células de Sertoli y viceversa (Del Rio-Tsonis et al, 1996), como se ha observado anteriormente en varias especies de peces y urodelos (Padney, 1969; Grier 1980, 1981).

Las células de Sertoli que migran hacia las orillas de los cistos delimitan la periferia del lóbulo (fig # 6). Estas células no se desalojan con los espermatozoides y es probable que se transdiferencien a células de ductos, para continuar en el ciclo espermatogénico de renovación. Las células de Sertoli en este urodelo pueden tener dos destinos: pueden desalojarse con los espermatozoides y degenerarse, o pueden transformarse en células epiteliales de los ductos eferentes, como se ha sugerido que ocurre en el pez Poeciliidae (Billard, 1969; Padney, 1969; van de Hurk et al, 1974; Grier, 1980, 1981).

En algunos urodelos las células de Sertoli y las células de los ductos poseen las mismas características de tinción y

morfología, y además de que están yuxtapuestas en una capa continua de células. Por esto se ha postulado que las células de Sertoli en urodelos también tienen la opción de transdiferenciarse a células de ductos, o degenerar al fin del proceso de espermiación (Grier, 1993; Fraile et al, 1990). Se considera que esta bipotencialidad de las células de Sertoli es esencial para la restauración del epitelio germinal en especies donde este no es permanente. En los amniotes, por ejemplo, existe un epitelio germinal permanente y una membrana basal constante (independiente de los estadios de cruce). Esta membrana posee una población permanente de células de Sertoli adherida, al igual que ciertos estadios de las células germinales. En el caso de los urodelos, los cistos se degeneran al final de la espermiación, y eventualmente son renovados/ regenerados. Debe existir una población de células de Sertoli responsables de rodear las espermatogonias localizadas entre las conexiones de los lóbulos. La conversión de células de ductos a células de Sertoli por el contacto directo con las espermatogonias, podría explicar el constante abastecimiento de células de Sertoli, necesaria para mantener un equilibrio entre la formación y la degeneración de los cistos (Grier, 1993).

#### B) EXPRESION DE WT1 EN LOS OVARIOS DE *Amblystoma mexicanum*

Solo se logró detectar ARNm de WT1 en los ovarios del ajolote vía RT-PCR. La hibridación *in situ* e inmunodetección no tuvieron éxito. Es posible que el mensajero de este gen se encuentre a niveles muy bajos o que sea inestable, y lo mismo se puede decir de la proteína de WT1. Otra posibilidad es que este gen solo se exprese en estadios específicos, quizá en una ventana temporal muy pequeña durante la cuál el ARNm de este gen y su respectivo producto se encuentren presentes en el tejido.

En la mayoría de los vertebrados, el proceso de maduración de los ovocitos es diferente al de los espermatozoides, pues los gonocitos femeninos pasan por sus divisiones mitóticas y luego entran a meiosis durante la vida fetal. Allí se mantienen en estado de arresto meiótico, a nivel de diploteno de profase I, hasta que el animal entra a la pubertad. Es en este estadio donde el ovocito crece y una capa de células foliculares (células de la granulosa) lo rodean. Estas células nutren y protegen al ovocito hasta el final de su maduración (Byskov y Hoyer, 1994).

En el macho, las células germinales masculinas comienzan a dividirse después de que el animal nace, y al entrar a la pubertad, las espermatogonias entran a meiosis para eventualmente diferenciarse y convertirse en espermatozoides funcionales (Byskov y Hoyer, 1994). En anfibios el proceso de oogenesis es distinto al de la mayoría de los vertebrados puesto a que en el epitelio

germinal del animal adulto existe una fuente constante de oogonias que dan lugar a las generaciones sucesivas de ovocitos (Lofts, 1974). El proceso de oogenesis y espermatogenesis en los anfibios es similar, dado que existe una fuente de células germinales que constantemente proveen progenitores para ovocitos o espermatoцитos. Además es posible localizar una serie de estadios diferentes de células germinales en el adulto.

En ovarios de ratón, las células que expresan WT1 son las células de la granulosa, que nutren y protegen al ovocito (Pelletier et al, 1991; Rackley et al, 1993). Estas células rodean al ovocito durante el arresto meiótico en diploteno para protegerlo y nutrirlo. En los anfibios, las células granulosas de los ovarios se transforman, como ocurre en las células de Sertoli de los testículos. Estas células comienzan como células tipo fibroblástico al rodear un ovocito inmaduro, y se convierten en células glandulares cuando el ovocito madura (Lofts, 1974). Es posible que el patrón de expresión de WT1 en los ovarios de estos urodelos sea diferente y su patrón temporal sea limitado.

#### C) EXPRESION DE WT1 EN LOS RIÑONES DEL AJOLOTE SILVESTRE Y DEL AJOLOTE MUTANTE "SHORT TOES"

Como es de esperar, el mensajero y la proteína de WT1 se

localizaron en los glomérulos renales, tanto en los ajolotes silvestres como en los mutantes. Específicamente se localizan en las células podocitas del glomérulo, las cuales participan en el proceso de filtración del riñón. En un caso particular de mutante, donde los riñones parecían estar muy afectados, se detectó expresión en células epiteliales desordenadas que parecían tratar de formar glomérulos pero que habían fallado. El ajolote mutante "Short toes" se desarrolla con riñones anormales, los cuales muestran reducción de número de glomérulos y aparición de cistos en lugar de glomérulos. Este mutante eventualmente fallece por falta de función renal, y los ajolotes mueren con edema (Washabaugh *et al*, 1992). Este fenotipo sugiere problemas en la filtración de los glomérulos debido a daño o reducción de su número. El hecho que WT1 esté expresado en las células podocitas, que son parte de la unidad de filtración del riñón, sugiere un papel de WT1 en la formación y el funcionamiento del riñón, y el hecho de que se encuentre expresado en estas células en el ajolote mutante sugiere que WT1 quizá no este involucrado la patología del riñón.

Como se ha aludido anteriormente, el gen de WT1 puede ser mutado a tres niveles diferentes durante la formación del riñón en mamíferos y, dependiendo de cuando esta mutación ocurre, se observan diferentes fenotipos, desde la malformación de las unidades néfricas (parecido a lo que se observa en el ajolote

mutante "Short toes"), la ausencia de riñones, y hasta la formación de tumores (Hastie, 1994)

Fué de interés buscar mutaciones en el gen de WT1 clonado del riñón del ajolote "s", puesto que existen una serie de mutaciones puntuales en el gen humano de WT1 en la región que contiene los dedos de zinc en el síndrome de Denys-Drash (Hastie, 1994). Como en este síndrome los pacientes sufren de problemas en los riñones acompañados de anomalías en los órganos sexuales, era de interés investigar estas regiones del gen en el mutante "s", pues como se ha descrito, el mutante "Short toes" se desarrolla con anomalías en los riñones y en el sistema genital (Washabaugh et al, 1993). Las regiones con "hot spots", presentes en los síndromes mencionados, incluyen los dedos de zinc que están incluidos en la zona amplificada vía RT-PCR. Se clonaron y secuenciaron varias ADNcs pero no se pudo obtener ninguna evidencia de mutaciones puntuales. Quizá exista alguna mutación en el gen de WT1 en los ajolotes "s" que se localice fuera de la región de los dedos de zinc.

D) EXPRESION DE WT1 EN LOS MIEMBROS DEL AJOLOTE EN PROCESO DE REGENERACION Y DESARROLLO.

1) Estudios de regeneración de extremidades



No se observó señal de WT1 en los estadios tempranos de desarrollo de los miembros de ajolotes silvestres o mutantes analizados incluyendo 7, 10 y 14 días post-amputación. Parece que este gen no es necesario para los eventos iniciales del proceso de regeneración. Por otro lado, es posible que este gen juegue un papel en los estadios más tardíos de este proceso, pues se ha observado el producto de WT1 en estadios donde se forman los elementos del esqueleto. La proteína de WT1 se observó en el pericondrium del cartílago y también en las células condroblásticas. Es posible que en este caso WT1 regule la transcripción de genes involucrados en el proceso de condrogénesis. Tampoco se observó expresión de WT1 en los miembros del ajolote "s". En estos mutantes, los miembros son incapaces de regenerarse y solo forman un cono regenerativo, en donde no existen señales de diferenciación (Del Rio-Tsonis et al, 1992), por lo tanto, no se espera que los genes involucrados en el proceso de diferenciación se expresen en estos miembros.

## **2) Miembros en proceso de desarrollo**

Se analizaron también miembros en proceso de desarrollo del ajolote silvestre en estadios muy tempranos, cuando se delinea el miembro, cuando se forma el cono, y cuando se alarga el cono. No se

detectó el producto de WT1 en ninguno de estos estadios. Existe solo un caso descrito en la literatura en el miembro delantero del cocodrilo en donde WT1 se encuentra expresado durante el desarrollo del. Esto ocurre durante una ventana pequeña del desarrollo del miembro, y parece estar localizada en zonas cercanas a la muñeca (Kent et al, 1995). Por esto, se analizaron miembros en estadios más avanzados, cuando los elementos cartilagosos se forman. En este caso WT1 se localizó en el pericondrium y en las células condroblásticas del cartílago de los elementos distales del miembro. Estos datos estan de acuerdo con los datos obtenidos durante el proceso de regeneración de extremidades. En el laboratorio del Dr. Hastie se ha creado un ratón transgénico que contiene en un vector la región regulatoria del gen humano adyacente al gen de beta-galatosidasa. En teoría la expresión delineada por esta construcción debería señalar el patrón de expresión del gen WT1 durante el desarrollo normal del ratón. De acuerdo a las expectativas, este animal transgénico señaló las diferentes regiones de expresión de WT1, que incluyeron los miembros en proceso de desarrollo. Se observó expresión del gen en las áreas interdigitales del desarrollo y en la zona del hombro (Hastie, comunicación personal). Esto sugiere, que la ventana en cual WT1 se encuentra expresado.

La expresión de WT1 en el pericondrium puede tener

implicaciones importantes en el proceso de condrogénesis. El proceso de diferenciación del cartílago se controla por la actividad de ciertos genes actúan tanto en el pericondrium, como en las células prehipertróficas. El pericondrium esta compuesto por células fibroblásticas que gradualmente se diferencian a condroblastos, los cuales pueden depositar una matriz para finalmente diferenciarse en condrocitos. Los condrocitos proliferan hasta que se vuelven prehipertróficos y más adelante hipertróficos. La velocidad de proliferación controla el crecimiento normal de las estructuras cartilaginosas. Recientemente se ha descrito que indian hedgehog, una proteina secretada, se expresa en los condrocitos prehipertróficos y activan a Gli y a Ptc (patched, receptor de indian hedgehog) en el pericondrium. Estas proteínas a su vez activan PTHrP (Parathyroid related protein) en el pericondrium que posteriormente encuentra a su receptor PTHrPR en las células prehipertróficas. Cuando estas células se diferencian a células hipertróficas, la producción de indian hedgehog se aborta, y por lo tanto la producción de PTHrP también se disminuye. Este " feedback loop" negativo se propone que controla la velocidad de crecimiento del cartílago (Lanske et al, 1996; Vortkamp et al, 1996). La expresión específica de WT1 en el pericondrium sugiere una posible participación en este mecanismo. Siendo WT1 un factor transcripcional, es posible que WT1 regule genes importantes en el

control de crecimiento del cartílago.

Tomando en consideración que WT1 se expresa por lo menos en dos de los tejidos que se encuentran afectados en el ajolote "Short toes" es probable que este gen juegue un papel en la patogénesis de esta mutación, y también que esté involucrado en una cascada de eventos que incluyan otros genes como SOX-9. Este último gen se expresa en los riñones (Kent *et al*, 1996), y en las extremidades del ratón, incluyendo los condroblastos (Wright *et al*, 1995; Kent *et al*, 1996). Estos resultados sugieren que WT1 y SOX-9 pueden tener funciones parecidas o que están involucrados en alguna cascada de regulación en los mismos tejidos.

## V. CONCLUSIONES

1) El gen y producto de WT1 se expresa en el sistema urogenital del ajolote, tanto en el mutante "s", como en el silvestre por lo tanto, WT1 no parece ser el gen responsable de la mutación de "s" pero probablemente juega un papel en la etiología de la mutación.

2) Durante el proceso de espermatogénesis en el ajolote, WT1 parece jugar un papel en la transición de mitosis a meiosis, pues se expresa en las células de Sertoli asociadas con espermatogonias en estadios tempranos, pero no en las asociadas con espermatogonias que han pasado varias rondas de divisiones mitóticas y que van a entrar a meiosis.

3) La expresión de WT1 parece ser un buen indicador del parentesco que se observa entre las células epiteliales de los ductos y las células de Sertoli.

4) WT1 se encuentra presente en las células podocitos de los glomérulos y el hecho de que se encuentre expresado en las mismas células en los riñones afectados del ajolote mutante "s", implica que WT1 no es responsable del fenotipo en el riñón del

mutante y que otros genes más adelante de WT1 en una posible cascada de eventos moleculares y celulares esten involucrados.

6) WT1 está presente durante el desarrollo y regeneración de las extremidades en el ajolote, en la zona del pericondrium y en condroblastos, lo cuál esta de acuerdo con la propuesta de que WT1 participa en la condrogénesis.

## VI. PERSPECTIVAS

1. El sistema de espermatogénesis en el ajolote es un nuevo modelo para estudiar las interacciones celulares entre las células somáticas y las germinales y ayudará a elucidar el mecanismo de maduración de las células germinales. En particular, el estudio de WT1 durante el proceso de espermatogénesis ayudará a determinar la cascada de eventos involucrados en la transición de ciclos celulares de mitosis a meiosis.
3. Estudios de expresión en las extremidades sugieren una nueva función de WT1, la cual podría aportar información relevante al proceso de diferenciación del cartílago.

4. Los estudios que se han propuesto ayudarán a elucidar aspectos moleculares relacionados con la mutación del ajolote "Short toes", por lo tanto, podrían aportar información relevante a las áreas del desarrollo del sistema urogenital, del desarrollo de extremidades y del sistema regenerativo.

## VII. METODOS UTILIZADOS

### A) ANIMALES

Se obtuvieron ajolotes "s" y los hermanos de estos que son fenotípicamente normales de la Colonia de Ajolotes de la Universidad de Indiana, Bloomington. Estos animales variaban en edad. Cada animal se mantuvo por separado en una solución de 20% Holtfreter's a 27 °C.

Para los estudios de regeneración, las extremidades de los ajolotes se amputaron. Se coleccionaron muestras de tejido en proceso de regeneración a diferentes intervalos, incluyendo: 3, 7, 14, 17, 20, 25, y 30 días. Para realizar estudios de los otros órganos afectados, se colectaron los riñones y los órganos sexuales de estos animales. Los tejidos fueron tratados en diferentes maneras: fijados en Bouin's ó congelados a -70°C, para más tarde

realizar estudios histológicos, inmunológicos y de expresión.

## B) HISTOLOGIA

Los tejidos de riñón y de órganos sexuales se fijaron en Bouin's para ser procesados en parafina. Los tejidos se deshidrataron a través de una serie de etanol (de 50% a 100%) y posteriormente en xileno, para más tarde incluirse en parafina. Secciones en serie (8 $\mu$ m) se colectaron en portaobjetos cubiertos con gelatina (+/- 1%). Las secciones se tiñeron con Gomori's Trichome, ó Hematoxylina y Eosina. La primera técnica tiñe tejidos conteniendo componentes de la matriz extracelular, en este caso colágena. La última es una tinción general: Eosina = citoplasma y Hematoxylina = núcleo.

## C) HIBRIDACION *IN SITU*

Se disectaron testículos, ovarios y riñones de ajolotes, variando de 6 a 2 años de edad, se congelaron en OCT (Optimal Cutting Temperature). Las muestras congeladas se seccionaron (6-8 $\mu$ m), fijadas en 4% paraformaldehído por 20 minutos y enjuagadas 2 veces en 1x PBS (Phosphate Buffer Saline) por 5 minutos. Más tarde las muestras se incubaron en 0.1 M trietanolamina por 5 minutos, y



por 10 minutos más al añadirle anhídrido acético. Se enjuagaron en 2x SSC (Sodium Chloride/Sodium Citrate) 2 veces por 5 minutos cada vez, y eventualmente se deshidrataron a través de una serie de 30-100% etanol. Una hora después se hibridizaron las secciones con ribosondas marcadas con <sup>35</sup>SUTP entre 12- 16 horas a 52°C. La solución de hibridación contenía 40% de formamida, 10% de Sulfato de Dextran, NaCl de 300mM, TrisHCl de 8mM ph 7.5, EDTA de 1mM, 0.8x solución de Denhart's y ARN de levadura a 0.4 mg/ml. Al día siguiente se enjuagaron las muestras en SSC 2x por 15 minutos, seguido por una solución (solución #1) que contiene 50% de formamida, SSC 1x, 0.1% de beta-mercaptoetanol a 52 °C dos veces por 15 minutos. Más tarde se incubaron las muestras en una solución que contiene RNasa a 20 ug/ml en NaCl de 0.5M y Tris de 10mM ph 8.0 por 30 minutos a 37°C. Las muestras se volvieron a enjuagar en solución # 1 por 15 minutos 2 veces a 52°C, y finalmente las muestras se enjuagaron con SSC 0.1x y 0.1% beta- mercaptoetanol (solución #2) por 15 minutos/ 2 veces a 52°C. Las secciones fueron deshidratadas a través de una serie de etanol (30-100%) y se dejaron secar para más adelante ser cubiertas con emulsión fotográfica. Las muestras se expusieron por 2 semanas a 4°C. Las muestras se tiñieron con hematoxylina-eosina o con la tintura de van Gieson's.

#### D) RIBOSONDAS

Las ribosondas se produjeron a partir del plásmido que contiene AxWT1. Para producir una ribosonda antisentido y otra sentido, este plasmido se digirió con las correspondientes enzimas: EcoRV y Bhl, respectivamente las reacciones se trataron con proteinasa K a 400 ug/ml a 37°C por 30 minutos, y se limpiaron mediante una serie de extracciones con fenol y cloroformo, seguidos por una precipitación con etanol. Un microgramo de ADN digerido se utilizó en la reacción de marcaje, que incluye: 10mM DTT, polimerasas T7/ T3, 50 uCi <sup>35</sup>SUTP, y buffer 1x. La reacción se incubó por 1 hora a 37°C. Se separaron los nucleótidos no incorporados de cada ribosonda al pasar las muestras a través de columnas de sefarosa (nucrap, Stratagene). Más tarde se determinó la eficiencia de incorporación utilizando un contador de centelleo.  $1 \times 10^7$  cpm/ml se utilizaron al hibridizar.

#### E) INMUNOHISTOQUIMICA

Muestras congeladas (testículos, ovarios, riñones y extremidades en proceso de regeneración y desarrollo) se seccionaron (6-8µm), se fijaron con metanol a -20°C por 10 minutos, seguido por un tratamiento con 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en metanol por 20 minutos.

Las muestras se enjuagaron en PBS 1x por 20 minutos, seguido por una incubación con 1x PBS/ 5% NGS (normal goat serum) por otros 20 minutos. Después las secciones se incubaron por 30 minutos con un anticuerpo policlonal, diseñado en contra de los últimos 18 amino ácidos de la proteína de WT1 de humanos (Santa Cruz Biotechnology), el cual reconoce cada uno de los productos alternativos de WT1 en rata, ratón y humanos. Las muestras se enjuagaron tres veces en PBS 1x por 5 minutos cada vez, y luego se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado por 30 minutos. De nuevo las muestras se enjuagaron con PBS 1x tres veces y luego las muestras se incubaron con un complejo que contiene avidina, conjugada con Peroxidasa de rábano, que ha sido biotinilado por 30 minutos. Se enjuagaron de nuevo las muestras en PBS 1x seguido por triton x-100 al 0.5% por 30 segundos. Más adelante las muestras se incubaron con DAB (3,3'-Diaminobenzidine)/  $H_2O_2$  por otros 30 minutos. Finalmente se enjuagaron con PBS 1x y se teñeron ligeramente con hematoxilina-eosina. Las muestras se montaron con glicerol al 90%/PBS 1x al 10%, o permanentemente en permount. El péptido de WT1 (Santa y Cruz Biotechnology) utilizado para crear el anticuerpo, fué ensayado en experimentos de competencia para determinar la especificidad del anticuerpo; la señal específica se eliminó al añadir el péptido. También se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a fluoresceína (IgG-Fitc) de Cappel Laboratories por 1 hora, 37°C.

Las muestras procesadas de esta manera no requieren tratamiento con  $H_2O_2$ , ni tratamiento con el complejo avidina-biotina/horseradish peroxidase o con el substrato DAB. Estas muestras se observaron bajo un microscopio de fluorescencia.

#### F) RTPCR

El ARN de los riñones de ajolotes mutantes "s" se aisló utilizando el método de CsCl descrito en Sambrook *et al* (1989). Se realizaron reacciones de RT-PCR utilizando el ARN mencionado y oligonucleótidos degenerados pero conservados del gen WT1. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: wt1= 5'-AAGYTRTCCCAYTTRCAGATG -3', el cual representa una secuencia 3' del séptimo "zinc finger"; wt2= 5'- GAGCAGCTGAGAAACGICCITTCATGTG -3', el cual representa una secuencia 5' del séptimo "zinc finger"; wt3= 5'- ACCTGTATGAGTCCTIGTRTG -3', el cual representa una secuencia 3' en el noveno "zinc finger". Wt1 y wt3 producen un fragmento de 216 pb, mientras que wt2 y wt3 producen un fragmento de 277 pb.  
Clave: R= A,G; Y= C,T; I= Inosina

El ADNc se sintetizó con el kit "SuperScript Preamplification System" de BRL, que consiste en sintetizar el ADNc a partir de ARN usando transcriptasa de reversa y una mezcla de oligonucleótidos consistente de hexámero al azar como iniciador; posteriormente se

añadió RNase H para destruir cualquier molécula de ARN presente. En particular, se incubó 1µg de ARN de cada tejido con 1µl de "random hexamers" (50 ng/µl) a 70°C por 10 minutos. Estas reacciones se colocaron en hielo inmediatamente después de la incubación, se añadieron 2µl del buffer 10x de síntesis (Tris-Hcl 200 mM, pH 8.4, KCl 500 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, BSA 1 mg/ml), 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 2 µl de DTT 0.1M y 1 µl de "SuperScript RT" (200 U/µl) a cada reacción, y se incubaron a 26 °C por 10 minutos y luego a 42°C por 50 minutos. Las reacciones se detuvieron al incubarlas a 90 °C por 5 minutos. Posteriormente las muestras se incubaron por 20 minutos a 37°C con 1µl de RNase H (2U/µl).

Para las reacciones de PCR se utilizaron de 2-5 µl de ADNc. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: dNTPs 200 µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, oligonucleótidos iniciadores a 4 µM, 2.5 U de Taq, tris-Hcl 10mM, KCl 50mM. Los ciclos que se usaron fueron los siguientes: Desnaturalizar inicialmente por 3 minutos y posteriormente por 45 segundos, aparear a 50°C (30 sec) y extender a 72°C por 45 sec. Se utilizó una extensión final a 72°C por 5 minutos. 35 ciclos se usaron en total. Los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector pcrII.

Para los estudios de expresión de WT1 en los ovarios del ajolote silvestre, se aisló ARN de ovarios a través del método de Cscl (Sambrook et al, 1989). Las reacciones de RT-PCR se formularon

como se mencionó anteriormente, pero esta vez se utilizaron oligonucleótidos no degenerados: wt1b= 5' -CAGATGCACAACCGAAAGCACAC- 3' y wt3b= 5'GGTCTTCAAATGATCAGATCG- 3'. Las bandas obtenidas se verificaron por el tamaño esperado de 172 pb. También se optimizó la concentración de MgCl<sub>2</sub> a 1.7mM. Después de correr la muestras en un gel de 3% agarosa, estas se transfirieron a membranas de nylon en condiciones alcalinas. Las membrana se preincubadaron en SSC 5x, fosfato de sodio 20mM pH 7.0, denhart's 10x, SDS al 7% y 100ug/ml de ADN de espermatozoides de salmón. Se hibridó con la misma solución con la adición de 10% de sulfato de dextran y 5ng/ml de la sonda marcada con <sup>32</sup> P ATP. La sonda se produjo al marcar con cinasa T4 un oligonucleótido que representa una secuencia interna de WT1 (5' CGGCGATTTTCCCGTTCCGA 3'). Se enjuagaron las membranas en SSC 3x, Denhart's 10x, fosfato de sodio 10mM, pH 7.0 y SDS al 5% por 1 hora a 50°C, seguido por otro enjuague en 1x SSC, 1% SDS por otra hora a 50°C. Las membranas fueron expuestas a film de rayos X entre 1.5 horas y 24 horas.

#### G) CLONACION

Los productos amplificados en las muestras de "s" se clonaron en el plásmido pcrII (apéndice # 1) utilizando el kit de " TA

cloning " de Invitrogen para la ligación. Después de verificar los productos vía electroforesis en un gel de agarosa de nusieve al 3%, se utilizaron 3  $\mu$ l de cada reacción de PCR, para ligar directamente en el vector pcrII a 12 °C por 12-14 horas con 4 U de T4 ligasa.

Se utilizaron células E. coli DH5 $\alpha$  competentes de BRL para la transformación de las construcciones mencionadas. 3  $\mu$ l de la ligación anterior se incubó con 50  $\mu$ l de DH5 $\alpha$  por 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras se incubaron a 37°C por 20 segundos e inmediatamente se pusieron a 4°C por 2 minutos. Mas tarde se añadió 0.95 ml de medio de Luria-Bertani a las muestras y estas se incubaron, agitandose a 37°C por una hora. Finalmente, se concentraron las células para aplicarlas en platos de agar con penicilina (100  $\mu$ g/ml) y X- Gal (100  $\mu$ g/ml). Solo las colonias blancas (vs azules) tenían la posibilidad de contener las construcciones correctas. La selección de bacteria que contiene el plásmido correcto se hizo a través de la extracción de plásmidos utilizando la técnica de Buorbouin (Sambrook *et al*, 1989). Después de digerir las clonas con EcoRI e identificar las que contienen el fragmento correcto, estas se secuenciaron usando el "sequenace kit" de USB el cuál se basa en el método de Sanger (Sanger *et al*, 1977).

#### VIII. REFERENCIAS

Armstrong, J.F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W.A., Hastie, N.D., and Bard, J.B.L. (1992) The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Develop.* 40: 85-97.

Bardin, C.W., Cheng, C.Y., Mustow, N.A., and Gunsalus, G.L. (1994). The Sertoli cell. In: "The Physiology of Reproduction," Knobil, E. and Neil, J.D. (eds.), second edition. Raven Press, New York, 1291-1333.

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

Bergmann, M., Greven, H. y Schindelmeiser, J. (1983). Observations on the blood-testis barrier in a frog and a salamander. *Cell Tissue Res.* 232: 189-200.

Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., y Fellous, N. (1990). Genetic evidence



equating SRY and the sex determining gene. Nature 348: 448-450.

Bickmore, W.A., Oghene, K., Little, M.H., Seawright, A., van Heyningen, V., and Hastie, N.D. (1992) Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor WT1 gene transcript. Science 257: 235-237.

Billard, R. (1969) La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. III . Ultrastructure de cellules de Sertoli. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 9: 307-313.

Billard, R. (1970) La spermatogenèse de *Poecilia reticulata*. III . Ultrastructure de cellules Sertoli. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 10: 37-50.

Borland, K., Mita, M., Oppenheimer, C.L., Blinderman, L.A., Massague, J., Hall, P.F., and Czech, M.P. (1984) The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. Endocrinology, 114: 240-246.

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

Buckler, A., Pelletier, J., Haber, D., Glaser, T., and Housman, D. (1991) Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor (WT1) during kidney development. Mol. Cell. Biol. 11, 3: 1707-1712.

Byskov, A.G. (1974). Does the rete ovarii act as trigger for the onset of meiosis? Nature 252:396-397.

Byskov, A.G., y Hoyer, P.E. (1994). Embryology of mammalian gonads and ducts. En: "The Physiology of Reproduction", Knobil, E., y Neil, J.D. (eds), second edition. Raven Press, LTD, New York, NY. 487-539.

Call, KM, Glaser, T, Ito, CY, Buckler, AJ, Pelletier, J, Haber, DA and Housman, DE (1990). Isolation and Characterization of a Zinc Finger Polypeptide gene at the Human Chromosome 11 Wilm's Tumor Locus. Cell 60: 509-520.

Cameron, JA, Hilgers, AR, and Hinterberger, TJ (1986). Evidence that Reserve Cells are a Source of Regenerated Adult Newt Muscle in Vitro. Nature 321: 607-610.

Casimir, CM, Gates, PB, Patient RK, and Brockes, JP (1988).

Evidence for Dedifferentiation and Metaplasia in the Amphibian Regeneration from Inheritance of DNA Methylation. *Development* 104: 657-668.

Chatelain, P.G., Neville, D., and Saez, J.M. (1987) Somatomedin-C/insulin-like growth factor-like material secreted by Sertoli cells in vitro: Characterization and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 1009-1017.

Cho, KWY, Blumberg, B, Steinbeisser, H and De Robertis, EM (1991). Molecular Nature of the Spemann's Organizer: The Role of the *Xenopus* Homeobox Gene Goosecoid. *Cell* 67: 1111-1120.

Coppes, M.J., Liefers, G.J., Higuchi, M., Zinn, A.B., Balfe, J.W., Williams, B.R.G. (1992). Inherited WT1 mutation in Denys-Drash syndrome. *Cancer Res.* 52: 6125-6128.

Del Rio-Tsonis, K, Washabaugh, CH, and Tsonis, PA (1992). The Mutant Axolotl Short toes Exhibits Impaired Limb Regeneration and Abnormal Basement Membrane Formation. *PNAS* 89: 5502-5506.

Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C.H., and Tsonis, P.A. (1995) Expression of pax-6 during urodele eye development and

regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 5092-5096.

Del Rio-Tsonis, K., Covarrubias, L., Kent, J., Hastie, N.D., y Tsonis, P.A. (1996). Regulation of the Wilms' tumor gene during spermatogenesis. Dev. Dyn. 207: 372-381

Dieker, H., Optiz, J.M. (1969). Associated acral and renal malformations. Birth Defects: Original Article Series 3: 68-77.

Dressler, G.R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H. O., y Gruss, P., (1990). Pax-2, a new paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. Development 109: 787-795.

Dressler, G.R., Douglas, E.C. (1992). Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1179-1183.

Dressler, G.R. (1995). The genetic control of renal development. Current Opinions in Nephrology & Hypertension 4: 253-257.

Drummond, I.A., Rupperecht, H.D., Rohwer-Nutter, P., Lopez-Guisa, J.M., Madden, S.L., Rauscher III, F.J., and Sukhatme, V.P. (1994)

DNA recognition by splicing variants of the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Mol. Cell. Biol.* 14,6: 3800-3809.

Egar MW, Madraswalla, F (1992): Tail Regeneration in the Juvenile and Adult Axolotls. *Anat. Rec.* 232: 29A-30A.

Evans, J.A., Vitez, M., Czeizel, A. (1992). Patterns of acrorenal malformation associations. *Am. J. of Med. Genet.* 44: 413-419

Fraile, B., Saez, F.J., and Paniagua, R. (1990) The cycle of follicular and interstitial cells (Leydig cells) in the testis of the marbled newt, *Triturus marmoratus* (Caudata, Salamandridae). *J. Morph.* 204: 89-101.

Franchi, M., Camatini, M. y deCurtis, I. (1982). Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. *J. Ultrastruct. Res.* 80:253-263.

Francke, V., Holmes, L.B., Atkins, L., Riccardi, V.M. (1979) Aniridia-Wilms tumor association: evidence for specific deletion of 11p13. *Cytogenet. Cell Genet.* 24: 185-192.

Fox, H. (1963) The amphibian pronephros. *Quart. Rev. A: Biol.* 38: 1-

25.

Geduspan, J.S., y Solursh, M. (1992). A growth-promoting influence from the mesonephros during limb outgrowth. *Devel. Bio.* 151: 242-250.

Grier, H.J., Linton, J.R., Leatherland, J.F., de Vlaming V.L. (1980) Structural evidence for the two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* 159: 331-345.

Grier, H.J. (1981) Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am. Zool.* 21: 345-357.

Grier, H.J. (1993) Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: "The Sertoli Cell," Russell, L.D. and Griswold, M.D. (eds), first edition. Cache River Press, Clearwater, FL. 704-739.

Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., y Lovell-Badge, R. (1995). Expression of SRY, the mouse sex determining gene. *Development* 121: 1603-1614.

Haqq, C.M., King, C.Y., Ukiyama, E., Falsafi, S., Haqq, T.N.,  
Donahoe, P.K., y Weiss, M.A. (1994). Molecular basis of mammalian  
sexual determination: Activation of Mullerian Inhibiting Substance  
gene expression by SRY. Science 266: 1494-1500.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Hastie, N.D. (1994). The genetics of Wilms' tumor- a case of disrupted development. *Annu. Rev. Genet.* 28: 523-558.

Hay, ED (1959). Electron Microscopic Observations of Muscle Dedifferentiation in Regenerating *Amblystoma* limbs. *Develop. Biol.* 1: 555-585.

Hay, ED, and Fischman, DA (1961). Origin of the Blastema in the Regenerating limbs of the Newt *Triturus viridescens*. *Develop. Biol.* 3: 26-59.

Humphrey, R.R. (1928). The developmental potencies of the intermediate mesoderm of *Amblystoma* when transplanted into ventrolateral sites in other embryos: the primordial germ cells of such grafts and their role in development of a gonad. *Anat. Rec.* 40: 67-101.

Humphrey, R.R. (1967). Genetic and Experimental Studies of a Lethal Trait (Short toes) in the Mexican Axolotl (*Amblystoma mexicanum*). *J. Exp. Zool.* 164: 281-296.

Izpisúa-Belmonte, JC and Duboule, D (1992). Homeobox Genes and Pattern Formation in the Vertebrate Limb. *Devel. Biol.* 152: 26-36.



Jadresic, L., Leake, J., Gordon, I., Dillon, M.J., Grant, D.B, (1990). Clinicopathologic review of twelve children with nephropathy, Wilms' tumor, and genital abnormalities (Drash Syndrome). J. Pediatr. 117: 717-725

Jäger, R.J., Anvret, M., Hall, K., y Scherer, G. (1990). A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. Nature 348: 452-454.

Kent, J., Coriat, A.M., Sharpe, P.T., Hastie, N.D., and van Heyningen, V. (1995) The Evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. Oncogene 11, 9: 1781-1792.

Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E, Sinclair, A.H., y Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. Develop. 122, 2813-2822.

Kessel, M and Gruss, P. (1990). Murine Developmental Control Genes. Science 249: 374-379.

Kleinebrecht, J, Selow, J and Winkler, W (1982). The Mouse Mutant Limb Deformity (ld). Anat. Anz. Jena 152: 313-324.

Kreidberg, J., Sariola, H., Loring, J., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691.

Lanske, B., Karaplis, A.C., Lee, K., Luz, A., Vortkamp, A., Pirro, A., Karperien, M., Defize, L.H.K., Ho, C., Mulligan, R.C., Abou-Samra, A., Jüppner, H., Segre, G.V., y Kronenberg, H.M. (1996). PTH/PTHrP Receptor in early development and indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273: 663-666.

Larsson, S., Charlieu, J.P, Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyningen, V., and Hastie, N.D. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81: 391-401.

Lazard, L. (1974) Etude histochimique comparée de la Delta 5-3B-Hydroxysteroïde Déshydrogénase du testicule d'Axolotl normal ou transplanté dans un Hôte Male ou Femelle. *Gen. Comp. Endocr.* 24: 314-325.

Lazard, L. (1976) Spermatogenesis and 3B-HSDH activity in the testis of the axolotl. *Nature* 264: 796-797.

Lazard, L. (1979) Steroidogenesis in the Axolotl testis. Histochemistry of two major enzymes related to cell type, spermatogenesis, and substrate. Gen. Comp. Endocr. 39: 381-387.

Little, M.H., Posser, J., Condie, A., Smith, P.J., van Heyningen, V., y Hastie, N.D. (1992). Zinc Finger point mutations within WT1 gene in Wilms'tumor patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4791-4795.

Liversage, L. , McLaughlin, DS and McLauhlin, HMG (1985). The Hormonal Milieu in Amphibian Appendage Regeneration. In Regulation of Vertebrate Limb Regeneration, Oxford University press. (Sicard, RE, ed), pp 54-80.

Lo, DC, Allen, F, and Brockes, JP (1993). Reversal of Muscle Differentiation during Urodele Limb Regeneration. PNAS 90: 7230-7234.

Lofts, B. (1984) Amphibians. In: " Marshall's Physiology of Reproduction," Vol 1 Reproductive cycles of vertebrates. Lamming, G.E. (ed.), fourth edition, Churchill Livingstone Inc, New York. 127-205.

Madden, S. L., Cook, D.M., Morris, J.F., Gashler, A., Sukhatme, V.P. y Rauscher, F.J., III (1991). Transcriptional repression mediated by the Wilms tumor gene product. *Science* 253: 1550.

Madden, S.L., Cook, D.M., and Rauscher III, F.J. (1993) A structure-function analysis of the transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene* 8: 1713-1720.

Maas, R., Elfering, S., Glaser, T., y Jepeal, L. (1994). Deficient outgrowth of the ureteric bud underlies the renal agenesis phenotype in mice manifesting the limb deformity (ld) mutation. *Dev. Dyn.* 199: 214-228.

Mescher, Al (1993). Development and Regeneration of Limbs in the Short Toes Axolotl Mutant. *Limb Development and Regeneration*: 181-191, Wiley-Liss.

Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., y Buehr, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.

Moreno-Mendoza, N., Herrera-Muñoz, J., y Merchant-Larios, H.

(1995). Limb bud mesenchyme permits seminiferous cord formation in the mouse fetal testis but subsequent testosterone output is markedly reduced by the sex of the donor stromal tissue. *Dev. Biol.* 169: 51-56.

Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., and Zabel, B. (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119: 1329-1341.

Nieuwkoop, P.D. (1948) Some further data concerning the determination of the mesonephros. *Experientia* 4: 391-394.

O'Connor, R.J. (1938) Experiments on the development of the pronephric duct. *J. Anat.* 73: 145-154.

Oonk, R.B., and Grootenoged, J.A. (1988) Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rat and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol. Cell. Endocr.* 55: 33-43.

Padney, S. (1969) Effects of hypophysectomy on the testis and secondary sex characters of the adult guppy, *Poecilia reticulata*.

Can. J. Zool. 47: 755-781.

Park, S., Tomlinson, G., Nisen, P., y Haber, D.A (1993a). Altered trans-activational properties of a mutated WT1 gene product in a Warg-associated Wilms' tumor. Cancer Res. 53: 4757-4760.

Park, S., Schalling, M., Bernard, A., Maheswaran, S., Shipley, G.C., Roberts, D., Fletcher, J., Shipman, R., Rheinwald, J., Demetri, G., Griffin, J., Midnden, M., Houssman, D.E., y Haber, D.A. (1993b). The Wilms' tumor gene is expressed in murine mesoderm-derived tissues and mutated in a human mesothelioma. Nature Genet. 4: 415-420.

Pasteels, J. (1942). New observations concerning maps of presumptive areas of the young amphibian gastrula (Amblystoma and Discoglossus). J. Exp. Zool. 89:255-281.

Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L., Fine, R.N., Silverman, B.L., Haber, D.A. y Housman, D. (1991b). Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. Cell 67: 437- 447.

Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A., and Housman, D. (1991b) Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 5:1345-1356.

Phelan, A.S., Lindgerb, C., and Call, K. (1994) Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is downregulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth and Diff.* 5: 677-686.

Plachov, D., Chowdhury, K., Walther, C., Simon, D., Guenet, J.L., y Gruss, P. (1990). Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Develop.* 110: 643-651.

Poleev, A., Fickenscher, H., Mundlos, S., Winterpacht, A., Zabel, B., Fidler, A., Gruss, P., y Plachov, D. (1992). PAX8, a human paired box gene: isolation and expression in developing thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Develop.* 116: 611-623.

Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Houseman, D., van Heyningen, V., and Hastie, N. (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary

development. Nature 346: 194-197.

Pritchard-Jones, K. and Fleming, S. (1991) Cell types expressing the Wilms' tumour gene (WT1) in Wilms' tumours: implications for tumour histogenesis. Oncogene 6: 2211-2220.

Pudney, J. (1993) Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: "The Sertoli Cell," Russell, L.D. and Griswold, M.D. (eds), first edition. Cache River Press, Clearwater, FL. 704-739.

Rackley, R.R., Flenniken, A. M., Kuriyan, N. P., Kessler, P.M., Stoler, M.H., y Williams, R.G. (1993). Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. Cell Growth @ Differentiation 4: 1023-1031.

Rackley, R.R, Kessler, P.M., Cambell, C. y Williams, B.R.G (1995). In situ expression of the early growth response gene-1 during murine nephrogenesis. The Journal of Urology 154: 700-705.

Rauscher, F.J III, Morris, J.F., Tournary, O.E., Cook, D.M., Curran, T. (1990) Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. Science 250: 1259-1262.



Reddy, J.C., Morris, J.C., Wang, J., English, M.A., Haber, D.A., Shi, Y., and Licht, J.D. (1995) WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 270,18: 10878-10884.

Rothenpieler, U. W., y Dressler, G.R. (1993). Pax-2 is required for mesenchyme-epithelium conversion during kidney development. *Development* 119: 711-720.

Ryner, L.C. y Swain, A. (1995). Sex in the 90's. *Cell* 81:483-493.

Sanger, F, Niklen, S and Coulson, AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* 74: 5463-5467.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) " Molecular Cloning, A laboratory Manual." Ford, N., Nolan, C., and Ferguson, M. (eds), second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Saunders, JW, Jr, Cairns, JM and Gasseling, M (1957). The Role of the Apical Ridge of Ectoderm in the Differentiation of the Morphological Structure and Inductive Specificity of Limb parts in the Chick. *J. Morph.* 101: 57-58.

Saxen, L. (1987). Ontogenesis of the Vertebrate Excretory System. En: " Organogenesis of the Kidney", Cambridge University Press, Cambridge, England. 1-34.

Scadding, SR (1980). Limb Regeneration in Adult Amphibia. Can. J. Zool. 59: 34-36.

Scadding, SR (1977). Phylogenetic Distribution of Limb Regeneration Capacity in Adult Amphibia. Can. J. Zool. 202: 57-68.

Sekiya, M., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1994) Downregulation of Wilms' tumor gene (wt1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. Blood 83: 1876-1882.

Schuchardt A., D'Agati, V., Larsson-Blomberg, L., Constantini F., y Pachnis, V. (1994). Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor ret. Nature 367: 380-383.

Sharma, P.M., Yang, X., Bowman, M., Roberts, V., and Sukumar, S. (1992) Molecular cloning of rat Wilms' tumor complementary DNA and a study of messenger RNA expression in the urogenital system and

the brain. Cancer Res. 52: 6407-6412.

Sharma, P.M., Bowman, M., Madden, S.L. Rauscher, F.J. III, y Sukumar, S. (1994). RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. Genes @ Devel. 8: 720-731.

Sharpe, R.M. (1994) Regulation of spermatogenesis. In: " The Physiology of Reproduction," Knobil, E. and Neil, J.D (eds), second edition. Raven press, Ltd., New York. 1363-1434.

Singer, M (1952). The Influence of the Nerve in the Regeneration of the Amphibian Extremity. Quart. Rev. Biol. 27: 169-200..

Sorrentino, V., Giorgi, M., Geremia, R., Besmer, P., and Rossi, P. (1991) Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. Oncogene 6: 149-151.

Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., y McMahon, A.P. (1994). Epethilial transformation of metanefric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. Nature 372: 679-283.

Stephens, T.D., Spall, R., Baker, W.C., Hatt, S., Pugmire, D., Shaker, M., Willis, H.J., y Winger, K.(1991). Axial and paraxial

influences on limb morphogenesis. J. Morphol. 208: 376-379.

Thorton, CS (1968). Amphibian Limb Regeneration. Adv. Morphog 7: 205-249.

Thorton, CS (1957). The Effect of Apical Cap Removal on Limb Regeneration in Amblystoma larvae. J. Exp. Zool. 134: 357-384.

Torres, M., Gómez Pardo, E., Dressler, G.R., y Gruss, P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. Development 121: 4057-4065.

Tres, L.L, and Kierszenbaum, A. L. (1983) Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic co-cultures. Exp. Cell Res. 162: 33-50.

Triedemann, K., y Egerer, G. (1984) Vascularization and glomerular ultrastructure in the pig mesonephros. Cell Tissue Res. 238: 165-175.

Tsonis, PA, Del Rio-Tsonis, K, and Washabaugh, CH (1993). Analysis of the Mutant Axolotl Short toes. Limb Development and Regeneration: 171-179, Wiley-Liss.

Tsonis, PA (1996). Limb Regeneration. Cambridge University Press.

van den Hurk, R., Meek, J., Peute, J. (1974) Ultrastructural study of the testis of the black molly (*Mollienisia latipinna*).II. Sertoli cells and Leydig cells. K. Ned. Akad. Wet. Ser. C. 77: 470-476.

Vanelli, B.G., Barni, T., Orlando, C., Natali, A., Serio, A., Balboni, G.C. (1988) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: An immunohistochemical study. Fertil. Steril. 49: 666-669.

Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G, V., Kronenberg, H.M., y Tabin, C.J. Regulation of rate of cartilage differentiation by indian hedgehog and PTH-related protein. Science 273: 613-622.

Wagner, (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX-9. Cell 79: 1111-1120.

Wallace, H (1981). Vertebrate Limb Regeneration. Chechester, Wiley.

Wallace, H, Maden, M, and Wallace, BM (1974). Participation of

Cartilage in Amphibian Limb Regeneration. *J. Embryol. exp. Morph.* 32,2: 391-404.

Wang, Z.Y., Qui, Q.Q., and Deuel, T.F. (1993) The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J. Biol. Chem.* 268, 13: 9172-9175.

Washabaugh, CH, Del Rio-Tsonis, K, and Tsonis, PA (1993). Variable Manifestations in the Short toes Mutation of the Axolotl. *Journal of Morphology* 217: 1-8.

Werner, H., Rauscher III, F.J., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A., Roberts, C.T. Jr., and LeRoith, D. (1994) Transcriptional repression of the Insulin-like growth factor I Receptor (IGF-I-R) gene by the Tumor Suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J. Biol. Chem.* 269, 17: 12577-12582.

Woychik, RP, Stewart, TA, Davis, LG, D'Eustachio, P and Leder, P (1985). An Inherited Limb Deformity Created by Insertional Mutagenesis in a Transgenic mouse. *Nature* 318: 36-40.

Woychik, RP, Maas, RL, Zeller, R, Vogt, TF and Leder, P

(1990). "Formins": Proteins Deduced from the Alternative Transcripts of the Limb Deformity Gene. *Nature* 346: 850-855.

Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Grangadharan, U., Greenfield, A., y Koopman, P. (1995). The SRY-related gene Sox-9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat. Genet.* 9: 15-20.

Zeller, R., Jackson-Grusby, L., y Leder, P. (1989). The limb deformity gene is required for apical ectodermal ridge differentiation and anterioposterior limb pattern formation. *Genes @ Devel.* 3: 1481-1492.

ANEXO



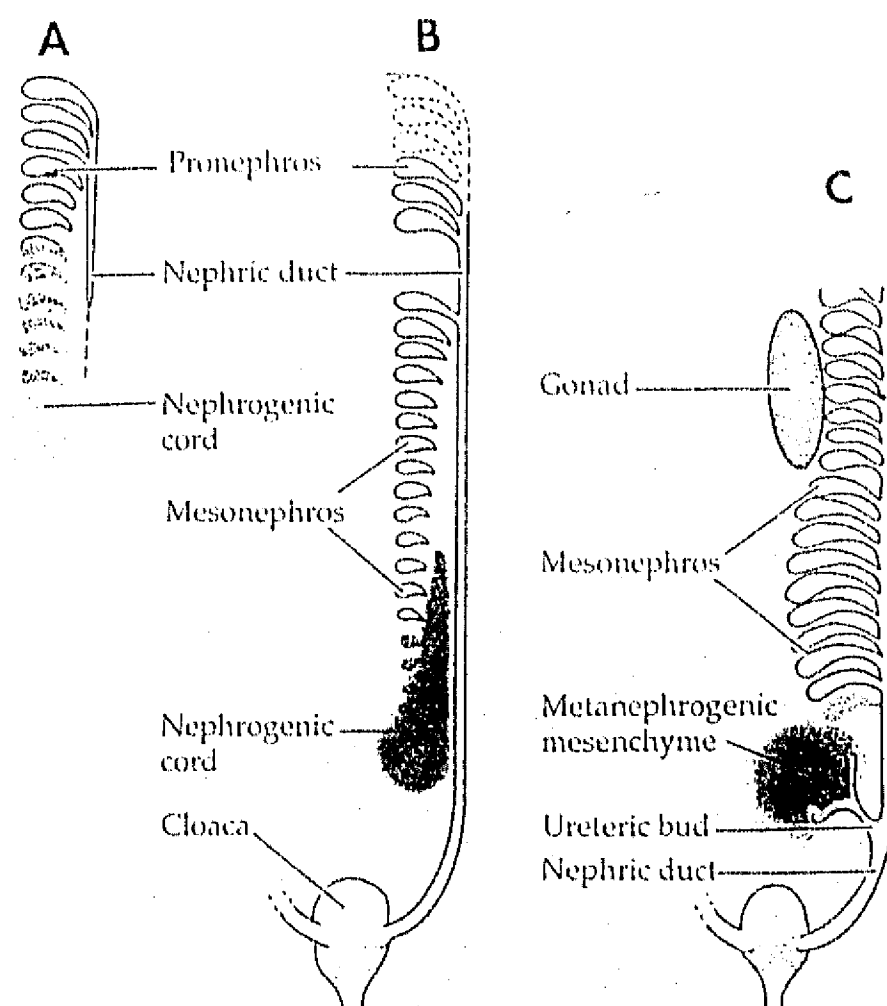


Figura # 1. Representación del desarrollo del riñon en vertebrados.

A) formación del pronefros, B) formación del mesonefros; C) formación el metanefros

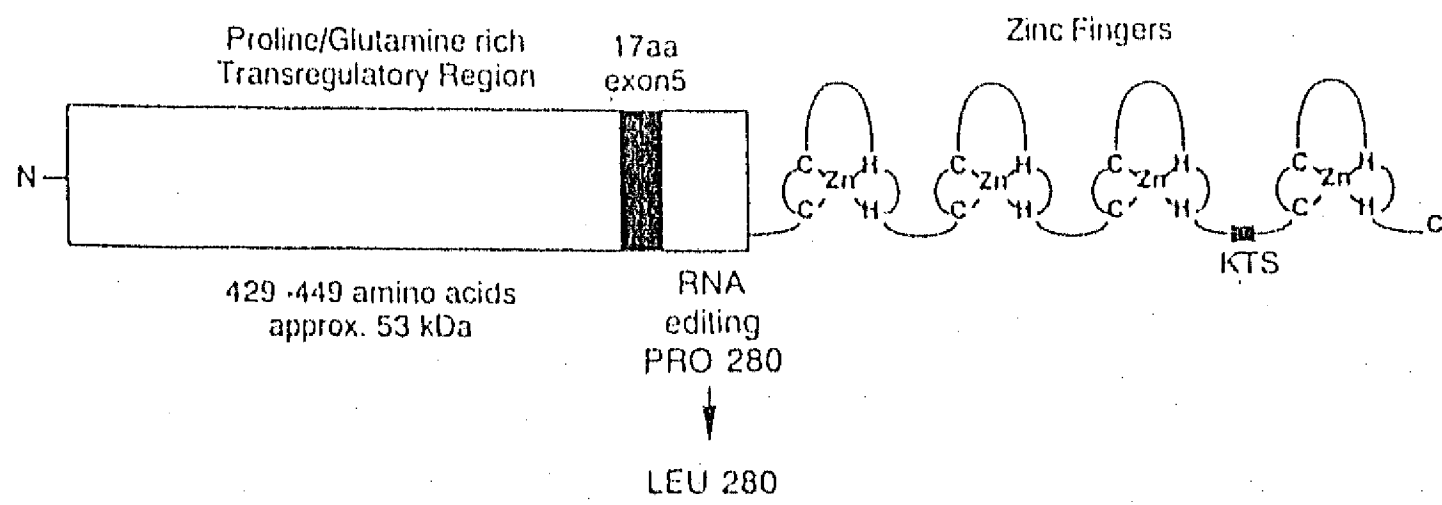


Figura # 2. Representación de la estructura del gen del tumor de Wilms'.

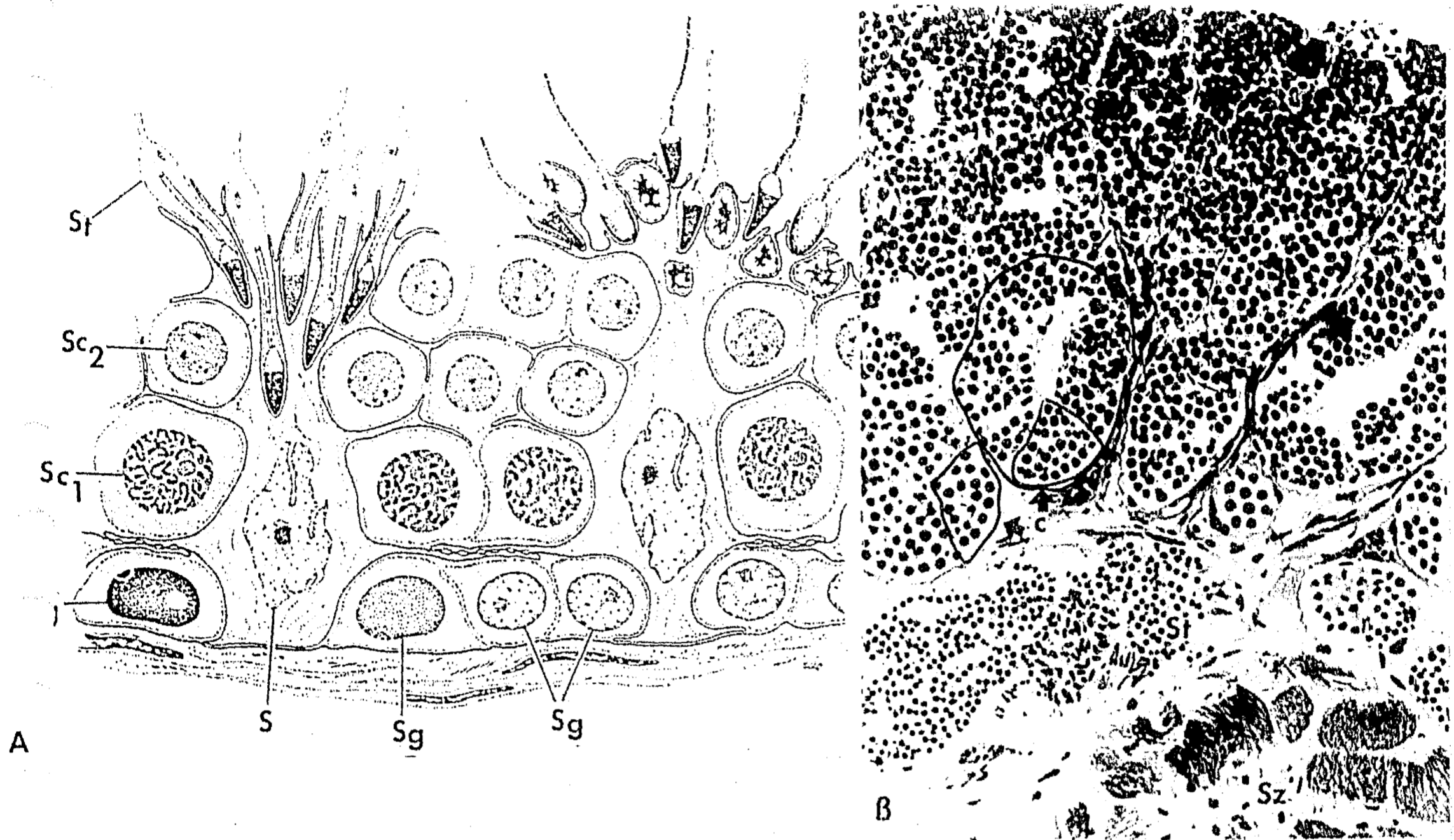


Figura # 3. Representación de una sección de un túbulo seminífero de un mamífero, en donde las células de Sertoli se encuentran asociadas con más de un estadio de células germinales (A), comparado con una sección de un testículo de anfibio urodelo en donde las células Sertoli se encuentran asociadas solo con un estadio de células germinales (B). Se debe notar que la organización del testículo comprende de grupos de cistos dentro de lóbulos, y que dentro de cada cisto se encuentra solo un estadio de células germinales. Existe una regionalización céfalo-caudal en donde los cisto más maduros se encuentran en la zona más caudal. c= cisto; L=lóbulo; S= Sertoli; Ly= Leydig; Sg= espermatogonia; Sc= espermatocito; St=spermátido; Sz= espermatozoide.

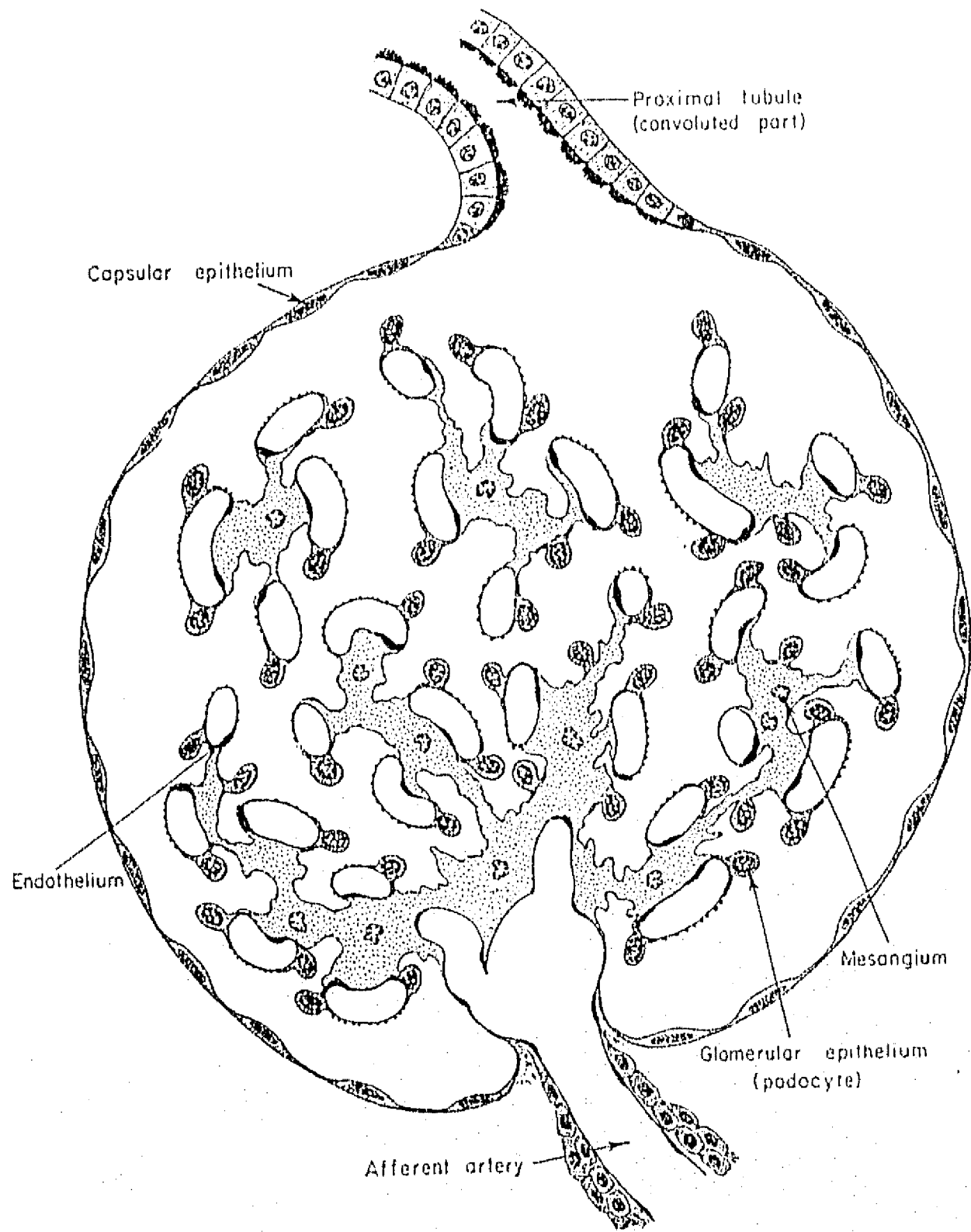


Figura # 4. Diagrama de una sección a través de un glomérulo normal.

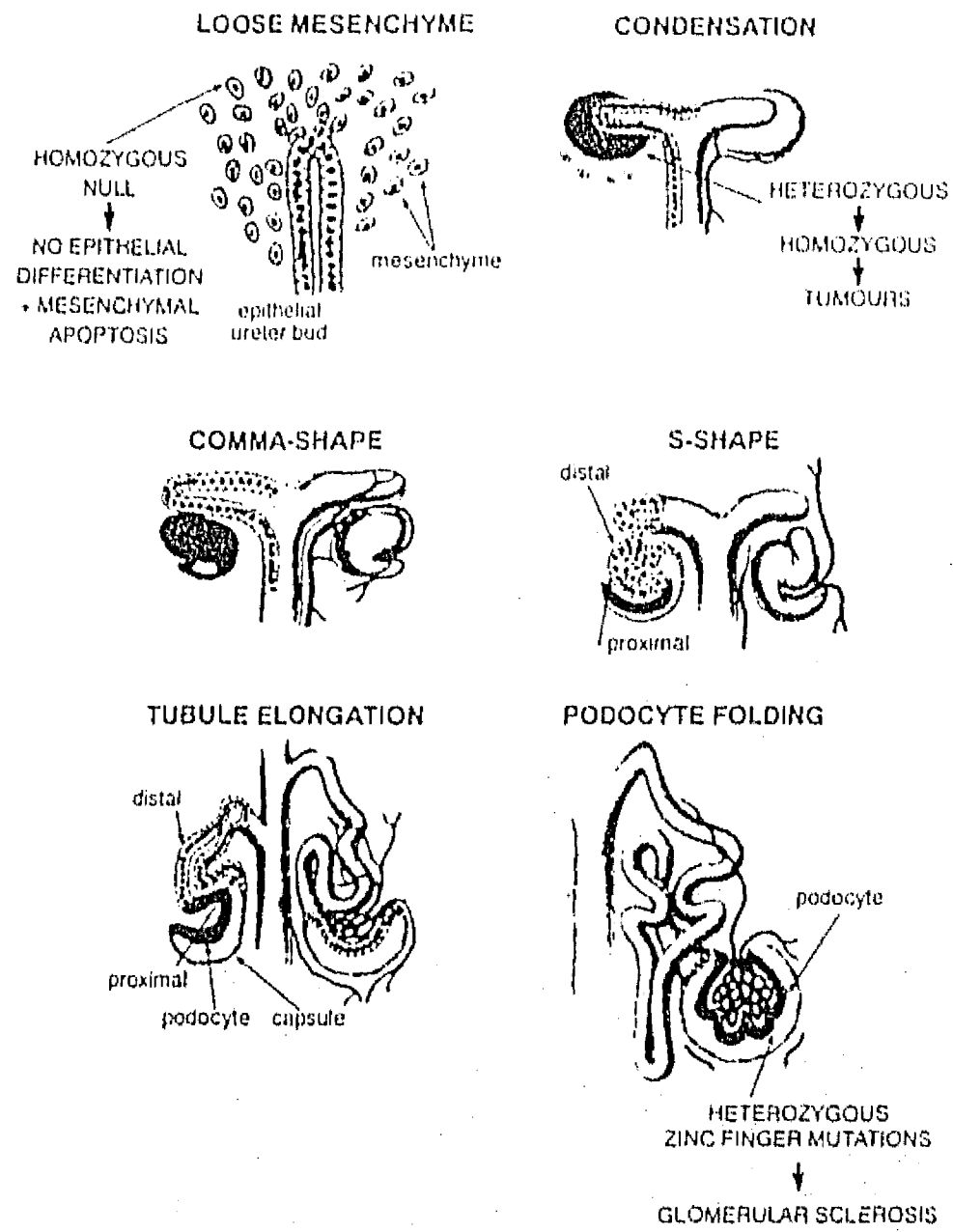


Figura # 5. Esquema mostrando los tres diferentes niveles durante la formación del riñón en vertebrados, en donde es posible la introducción de una mutación en *Wt1*.

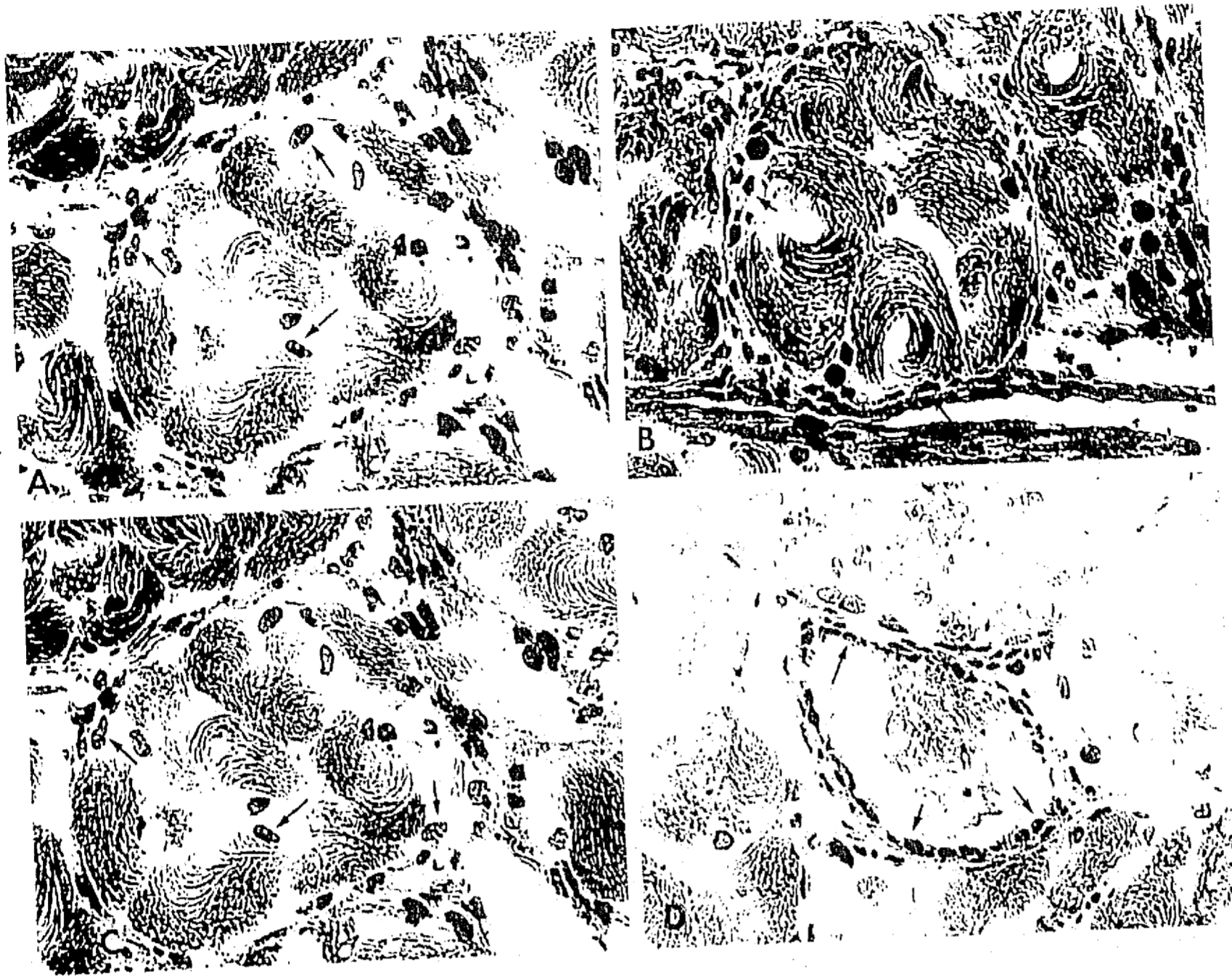


Figura # 6. Sección a través de un testículo de *Amblystoma mexicanum* en donde se puede observar que las células de Sertoli (flechas) migran hacia el periferio de los lóbulos, en preparación para la deslojación de los espermatozoides.

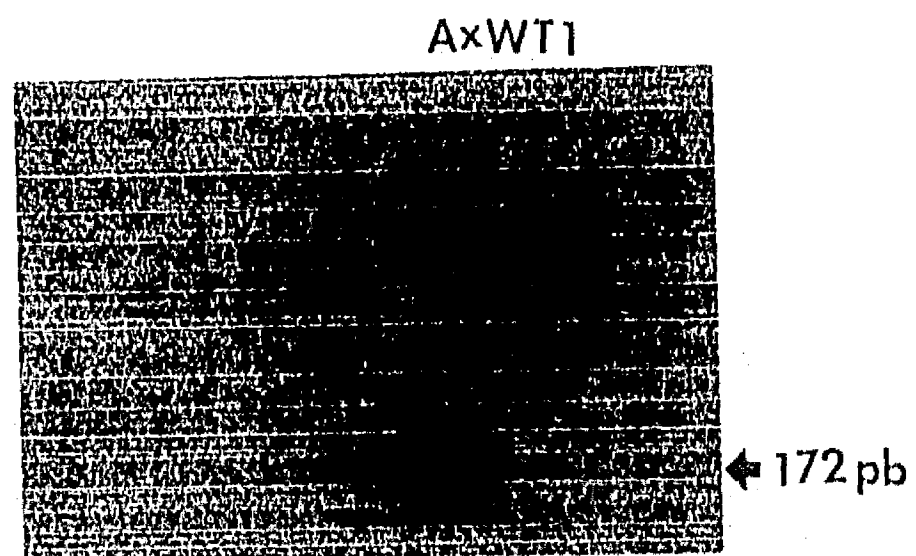


Figura # 7. Southern Blot de un RTFPCR en donde se amplificaron secuencias de WT1 de los ovarios de ajolotes silvestres. El producto del RTFPCR produce una banda de 172 pb.

Figura # 8. Hibridación *in situ* mostrando la expresión de WT1 en los riñones del ajolote silvestre (A-D) y en los riñones del ajolote mutante "Short toes" (E-H). Las flechas muestran las regiones de expresión que corresponden a glomérulos.



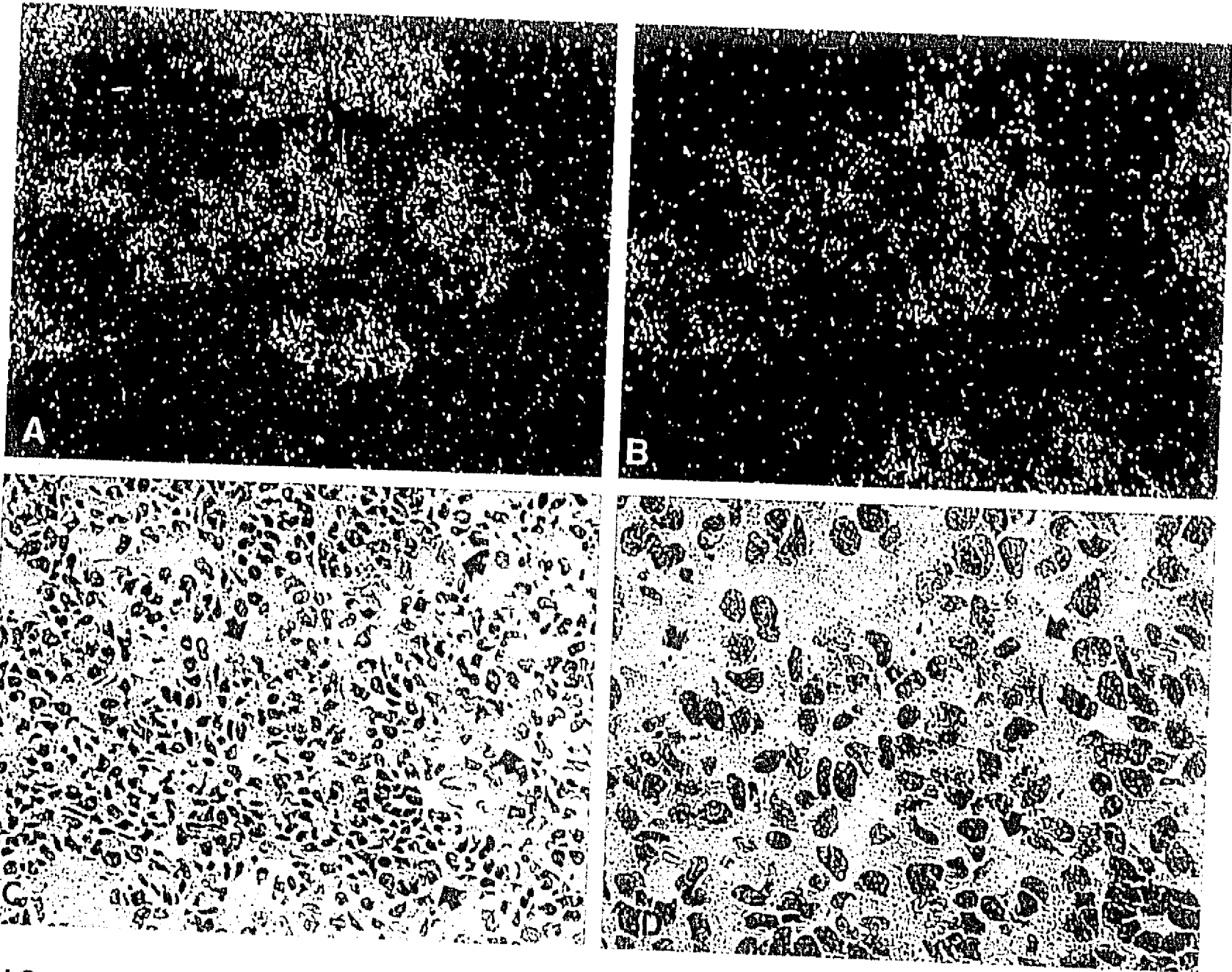
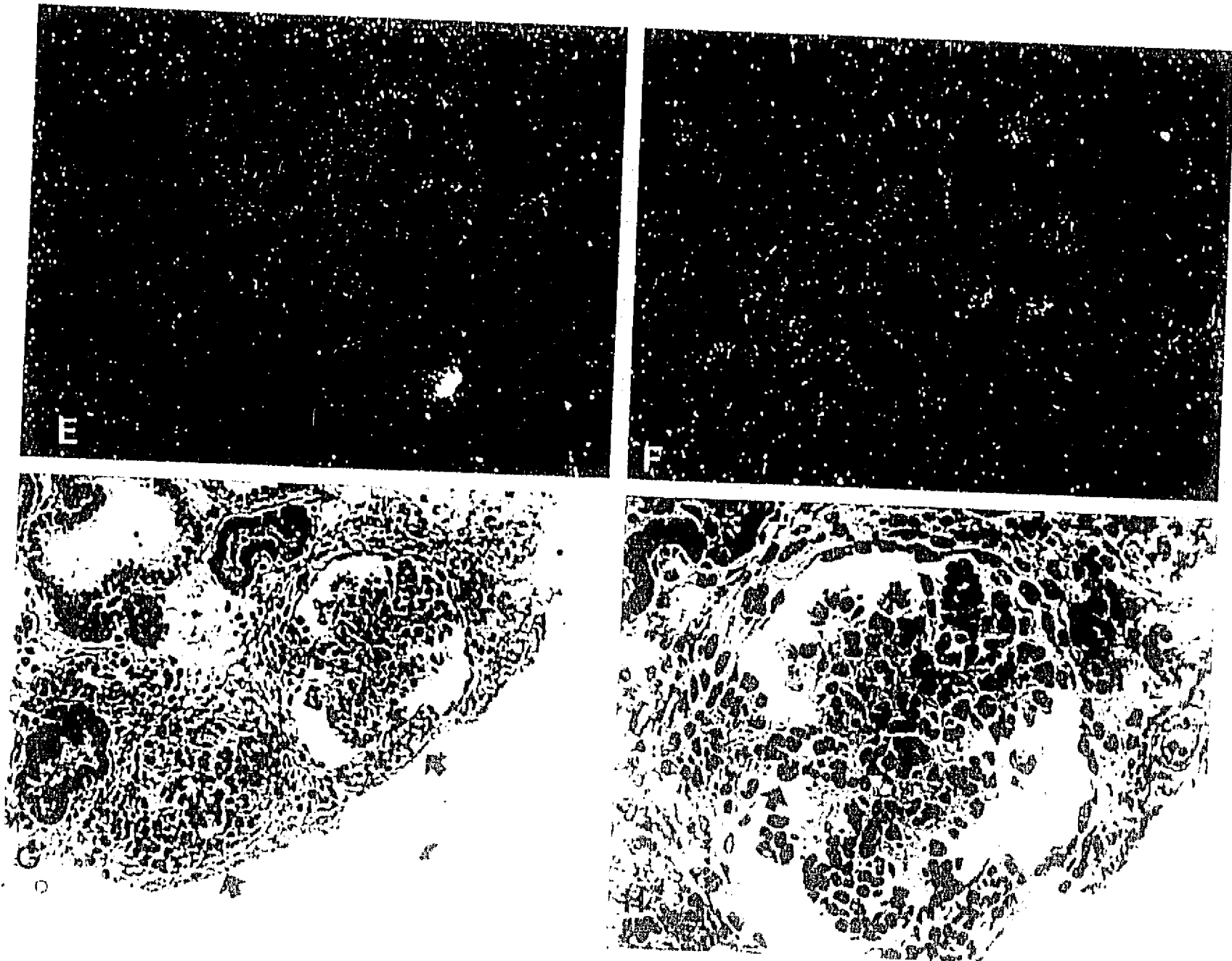


FIG 8



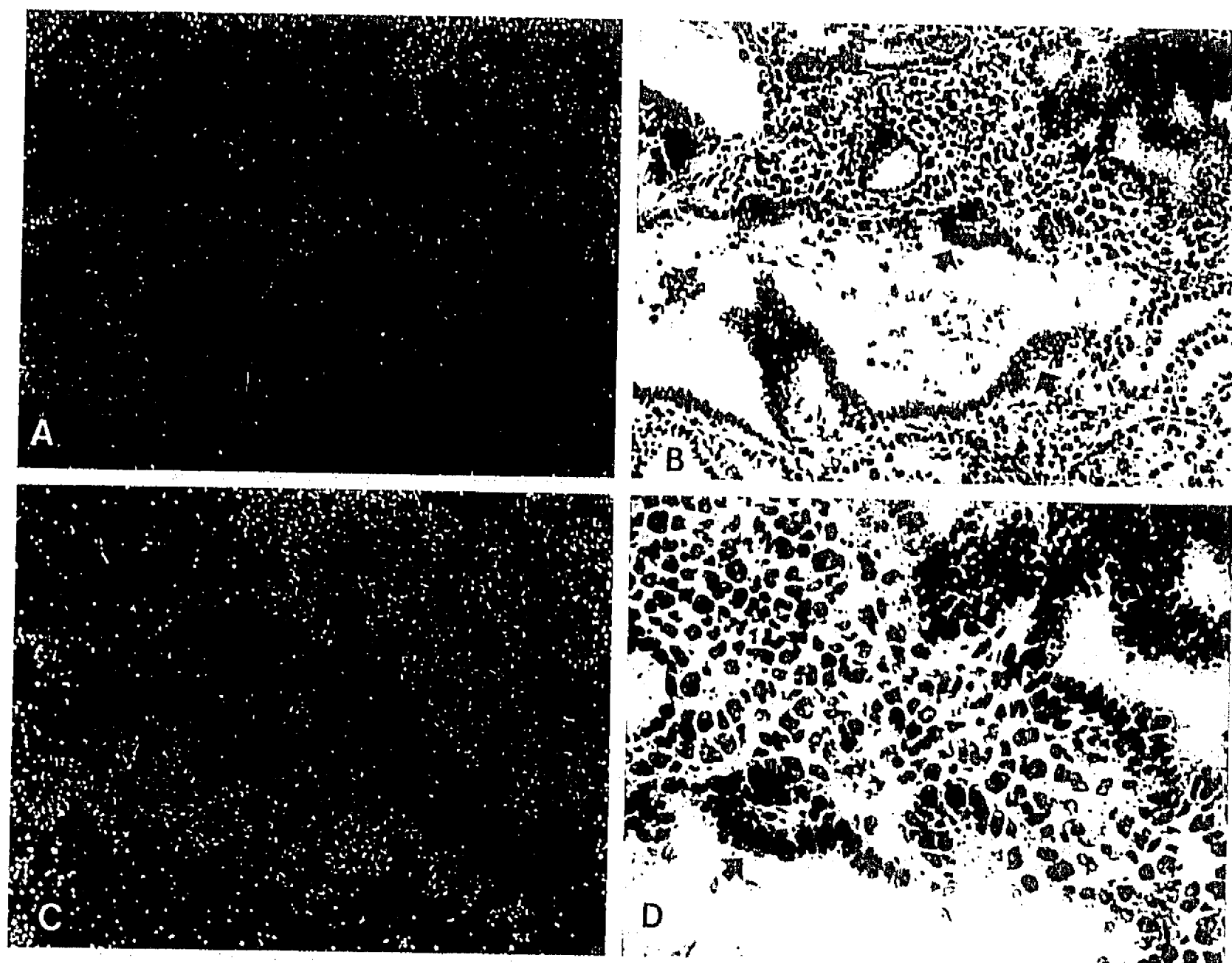


Figura # 9. Hibridación in situ mostrando la expresión de WT1 en las regiones anormales de los riñones del ajolote mutante "Short toes". Las flechas muestran las células que expresan WT1.

Figura # 10. Inmunofluorescencia mostrando la presencia del producto de WT1 en los riñones de los ajolotes silvestres (A,C,E,G), y en los riñones de los ajolotes mutantes "Short toes" (B,D,F,H). Las flechas representan las células podocitas del glomérulo que contienen WT1.

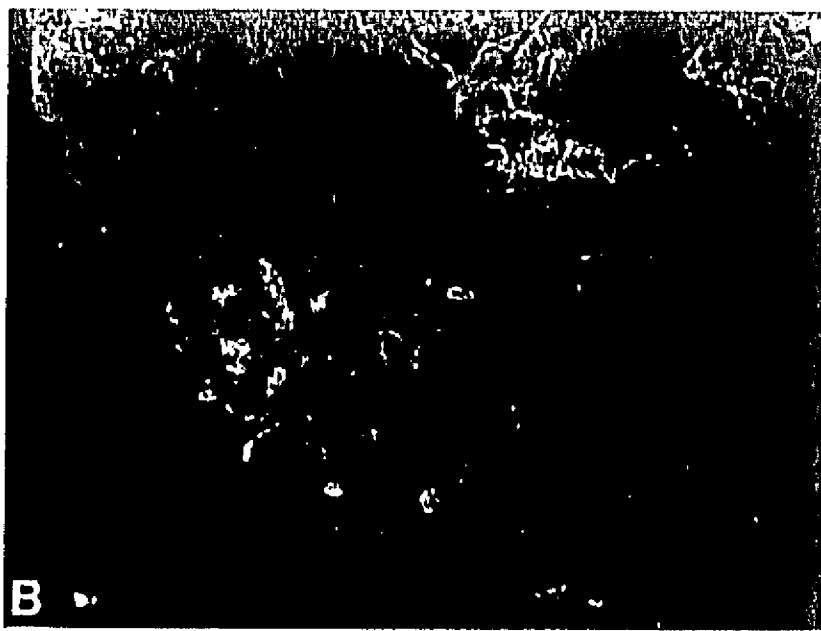
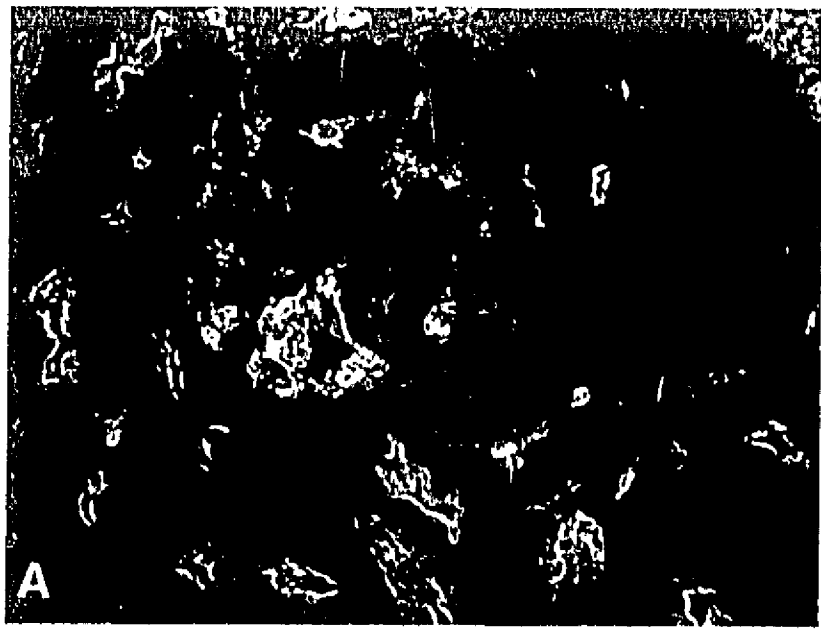


FIG 10

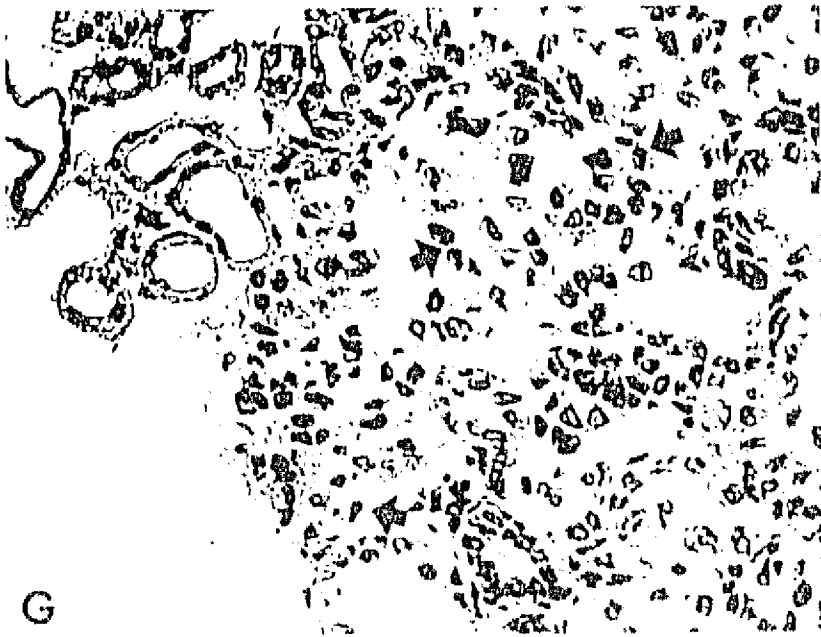
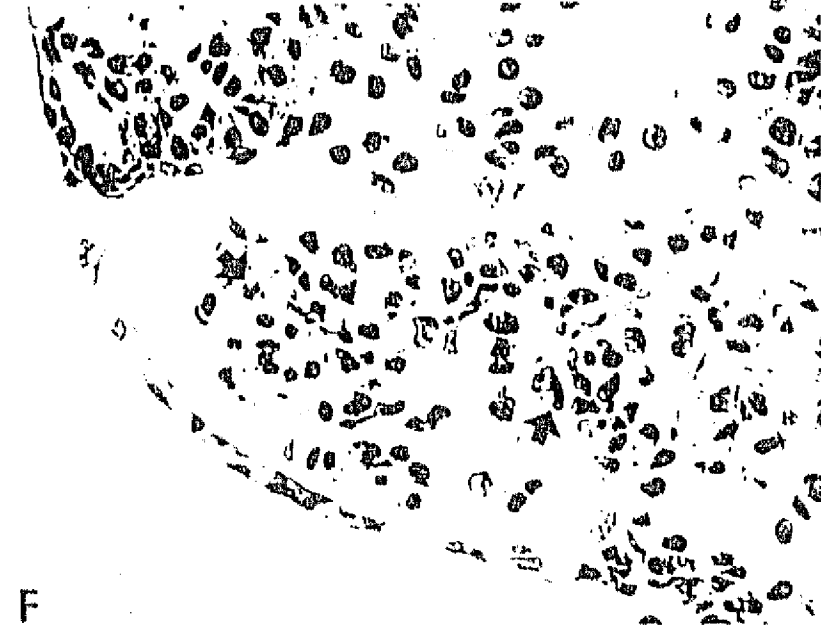
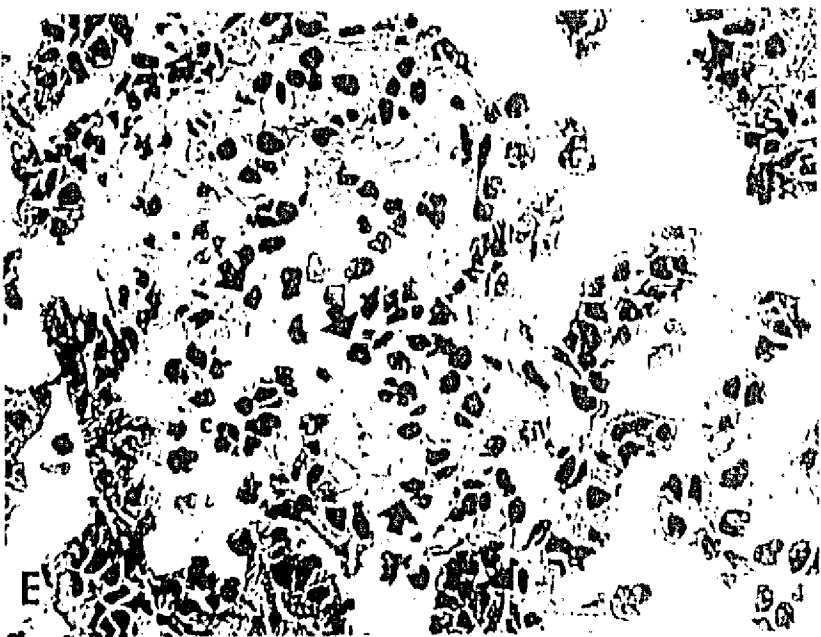


Figura # 11. Inmunofluorescencia mostrando la presencia del producto de WT1 en los riñones del ajolote mutante "Short toes", comparado con la expresión de WT1 en regiones parecidas (secciones consecutivas). Las flechas representan las células del tejido desorganizado que semejan a las células podocitas por su patrón de tinción y que contienen el producto (D,H) o el mensajero (A,E) de WT1. Las secciones fueron teñidas posteriormente con Gomori's Trichome (C,G), o con Hematoxilina-eosina (B,F).

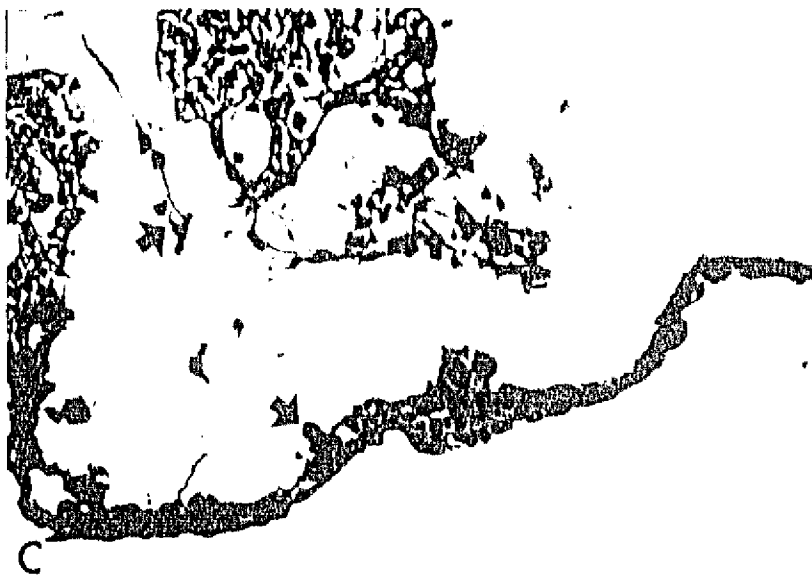
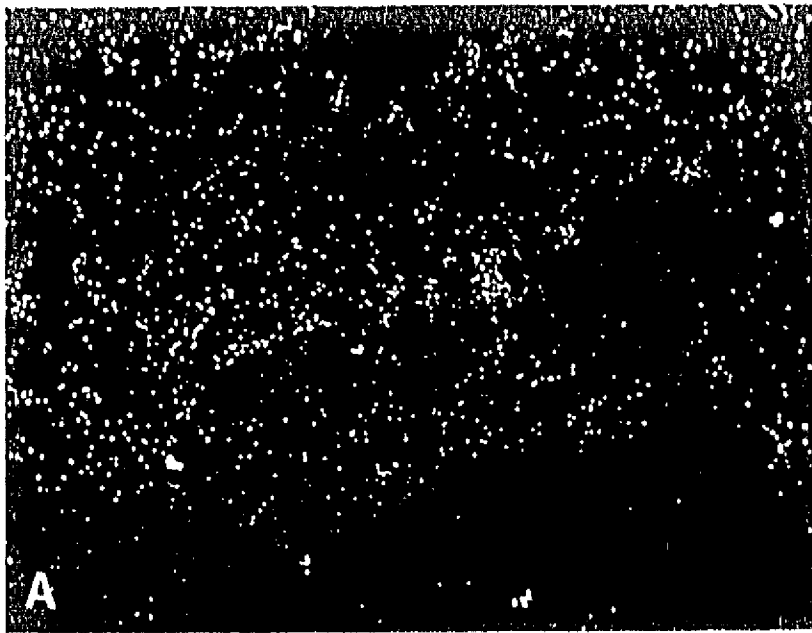


FIG 11

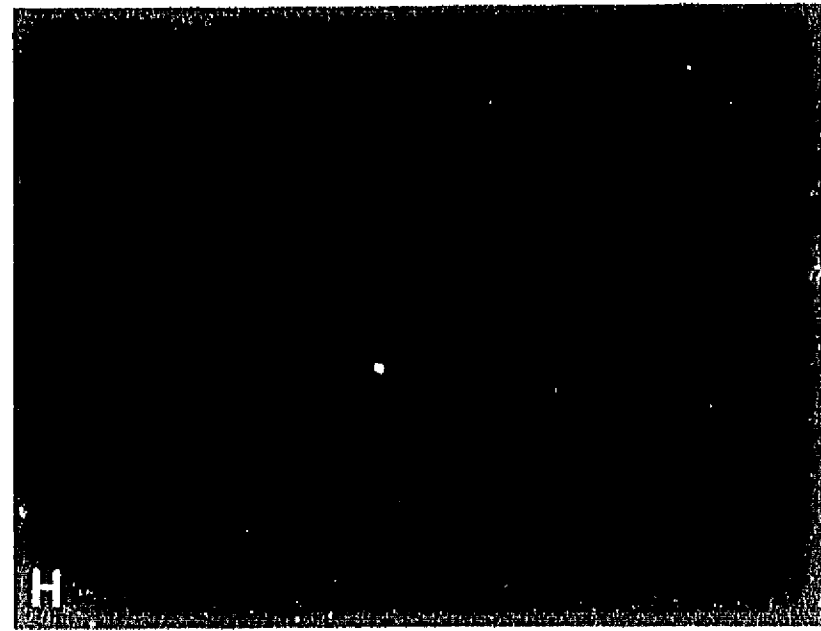
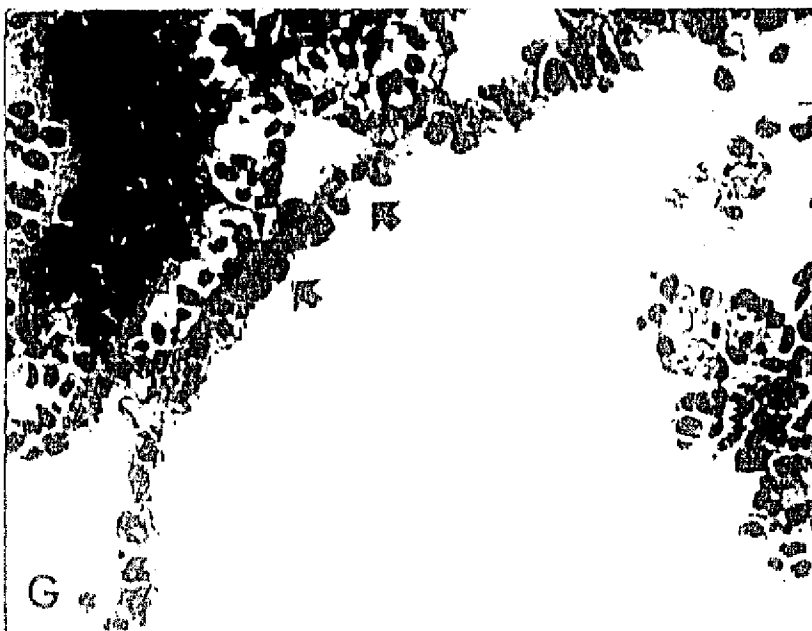
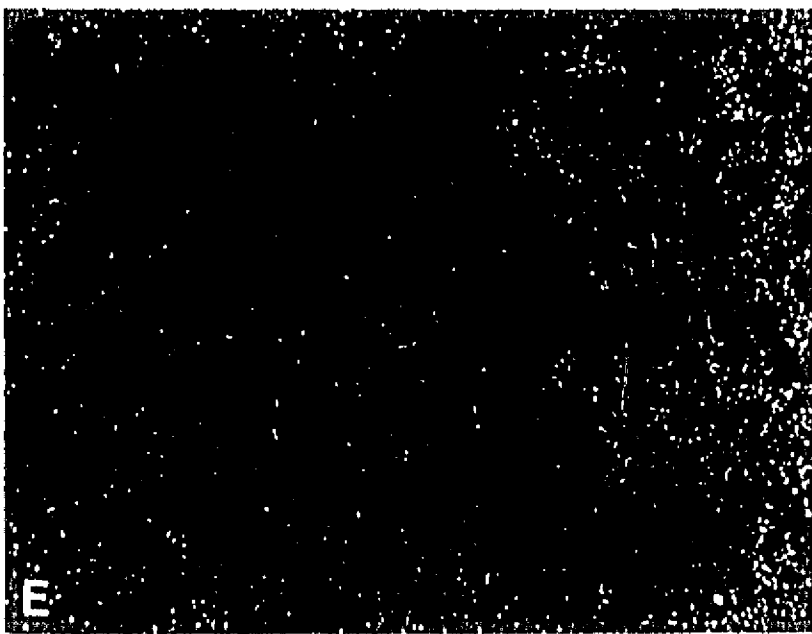
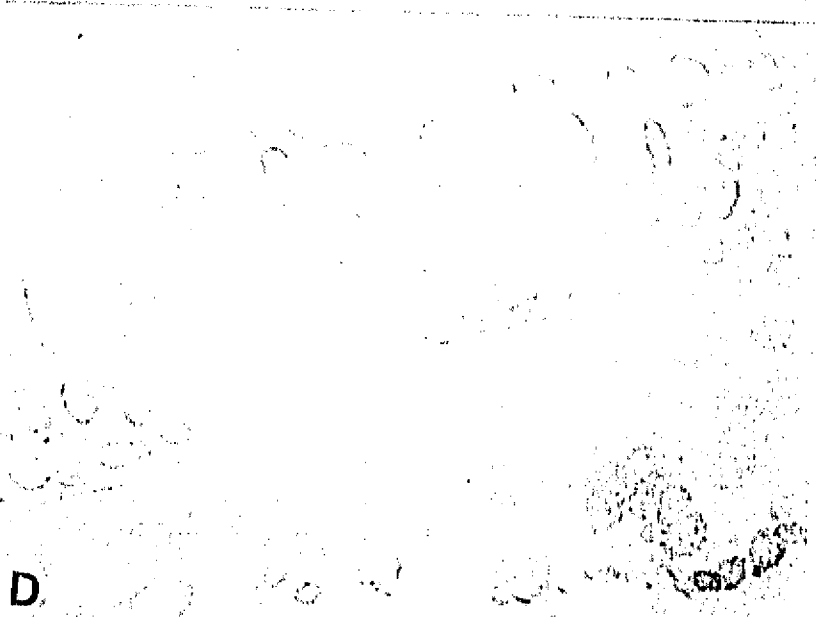
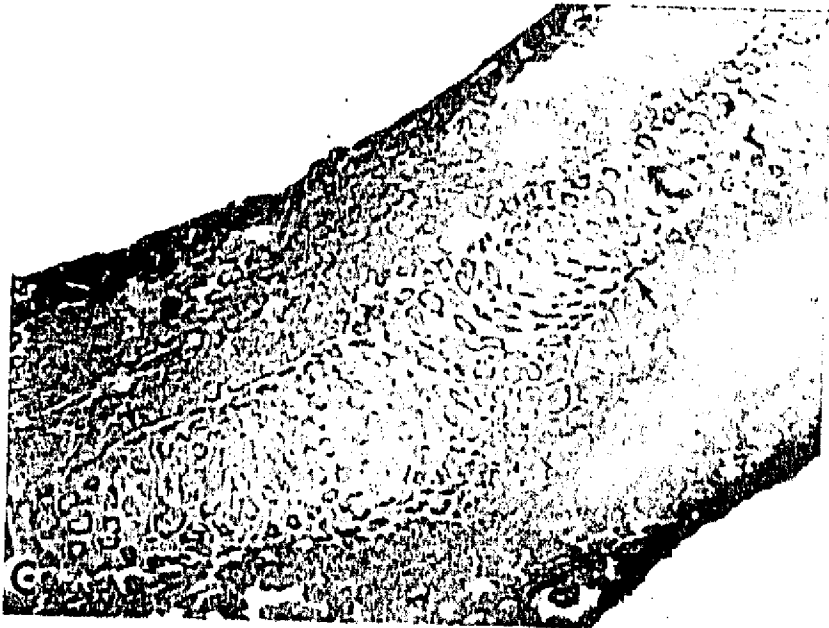
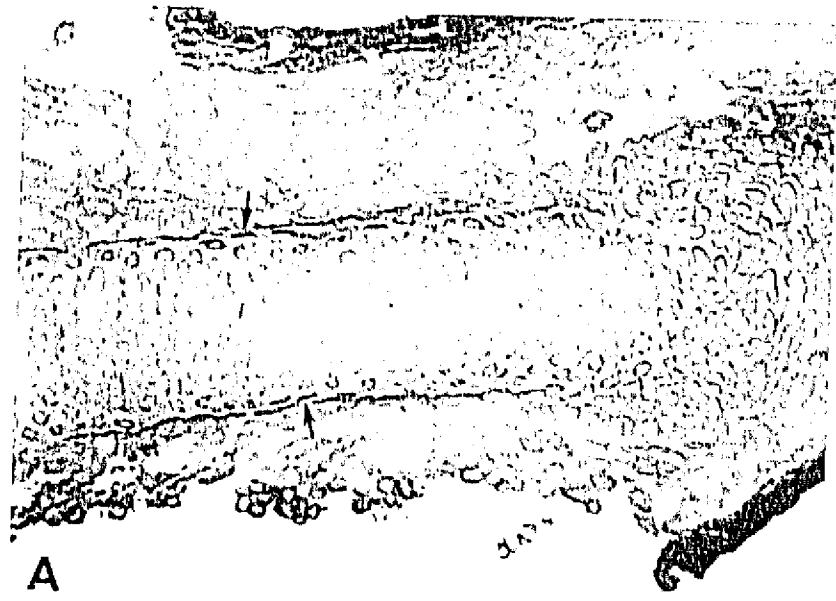
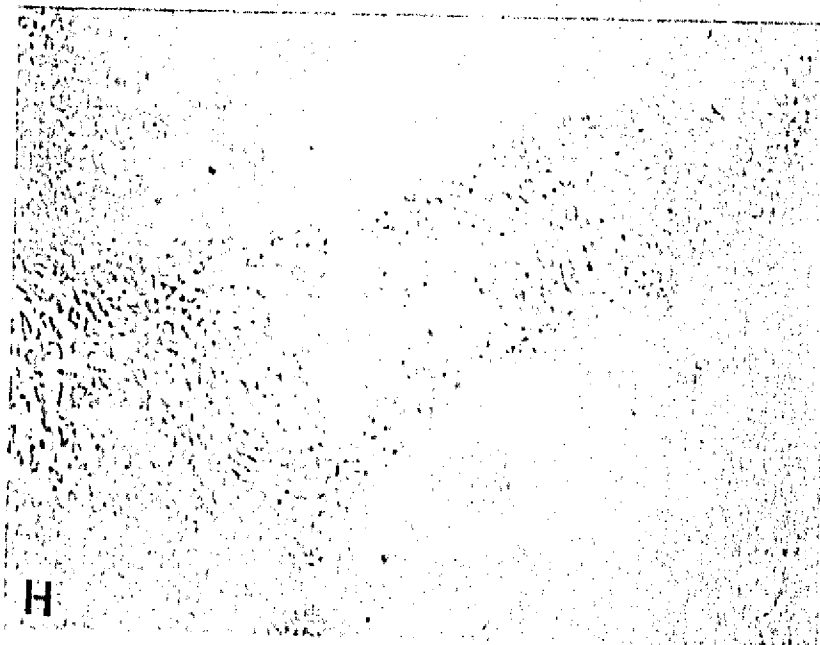
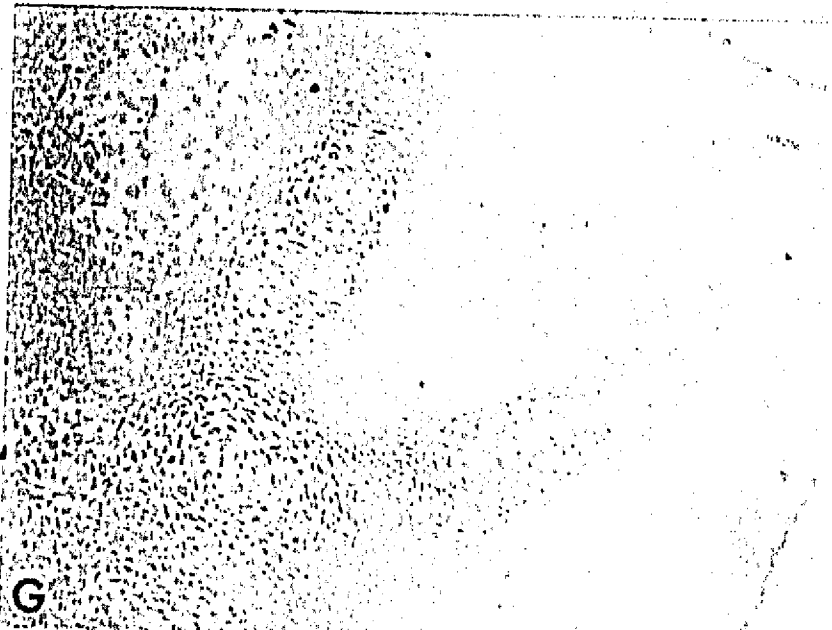
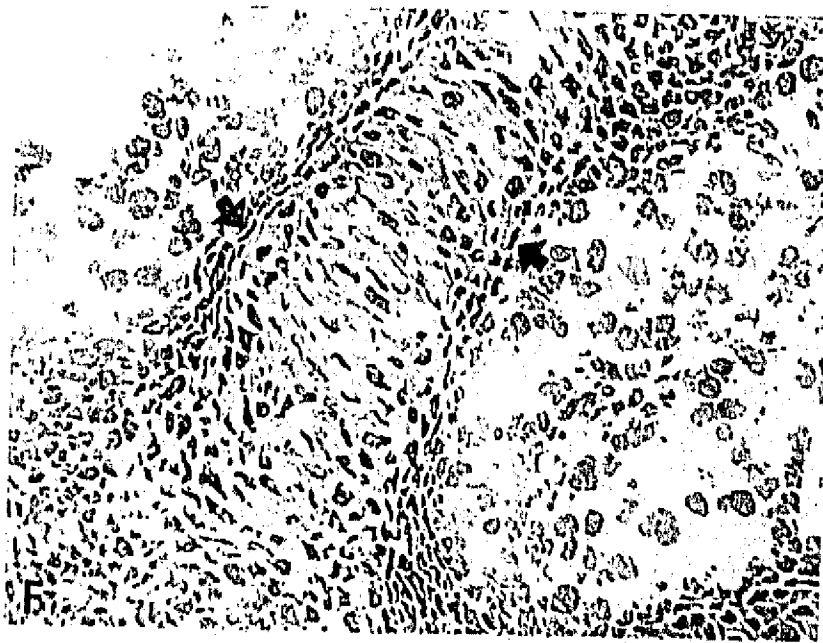
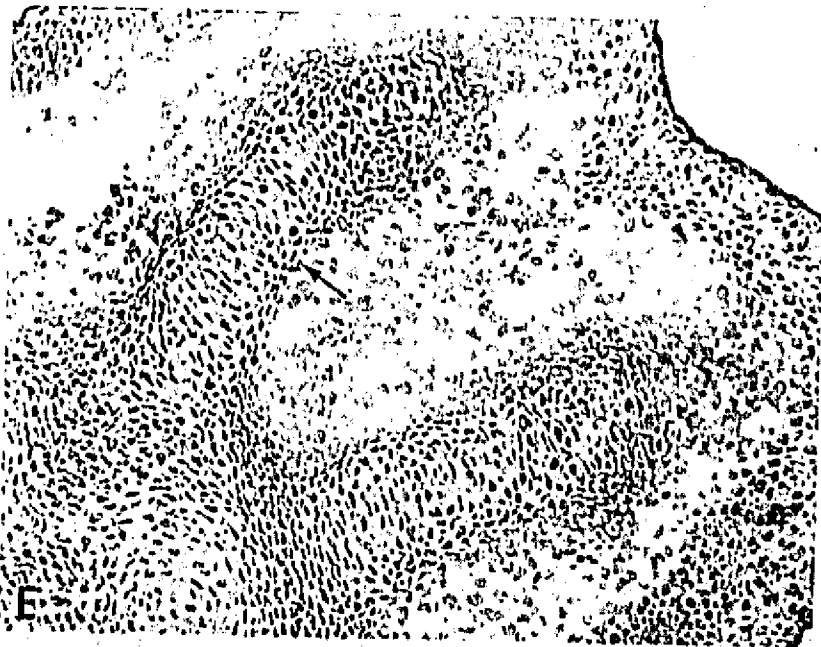


Figura # 12. Inmunodetección utilizando la técnica de peroxidasa, en donde se muestra la presencia de WT1 durante el proceso del desarrollo (A-D) y regeneración (E-H) de los miembros del ajolote silvestre. Las flechas muestran las células del pericondrium y condroblastos que contienen WT1. D, G, y H representan controles negativos.



D

FIG 12





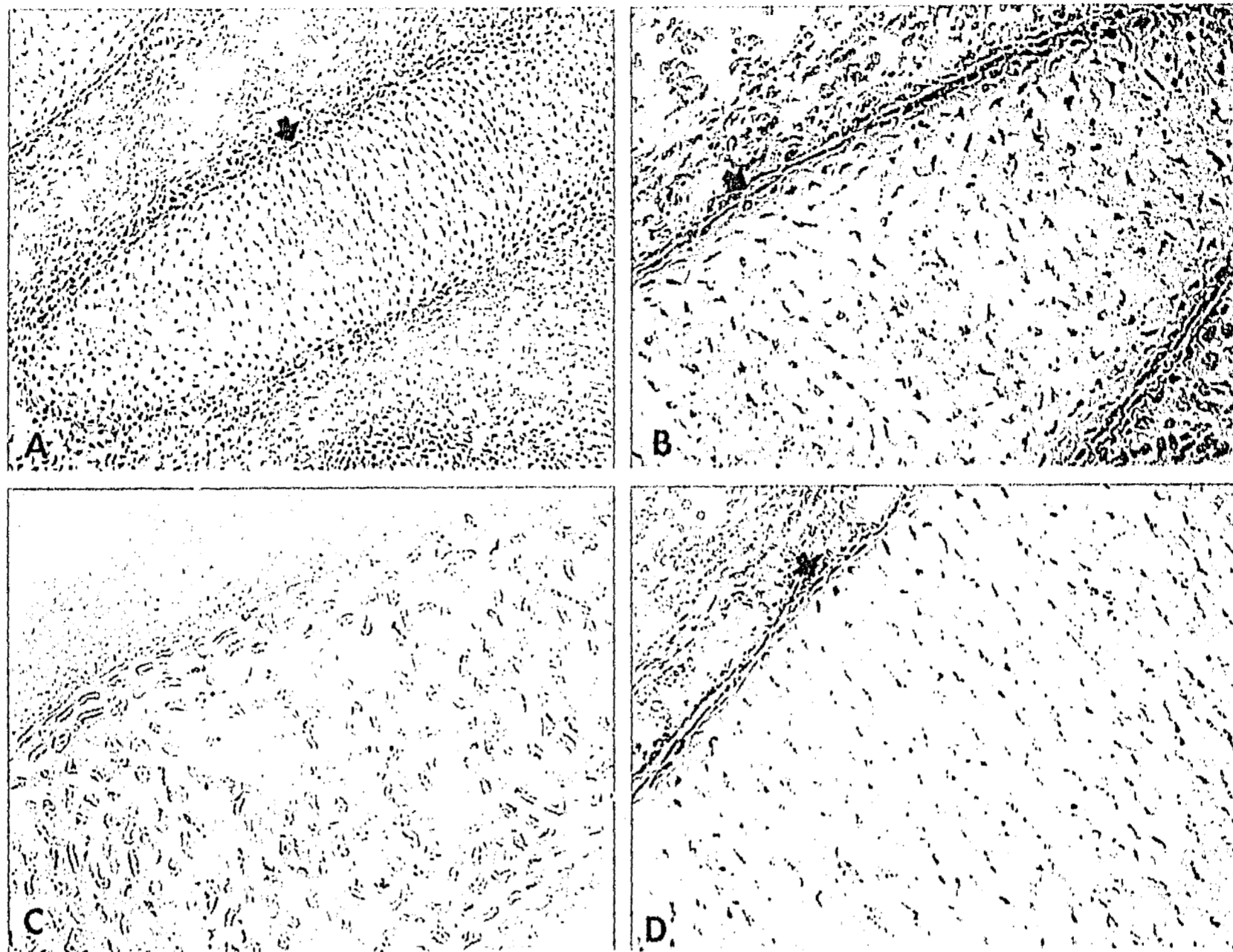


Figura # 13. Inmunodetección utilizando la técnica de peroxidasa en donde se muestra la presencia de WT1 durante el proceso del desarrollo de los miembros de gallina (día embrionario 27). Las flechas muestran las células del pericondrium y condroblastos que contienen WT1. C representa un control negativo.

APENDICE

## Regulation of the Wilms' Tumor Gene During Spermatogenesis

KATIA DEL RIO-TSONIS, LUIS COVARRUBIAS, JILL KENT, NICHOLAS D. HASTIE, AND PANAGIOTIS A. TSONIS

*Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, APDO. POSTAL 510-3 Cuernavaca, Morelos, 62271 México (K.D.R.-T., L.C.); Medical Research Council Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburg EH4 2XU, Scotland, United Kingdom (J.K., N.D.H.); Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology, University of Dayton, Dayton, Ohio 45469-2320 (K.D.R.-T., P.A.T.)*

**ABSTRACT** Spermatogenesis is the process by which male germ cells develop and mature, a pathway that includes a transition from a mitotic to a meiotic cell cycle. Throughout this pathway, the germ cells are in close contact with their nurturing cells, the Sertoli cells. Sertoli-germ cell interactions are difficult to study in mammals due to the complex cellular organization of their seminiferous tubules. The urodele amphibian testis, however, provides a unique system to study the process of germ cell maturation; it is organized in a gradient-like cystic structure, in which synchronized germ cells can be found within the same cyst. The Wilms' tumor gene (WT1) has been shown to be an essential gene for the formation of the gonads in mice, and it has been implicated in a variety of differentiation processes. The WT1 gene is thus a good candidate for the study of the differentiation processes involved in the maturation of the male germ cells. By using a probe for the urodele WT1 homologue in *in situ* hybridization studies, as well as an antibody against the WT1 protein in immunohistochemistry studies, we determined that WT1 gene expression in Sertoli cells depends on the stage of maturation of the associated germ cell. Thus, WT1 mRNA was detected only in Sertoli cells of cysts that contained early spermatogonia. No mRNA expression was observed in cysts containing late spermatogonia, germ cells undergoing meiosis, or germ cells going through spermiogenesis. Immunohistochemistry studies confirmed that WT1 protein was strongly expressed in Sertoli cells associated with early spermatogonia but not in late ones. The protein was also found in Sertoli cells associated with germ cells that undergo the subsequent stages of meiosis and spermiogenesis. These results suggest that WT1 could be involved in the regulation by Sertoli cells of germ cell maturation and possibly in the progression from a mitotic to a meiotic cell cycle.

© 1996 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** Wilms' tumor, Spermatogenesis, Sertoli cells, Germ cell differentiation

© 1996 WILEY-LISS, INC.

### INTRODUCTION

Spermatogenesis is a continuous differentiation process by which spermatogonia undergo a series of mitotic events before they enter their meiotic cycle. Primary spermatocytes become secondary spermatocytes after the first meiotic division, and the latter become spermatids after the second meiotic event. Finally, spermatids enter the process of spermiogenesis to differentiate into mature spermatozoa. All these events are closely regulated by hormones and paracrine factors released during somatic cell—germ cell interactions (Bardin et al., 1994). One of these somatic cell types is the nurturing Sertoli cell, which is closely associated with germ cells within the germinal epithelium. In the mammalian testis, it is difficult to assess the exact contribution that Sertoli cells provide to each stage of germ cell differentiation because, within a seminiferous tubule, one single Sertoli cell can be associated with germ cells at different stages of development (Grier, 1993; Sharpe, 1994).

The urodele testis provides an excellent system to dissect germ cell—somatic cell interactions during the maturation process of spermatogenesis. The structure of the urodele testis is quite unique because cysts are organized within lobules (equivalent to the seminiferous tubule in mammals). These lobules provide physical separation between interstitium and the germ cell compartment. Cysts will always contain synchronized germ cells, so the interaction between Sertoli cells and germ cells can be more easily studied (Lazard, 1974, 1979; Lofts, 1984; Grier, 1993; Pudney, 1993). In a young, sexually mature axolotl (*Amblystoma mexicanum*), five zones can be identified in the testis: a zone of gonial division, a zone of meiosis, a spermatid zone, a spermatozoa zone, and a glandular zone composed of interstitial cells enclosing nests of germ cells and Sertoli cells. This glandular zone eventually gives rise to the new sets of cysts and lobules (Lazard, 1974, 1976, 1979). In many urodele amphibians, each lobule drains during spermiation via a short efferent tube into a

Received April 29, 1996; accepted July 3, 1996.

Address reprint requests/correspondence to Katia Del Rio-Tsonis, Laboratory of Molecular Biology, Department of Biology, University of Dayton, Dayton, Ohio 45469-2320.

AXOLOTL WT1 (AxWT1)

AAG TTG TCC CAT TTG CAG ATG CAC GGC CGA AAG CAC ACA GGT GAA	45
K L S H L Q M <u>H</u> G R K <u>H</u> T G E	
AAG CCG TAC CAG TGT GAT TTT AAG GAT TGT GAG CGG CGA TTT TCC	90
K P Y Q <u>C</u> D F K D <u>C</u> E R R F S	
CGT TCC GAC CAA CTC AAA AGA CAT CAA AGA AGA CAC ACA GGT GTG	135
R S D Q L K R <u>H</u> Q R R <u>H</u> T G V	
AAA CCA TTC CAA TGT AAA ACC TGT CAG AGA AAG TTC TCT CGA TCT	180
K P F Q <u>C</u> K T <u>C</u> Q R K F S R S	
GAT CAT TTG AAG ACC CAC ACC AGG ACT CAT ACA GGT	216
D H L K T H T R T H T G	

Fig. 1. Sequence of AxWT1. Amino acids in boldface and underscored represent the zinc binding ligands.

large collecting duct that connects with the vas efferentia (Lofts, 1984). This compartmentalization provides an opportunity to discern, at a molecular and cellular level, what role(s) Sertoli cells might play in the process of germ cell maturation.

A key gene in the development of the gonads is the Wilms' tumor gene (WT1). This gene has been found to be required for the formation of the urogenital system in mouse; a targeted mutation in the mouse WT1 gene resulted in failure of gonad and kidney development (Kreidberg et al., 1993). In addition, expression studies have shown that WT1 is normally present in these tissues. WT1 has been observed to be expressed in the genital ridge of 9.5-10 days postcoitus (dpc) embryos, exactly when the gonad begins to form. Later, as the gonad develops, the expression is confined to the epithelial cells of the sex cords of both male and female gonads as well as to the tunica albuginea and the developing rete testis in the male. In the mouse fetus, the expression in the tunica albuginea disappears, but the expression in the seminiferous cords (which are by now tubules) and the rete testis continues (Armstrong et al., 1992). The cells that express the WT1 gene in the mouse and human seminiferous tubules have been determined to be Sertoli cells (Pelletier et al 1991; Armstrong et al., 1992; Mundlos et al., 1993). Even though expression of the WT1 gene has been observed in Sertoli cells of the developing as well as the maturing testis, no function has been attributed to the expression of the WT1 gene in such cells.

In the current study, we decided to use the urodele testis as a model to study the expression of WT1 and its function. In situ hybridizations and immunohistochemistry studies were performed to determine the pattern of expression of WT1 during the process of spermatogenesis in the axolotl. Our results show that WT1 is regulated through this process, constituting the first evidence of such expression pattern in the vertebrate testis.

## RESULTS

### Cloning

To perform Wilms' tumor gene expression studies in the axolotl testis, we cloned a partial WT1 cDNA fragment from the mexican axolotl, *Amblystoma mexicanum* (Fig. 1). This was performed via reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), using degenerate primers directed to flanking sequences of the zinc finger region, which is highly conserved throughout species (Kent et al., 1995). A 216 bp partial cDNA clone containing zinc fingers 2 and 3 was found to be 84% identical at the DNA level and 97% identical at the amino acid level to the human WT1. Comparisons of WT1 from different species also showed significant homology (Table 1).

### Description of Testis Cell Types

It is easy to distinguish primary spermatogonia and early secondary spermatogonia from late spermatogonia by staining with hematoxylin-eosin or van Gieson's stain. With these stains, the early germ cells appear light pink, are quite large, and are oval, whereas the associated Sertoli cells are dark pink to dark purple (depending on the technique used prior to counterstaining) and their nuclei are of irregular, sometimes crescent shape. More mature spermatogonia still stain pink but not as light as primary spermatogonia, and as these cells divide they become smaller in size. Their accompanying Sertoli cells still show the same staining pattern (Fig. 2B,D; see also Miltner and Armstrong, 1983). Spermatocytes, which are the cells that have entered meiosis, are smaller and stain light purple. Sertoli cell nucleoli are rarely detected in these cysts (our observations; Lazard, 1976; see also Fig. 5E). During spermiogenesis, spermatids are quite small, and in later stages they elongate to mature finally into spermatozoa, which are easily distinguished by the presence of a head and a flagellum.

TABLE 1. Comparisons of WT1 Sequence at the Nucleotide and Amino Acid Level

	Percentage identity with AxWT1	
	DNA	Protein
Human WT1	84	97
Mouse WT1	84	98
Rat WT1	84	98
Chicken WT1	87	98
Alligator WT1	89	98
<i>Xenopus</i> WT1	85	97

By this stage, the Sertoli cells have hypertrophied and have lost some of their dark purple staining (Figs. 3D, 5G). Duct cells are present between lobules independently of the stage of germ cell maturation. The so-called regenerating cysts are also found between lobules or cysts, and they consist of a primary spermatogonia engulfed by Sertoli cells. The morphology of duct cells and Sertoli cells from regenerating cysts is very similar (Figs. 3B,D, 5F). A representation of glandular tissue in which nests of Sertoli cells and germ cells can be distinguished from the interstitial cells/Leydig cells, and in which more mature spermatogonia already exist, is shown in Figure 4C-F.

#### Expression of WT1 Gene

In *in situ* hybridization studies, WT1 mRNA was found in Sertoli cells of the axolotl testis, but only in those associated with early spermatogonia. As is shown in Figure 2A,B, there is strong expression of WT1 gene in the Sertoli cells (Fig. 2, arrows) surrounding an early spermatogonial cyst. In an adjacent cyst containing late spermatogonia, WT1 mRNA was not detected in the associated Sertoli cell (Fig. 2A,B, arrowhead). Figure 2C,D shows a comparison between the expression of WT1 gene by Sertoli cells in an early spermatogonial cyst (Fig. 2C,D, number 1) and its expression in two other, later spermatogonial cysts (Fig. 2C,D, numbers 2 and 3). As the germ cells mature, during the last mitotic divisions, meiosis and spermiogenesis, no WT1 gene expression is observed in the associated Sertoli cells (Figs. 2, 3).

Expression of the WT1 gene was also detected in the duct cells and in regenerating cysts. In Figure 3A,B, WT1 was expressed in the duct cells that exist between spermatocyte cysts and in at least two regenerating cysts being formed at the edges of existing lobules. In Figure 3C,D, WT1 could again be seen in duct cells and the continuous regenerating cyst present in the middle of spermatozoa cysts. Note here that the hypertrophied Sertoli cells (Fig. 3D, large arrowheads), as well as the lobule boundary cells/Leydig cells (Fig. 3C,D, large arrow), were negative. The lobule boundary cells/Leydig cells were negative throughout (see also Fig. 3A,B). Germ cells were also negative for WT1 expression, though the mature sperm produce the same nonspecific staining pattern as the sense control (not shown).

#### Presence of WT1 Protein

To corroborate the results obtained via *in situ* hybridization, we performed immunohistochemistry studies using a polyclonal antibody capable of recognizing the terminal amino acids of the human WT1 protein. In the *in situ* hybridization studies, the protein was also produced by Sertoli cells associated with early spermatogonia, regenerating cysts, and duct cells, but it was not produced by Sertoli cells associated with late spermatogonia. In Figure 4A,B, it is possible to see that WT1 protein was present in Sertoli cells associated with early spermatogonia (Fig. 4A, solid arrow) and not in Sertoli cells associated with later spermatogonial cysts (Fig. 4, arrowheads). Here, the interstitial/Leydig cells were clearly negative for the WT1 protein. As is shown in Figure 5B,F, duct cells and regenerating cysts were positive for the WT1 gene product. Sertoli cells associated with spermatocytes, spermatids, and spermatozoa were also positive; however, the signal seemed to be weaker [compare staining of Sertoli cells in regenerating cyst and the Sertoli cells associated with spermatids and spermatozoa (Fig. 5B,F) and the Sertoli cells associated with spermatocytes (Fig. 5A,E)]. Lobules that have released spermatozoa were also positively stained at the periphery, showing cells in the interior positive, whereas surrounding cells outside the lobule (lobule boundary cells/Leydig cells) were clearly negative. Note also the duct cells that are continuous with the emptied lobules are likewise positive for WT1 (Fig. 5D,H). Lobule boundary cells were negative throughout spermatogenesis (Fig. 5A-H).

In summary, these results show a regulation of the WT1 mRNA and protein throughout spermatogenesis. The WT1 mRNA and its product are first strongly detected in Sertoli cells associated with early spermatogonia. Then, the production of WT1 is turned off as spermatogonia mature. During meiosis and spermiogenesis, the WT1 mRNA is undetectable in *in situ* hybridization, although the protein is present.

#### DISCUSSION

The fact that WT1 was found to be expressed by Sertoli cells in the axolotl testis is consistent with what has been previously described for mice and humans (Pelletier et al., 1991; Armstrong et al., 1992; Mundlos et al., 1993). In adult mammals, the cellular associations within the tubules are so complex that it is very difficult to determine which Sertoli cell is associated with what stage of germ cell differentiation. It is quite clear in the axolotl, that, for example, within one region of the testis, essentially all cysts are at the same developmental stage, and the Sertoli cells within a cyst are associated with germ cells at the same maturation stage. (Lazard, 1974, 1979; Miltner and Armstrong, 1983).

Within the different zones mentioned for the axolotl testis, WT1 mRNA was observed only in early spermatogonial cysts, duct cells, and regenerating cysts,

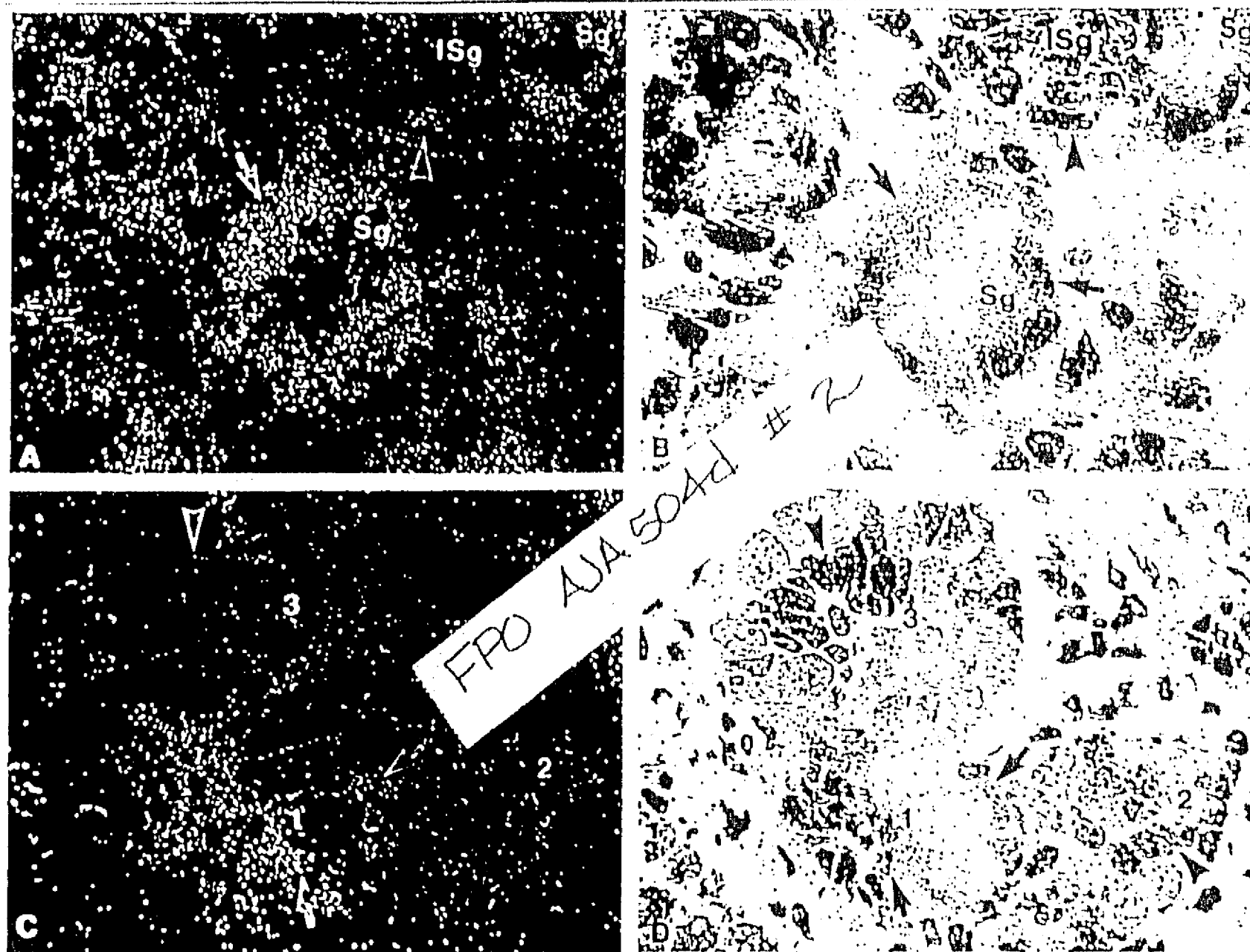


Fig. 2. Expression of AxWT1 in early spermatogonial cysts. A and C are darkfield views, and B and D are brightfield views. A and B show an early spermatogonial cyst (Sg) in which the surrounding Sertoli cells (arrows) are clearly positive for WT1 expression. In an adjacent late spermatogonial cyst (lSg), a Sertoli cell negative for WT1 expression can be

seen (arrowheads). In C and D, three spermatogonial cysts can be seen: 1 is an early spermatogonial cyst, where the surrounding Sertoli cells are positive for WT1 expression (arrows); 2 and 3 are later stages of spermatogonial cysts, where WT1 expression in the associated Sertoli cells has diminished or disappeared (arrowheads).

which consist of a primary spermatogonia surrounded by Sertoli cells (Lazard, 1974, 1976, 1979; Grier, 1993). These newly regenerating cysts seemed to be present throughout the different zones of the axolotl testis (Figs. 3B,D, 5F). It has been described for other urodeles, such as *Taricha granulosa*, *Necturus maculosus*, and *Triturus moratus*, that duct cells and Sertoli cells have identical staining characteristics and nuclear morphology (Fraile et al., 1990; Grier, 1993). Also, these cells appear to be continuous with Sertoli cells that have associated with a spermatogonia. It is believed that these duct cells, upon encountering a germ cell, engulf it and differentiate into Sertoli cells to form primary spermatogonia or the so-called regenerating cyst. This bipotentiality of duct cells has been described for a variety of organisms, including the Chondrichthys, Teleosts, and Amphibians (Grier, 1993). In our study, we found that these duct cells and regenerating cysts appeared continuous in some instances and were likewise positive for WT1 mRNA and protein. WT1 can now serve as a marker for this differentiation process.

Another interesting observation was that the WT1 gene and protein were expressed in Sertoli cells associated with young spermatogonia but not with late spermatogonia. It seems that, after a few rounds of germ cell divisions, WT1 in the corresponding Sertoli cells becomes dramatically down-regulated or turned off. These results suggest that WT1 might either be acting as a "cell counter," keeping track of germ cell divisions, or be signalling the end of mitosis and the beginning of meiosis. Alternatively, signals from the germ cells to Sertoli cells might affect WT1 expression. It has been shown in other systems that WT1 is down-regulated upon encountering a differentiation event. Such is the case in the induction of differentiation of K562 cells into erythroid and megakaryocytic cells (Phelan et al., 1994) and during myelomonocytic differentiation in HL60 cells (Sekiya et al., 1994). This down-regulation is also observed during embryonic kidney development, when the mesonephric mesenchyme differentiates into epithelial structures of the mature nephron (Pritchard-Jones et al., 1990; Buckler

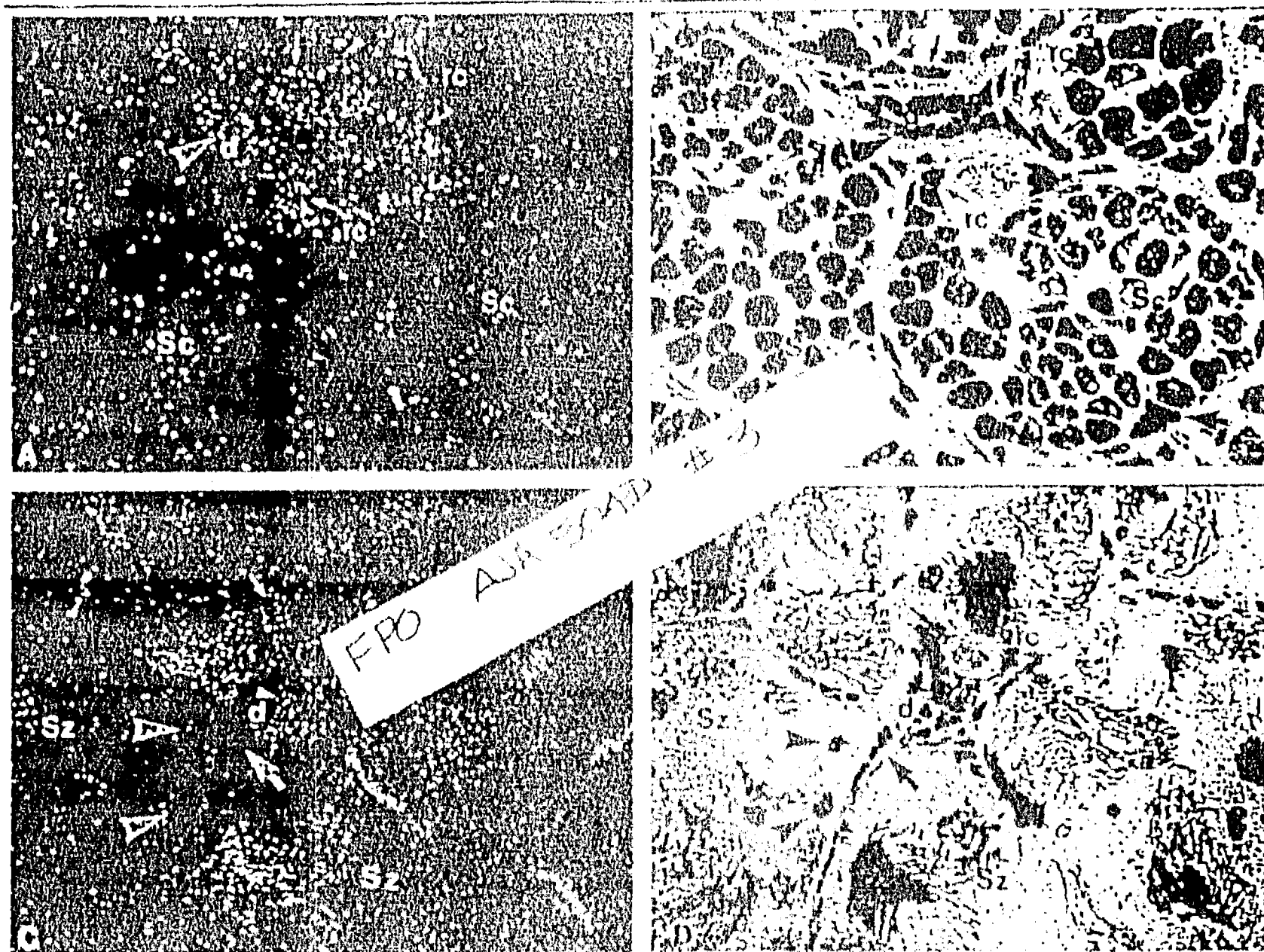


Fig. 3 Expression of AxWT1 in duct cells and regenerating cysts. A and C are darkfield views, and B and D are brightfield views. In A and B, duct cells (d; arrowheads), as well as Sertoli cells associated with regenerating cysts (rc; small arrows) found within a region with spermatocytes, are positive for WT1. Note the negative Sertoli cell associated with spermatozoa (Sc; large arrow). In C and D, WT1 expression is localized in

the duct cells (small arrowhead) and in the Sertoli cells associated with the regenerating cyst (small arrows) within a region with spermatozoa. Hypertrophied Sertoli cells associated with spermatozoa (Sz) are negative for WT1 expression (large arrowheads). Also, lobule boundary cells are negative (large arrow). Note that the sperm produce the same non-specific signal found in the sense control.

et al., 1991; Sharma et al., 1992). In Wilms' tumors or nephroblastomas, the level of expression of WT1 varies depending on the histology of the tissue. WT1 expression in tumors has been observed in blastema and immature epithelial structures but not in more mature tissue such as stroma or collecting duct derivatives (Pritchard-Jones and Fleming, 1991).

WT1 is a known transcriptional factor that could either repress or activate genes involved in growth control, depending on promoter architecture and the splice variants that are used (Bickmore et al., 1992; Madden et al 1993; Wang et al., 1993; Drummond et al., 1994; Werner et al 1994; Reddy et al., 1995). It is quite possible that WT1 activates or represses genes involved in the cascade of events leading to the proliferation and differentiation of germ cells by Sertoli cells, such a function of WT1 could also be mediated by means of regulating splicing events within the Sertoli cells (Larsson et al., 1995).

Sertoli cells are known to regulate and control germ

cell maturation and differentiation. Many factors that affect the germ cell cycle have been reported to be released by Sertoli cells, including Steel factor, fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor I (IGF-I), androgen-binding protein (ABP), and activin/inhibin (Chatelain et al., 1987; Bardin et al., 1994; Sharpe, 1994). Interestingly, c-kit, the receptor of Steel factor, is expressed in dividing spermatogonia in mice (Sorrentino et al., 1991). Also, insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) is present in both Sertoli cells and germ cells (Borland et al., 1984; Tres et al., 1986; Oonk and Grootegoed, 1988; Vanelli et al., 1988). WT1 could be interacting by means of regulating the expression/production of any of these factors. For example, WT1 has been suggested to repress IGF-IR in nephroblastomas by binding to a WT1 recognition site (Werner et al., 1994). It is possible that IGF-IR is also being repressed by WT1 in the Sertoli cells of the testis, affecting the dynamics of the cell machinery.

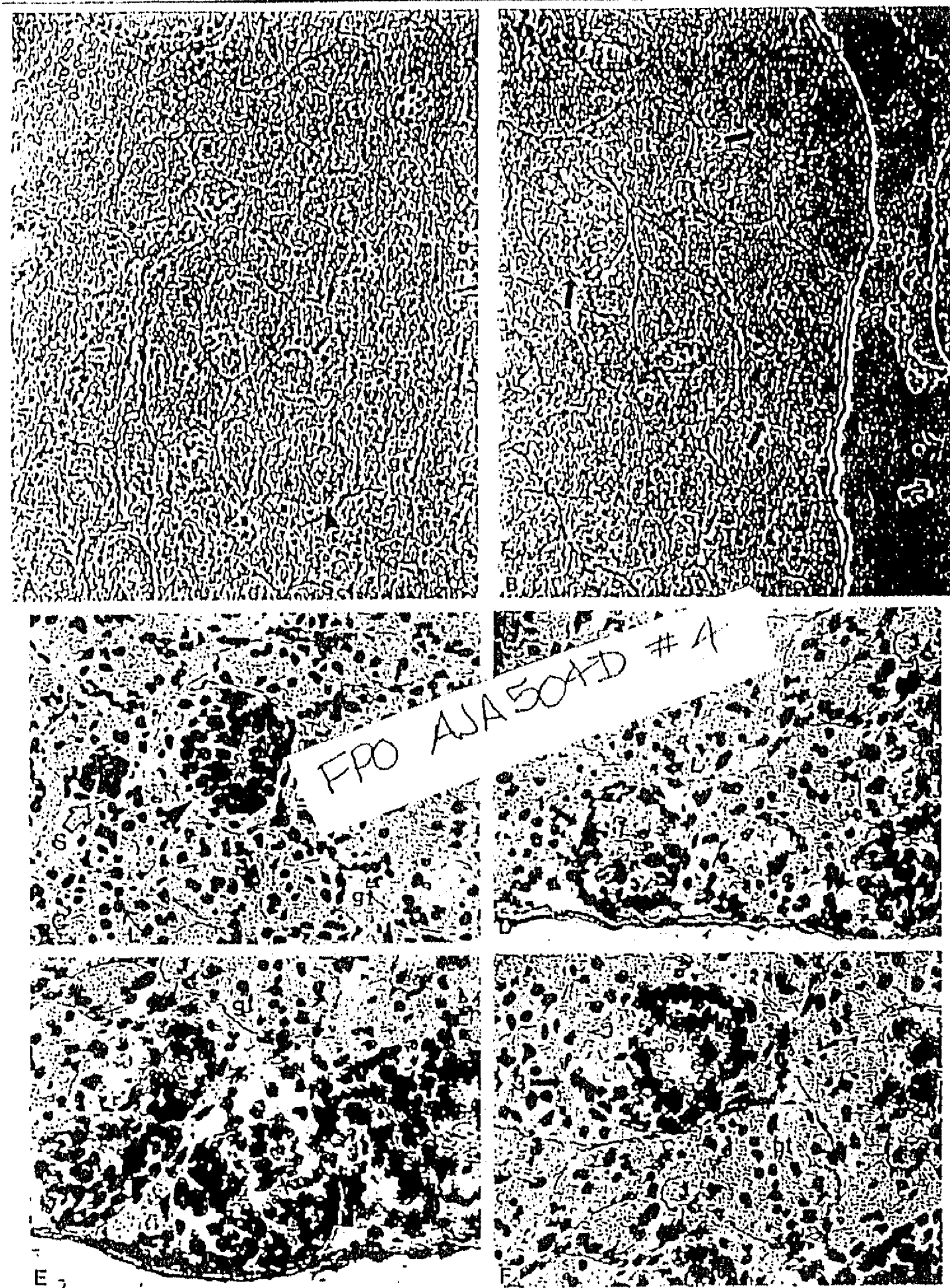


Fig. 4 Presence of WT1 protein in early spermatogonial cysts. A and B are testis sections stained for WT1 antibody; C-F are the counter-stained corresponding magnified versions of A and B. In A and C, a young spermatogonial cysts stains positive for WT1 protein (thick solid arrow), whereas a later spermatogonial cyst is negative (arrowhead). These cysts exist on a background of glandular tissue (gl) in which the Leydig cells (L) are all negative (thin solid arrow) and nests of Sertoli cells (S) are positive (open arrows). In B, a number of later stage cysts are clearly negative for WT1 protein (arrows). Lobule 1 is also shown in D; no

WT1 protein is present in Sertoli cells associated with more mature spermatogonia (small arrows). In lobule 2, as shown in E, Sertoli cells in spermatogonial cysts are also negative for WT1 protein (small arrow). In F, lobule 3 contains a combination of young and late spermatogonia cysts. Here, Sertoli cells (small arrows) associated with the early spermatogonia (light pink germ cells) are positive for WT1, whereas the Sertoli cells associated with other cyst(s) containing more darkly stained germ cells are negative (arrowhead).



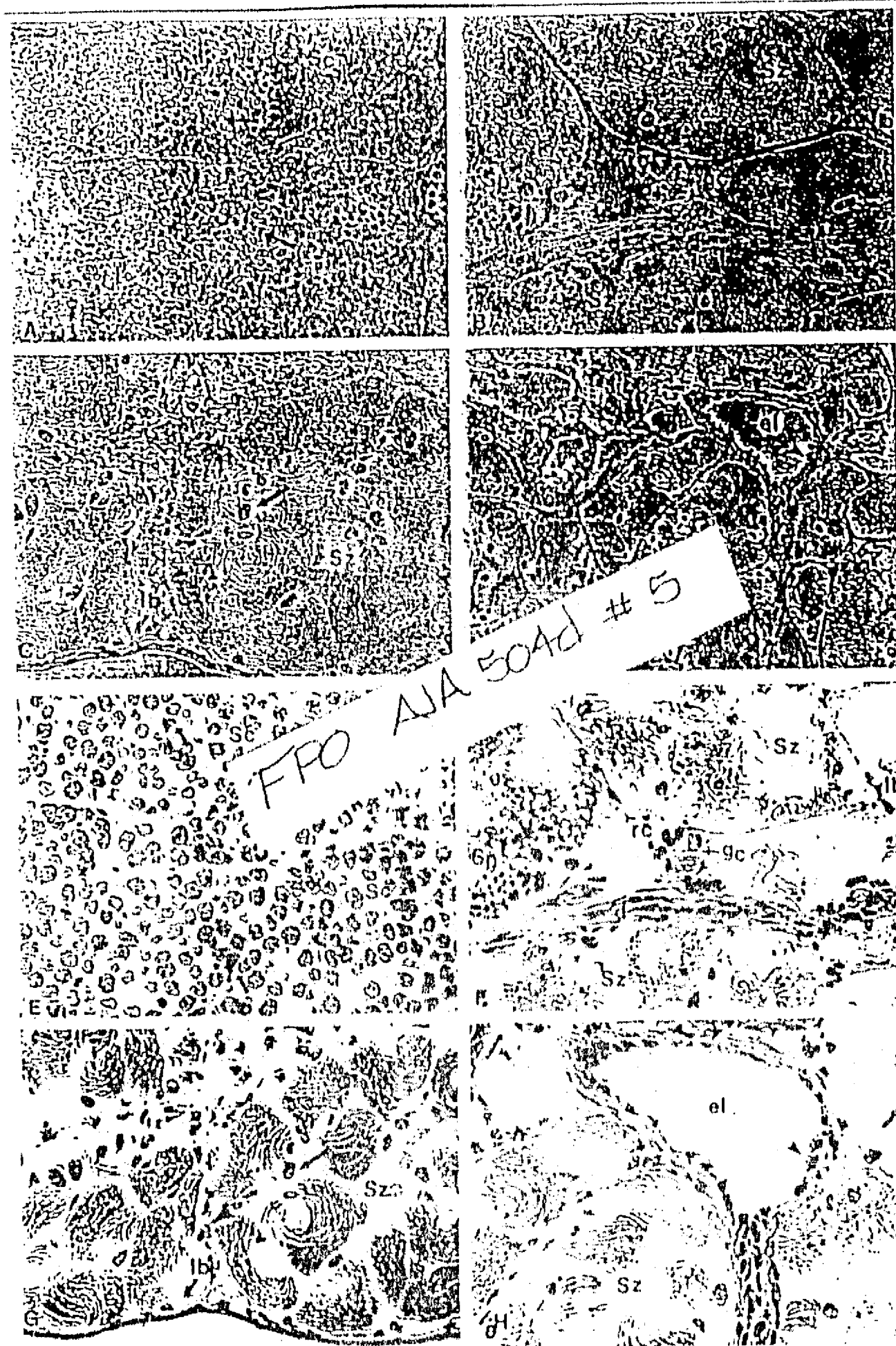


Fig. 5 Presence of WT1 protein in the axolotl testis. In A and E, spermatocyte cysts (Sc) show Sertoli cells positive for WT1 (arrows). In B and F, WT1 is present in duct cells (d), in Sertoli cells associated with regenerating cysts (rc), in Sertoli cells associated with spermata (Sp), and in spermatozoa (Sz). Note that the lobule boundary cells (lb; arrowhead) as well as the germ cells (gc; arrow) are negative. In C and G,

Sertoli cells associated with spermatozoa (arrows) are positive, whereas lobule boundary cells (lb; arrowhead) are negative. In D and H, duct cells are positive for WT1 protein, Sertoli cells associated with spermatozoa, and Sertoli cells left in the inside of the emptied lobules (el; arrowheads). The outside cell layer (lobule boundary cells/Leydig cells) is negative (arrows).

Sertoli cell numbers diminish greatly during meiosis (Lazard, 1974, 1976, 1979), which could explain the lack of expression observed in (c) cysts. On the other

hand, some Sertoli cells could be identified within cysts of spermatocytes that were not expressing WT1 mRNA (Fig. 3B). In contrast to the case in the mRNA studies,

WT1 protein was detected in Sertoli cells found within spermatocytes. We believe that the method of in situ hybridization is not sensitive enough to detect the down-regulated mRNA. Such is the case in adult human kidneys, in which WT1 mRNA is undetectable via in situ hybridization but is detectable via RT-PCR or immunofluorescence (Mundlos et al., 1993). Another possibility is that the mRNA is unstable at these stages. Whatever the possibility, this regulation of the WT1 gene during the transition from mitosis to meiosis suggests a role for the gene in this event.

WT1 protein was also detected during spermiogenesis. At this stage, spermatids elongate and start differentiating into spermatozoa. Towards the end of this stage, Sertoli cells become hypertrophic and their nuclei become more rounded. Eventually, the cysts rupture and the lobules become lined with a layer of Sertoli cells containing bundles of spermatozoa. Sertoli cells with their associated spermatozoa can either be found adhering to the basement membrane of the lobules or sloughing into the lumen of the lobule. During spermiation, spermatozoa are released into the lumen of the lobules and the remaining Sertoli cells become compressed by the lobule in the glandular tissue that eventually degenerates and becomes reabsorbed (Lofts, 1984; Grier, 1993; Pudney, 1993). WT1 protein was clearly present in Sertoli cells at this stage, although the staining was not as strong as in early spermatogonial cysts. Sertoli cells associated with spermatozoa seemed to polarize onto the side, against the lobule walls (Del Rio-Tsonis, unpublished results). In some sections, emptied lobules were observed where Sertoli cells line the inside of the lobule. These cells stain strongly for WT1. In bony fishes, bipotentiality has been shown for Sertoli cells, which can either differentiate into efferent duct cells following spermiation or degenerate (Grier, 1993). It is possible that, in the axolotl, Sertoli cells have a two-way bipotentiality and that they can differentiate back into duct cells. The cells in the interior periphery of the emptied lobules, incidentally, are very close in morphology to the so-called duct cells, and both are positive for WT1 protein.

It is presumed that, as in mammals, urodele Sertoli cells proliferate until a certain stage is reached (21 days after birth for mice). These cells cease to divide and form inter-Sertoli cell junctions, which aid in the exchanges of nutrients and factors that regulate germ cell maturation in the mouse and rat (Sharpe, 1994). For these differentiation changes to take place, the molecular machinery must change. In the mouse, WT1 expression does not cease at 21 days after birth, even though the level of at least one of the transcripts seems to be down-regulated at 24 days vs. 8 or 15 days after birth (Pelletier et al., 1991; Armstrong et al., 1992). This down-regulation after Sertoli cells stop cycling might represent another type of regulation directly related to the Sertoli cell cycle. In urodeles, the Sertoli cell undergoes some morphological changes throughout the spermatogenic cycle; probably the most dramatic is

the hypertrophy of these cells as spermiation is ready to occur. At this stage, WT1 mRNA is undetectable via in situ hybridization, but WT1 protein is present. Therefore, the mRNA might either be too low or too unstable to be detected. Either way, there is a change in the regulation of WT1 mRNA in the Sertoli cells associated with later stages of spermatogonia, all the way to the point where the sperm is released (spermiation). These changes in morphology might also represent different levels of maturation/differentiation of the Sertoli cell itself in response to the existing interactions and signals from the germ cells. Even though the structure of the testis in amphibia is quite different from that in mammals, it is likely that cellular functions have been conserved and, therefore, that WT1 expression might regulate Sertoli cell cycle and maturation in both amphibia and mammals.

The axolotl testis provides an excellent model to study germ cell-somatic cell interactions and the maturation process of germ cells. Our studies show that, during spermatogenesis, cross-talk of germ cells and somatic cells can lead to regulation of the Wilms' tumor gene. The degree of expression of WT1 can now serve as a cellular marker.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Animals

*Amblystoma mexicanum* (axolotl) were provided by the axolotl colony, University of Indiana, Bloomington, Indiana.

### Cloning of AxWT1

RNA was isolated from axolotl kidneys (Sambrook et al., 1989) and used for RT-PCR utilizing degenerate primers that flank the most conserved region of this gene throughout the species, the zinc finger region: 5' Primer wt2, 5'-GAG CAG CTG AGA AAC GIC CIT TCA TGT G-3'; 3' primer wt3, 5'-ACC TGT ATG AGT CCT IGT RTG-3, where R = A,G and I = inosine. For the RT reaction, 1 µg of RNA was incubated with 1 µl of random hexamers, 1× buffer, 2 mM dNTP mix, 10 µM dithiothreitol (DTT), and 200 U of Superscript RT following the manufacturer's instructions (BRL). The RT-PCR conditions were as follows: 2-5 µl of RT product was used with 200 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 µM primers, 2.5 U Taq, 10 mM Tris-HCl, and 50 mM KCl. The cycles used were: 1 cycle at 95°C for 3 min, then 35 cycles of denaturation at 95°C for 45 sec, annealing at 50°C for 30 sec, and finally extending at 72°C for 45 sec. A last extension at 72°C was used for 5 min. The 216 bp amplified fragment was cloned into the PCRII vector from Invitrogen. The clone was sequenced using the Sanger method with the Sequenase kit from USB. The GenBank accession number for the AxWT1 sequence is U60234.

### In Situ Hybridization

Testis of animals from 6 months to 2 years old were dissected, frozen in optimal cutting temperature (OCT)

compound, sectioned, and processed for in situ hybridization (Del Rio-Tsonis et al., 1995). Briefly, sections were fixed in 4% PFA, rinsed in 1× PBS, treated with triethanolamine, washed with 2× SSC, and dehydrated by ethanol series (50–100%). Slides were allowed to air dry and were then incubated overnight at 52°C with either the sense or the antisense <sup>35</sup>S-labelled AxWT1 probes. The next day, the slides were rinsed in 2× SSC, then washed in a solution containing 50% formamide, 1× SSC, 0.1% β-mercaptoethanol at 52°C, followed by RNase treatment, and finally were washed with 0.1× SSC and 0.1% β-mercaptoethanol. Sections were dehydrated and air dried so that they could be dipped in photographic emulsion and exposed for 2 weeks. Slides were counterstained with either hematoxylin-eosin or van Gieson's stain.

### Immunohistochemistry

Testis of animals from 6 months to 2 years old were dissected, frozen in OCT compound, sectioned, air dried, and fixed in cold methanol for 10 min at -20°C. After being rinsed in 1× PBS, the sections were bleached in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min and washed in 1× PBS for 20 min. Then, they were blocked for 20–45 min at room temperature with normal goat serum and incubated with C-19 WT1 antibody (Santa Cruz BIOTECHNOLOGY) for 30 min at room temperature. This antibody, which was made against the last 18 amino acids of the human WT protein, recognizes each of the alternative splicing products in mouse, rat, and human. The slides were washed in 1× PBS and incubated with anti-IgG/biotinylated secondary antibody for another 30 min at RT. After being washed in 1× PBS, the slides were incubated with streptavidin-peroxidase complex for 30 min. After another wash in 1× PBS, the slides were dipped in 0.5% Triton X-100 in PBS for 30 sec and treated with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for development of the enzymatic reaction. The slides were mounted in 90% glycerol/10% 1× PBS and later stained briefly with hematoxylin-eosin. A competing WT1 peptide (Santa Cruz BIOTECHNOLOGY) was used to determine the specificity and background of this assay. The specific staining was abolished upon addition of competing peptide (not shown).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marie Claude Hoffman, Jose Luis Millán, and Shin-ichi-Abé for their critical review and discussions of this work. This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Biotechnology of KDRT from the Instituto de Biología, UNAM, Cuernavaca, Morelos, México. This work was partially supported by the following grants: PADAP #030377 (K.D.R.-T.); DGAPA #IN 202995 (L.C.); and NIH grants (P.A.T.).

### REFERENCES

Armstrong, J.F., Pritchard-Jones, K., Bickmore, W.A., Hastie, N.D., and Bard, J.B.L. (1992) The expression of the Wilms' tumor gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* 40:55–57.

- Bardin, C.W., Cheng, C.Y., Mustow, N.A., and Gunsalus, G.L. (1994) The Sertoli cell. In: "The Physiology of Reproduction," 2nd Ed., Knobil, E. and Neil, J.D. (eds.). New York: Raven Press, pp. 1291–1333.
- Bickmore, W.A., Oghene, K., Little, M.H., Seawright, A., van Heyning, V., and Hastie, N.D. (1992) Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor WT1 gene transcript. *Science* 257:235–237.
- Borland, K., Mita, M., Oppenheimer, C.L., Blinderman, L.A., Massague, J., Hall, P.F., and Czech, M.P. (1984) The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* 114:240–246.
- Buckler, A., Pelletier, J., Haber, D., Glaser, T., and Housman, D. (1991) Isolation, characterization, and expression of the murine Wilms' tumor (WT1) during kidney development. *Mol. Cell. Biol.* 11:1707–1712.
- Chatelain, P.G., Neville, D., and Saez, J.M. (1987) Somatomedin-C/insulin-like growth factor-like material secreted by Sertoli cells in vitro: Characterization and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146:1009–1017.
- Del Rio-Tsonis, K., Washabaugh, C.H., and Tsonis, P.A. (1995) Expression of pax-6 during urodele eye development and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5092–5096.
- Drummond, I.A., Rupprecht, H.D., Rohwer-Nutter, P., Lopez-Guisa, J.M., Madden, S.L., Rauscher, F.J., III, and Sukhatme, V.P. (1994) DNA recognition by splicing variants of the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Mol. Cell. Biol.* 14:3800–3809.
- Fraile, B., Saez, F.J., and Paniagua, R. (1990) The cycle of follicular and interstitial cells (Leydig cells) in the testis of the marbled newt, *Triturus marmoratus* (Caudata, Salamandridae). *J. Morphol.* 204: 89–101.
- Grier, H.J. (1993) Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: "The Sertoli Cell," Russell, L.D. and Griswold, M.D. (eds.). Clearwater, FL: Cache River Press, pp. 704–739.
- Kent, J., Coriat, A.M., Sharpe, P.T., Hastie, N.D., and van Heyning, V. (1995) The Evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* 11:1781–1792.
- Kreidberg, J., Sariola, H., Loring, J., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D., and Jaenisch, R. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679–691.
- Larsson, S., Charleu, J.P., Miyagawa, K., Engelkamp, D., Rassoulzadegan, M., Ross, A., Cuzin, F., van Heyning, V., and Hastie, N.D. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81:391–401.
- Lazard, L. (1974) Etude histochemique comparée de la delta 5-3B-hydroxysteroidé déshydrogénase du testicule d'axolotl normal ou transplanté dans un hôte male ou femelle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24:314–325.
- Lazard, L. (1976) Spermatogenesis and 3B-HSDH activity in the testis of the axolotl. *Nature* 264:796–797.
- Lazard, L. (1979) Steroidogenesis in the axolotl testis. Histochemistry of two major enzymes related to cell type, spermatogenesis, and substrate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 39:381–387.
- Lofta, B. (1984) Amphibians. In: "Marshall's Physiology of Reproduction, Vol. 1, Reproductive Cycles of Vertebrates," 4th Ed., Laming, G.E. (ed.). New York: Churchill Livingstone, pp. 127–205.
- Madden, S.L., Cook, D.M., and Rauscher, F.J., III (1993) A structure-function analysis of the transcriptional repression mediated by the WT1, Wilms' tumor suppressor protein. *Oncogene* 8:1713–1720.
- Miltner, M.J., and Armstrong, J.B. (1983) Spermatogenesis in the Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *J. Exp. Zool.* 227:255–263.
- Mundlos, S., Pelletier, J., Darveau, A., Bachmann, M., Winterpacht, A., and Zabel, B. (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119:1329–1341.
- Oonk, R.B., and Grootegoed, J.A. (1988) Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors on Sertoli cells from immature rat and age-dependent testicular binding of IGF-I and insulin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 56:33–42.

- Pelletier, J., Schalling, M., Buckler, A.J., Rogers, A., Haber, D.A., and Housman, D. (1991) Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 5:1345-1356.
- Phelan, A.S., Lindgerb, C., and Call, K. (1994) Wilms' tumor gene, WT1, mRNA is downregulated during induction of erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Cell Growth Differ.* 5:677-686.
- Pritchard-Jones, K. and Fleming, S. (1991) Cell types expressing the Wilms' tumour gene (WT1) in Wilms' tumours: Implications for tumour histogenesis. *Oncogene* 6:2211-2220.
- Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., Bard, J., Buckler, A., Pelletier, J., Houseman, D., van Heyningen, V., and Hastie, N. (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346:194-197.
- Pudney, J. (1993) Comparative cytology of the nonmammalian vertebrate Sertoli cell. In: "The Sertoli Cell," Russell, L.D. and Griswold, M.D. (eds.). Clearwater, FL: Cache River Press, pp. 704-739.
- Reddy, J.C., Morris, J.C., Wang, J., English, M.A., Haber, D.A., Shi, Y., and Licht, J.D. (1995) WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 270:10878-10884.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., Ford, N., Nolan, C., and Ferguson, M. (eds.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sekiya, M., Adachi, M., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1994) Downregulation of Wilms' tumor gene (wt1) during myelomonocytic differentiation in HL60 cells. *Blood* 83:1876-1882.
- Sharma, P.M., Yang, X., Bowman, M., Roberts, V., and Sukumar, S. (1992) Molecular cloning of rat Wilms' tumor complementary DNA and a study of messenger RNA expression in the urogenital system and the brain. *Cancer Res.* 52:6407-6412.
- Sharpe, R.M. (1994) Regulation of spermatogenesis. In: "The Physiology of Reproduction," 2nd Ed., Knobil, E. and Neil, J.D. (eds.). New York: Raven Press, pp. 1363-1434.
- Sorrentino, V., Giorgi, M., Geremia, R., Besmer, P., and Rossi, P. (1991) Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 6:149-151.
- Tros, L.L., Smith, E.P., Van Wyk, J.J., and Kierzenbaum, A. L. (1986) Immunoreactive sites and accumulation of somatomedin-C in rat Sertoli-spermatogenic cell cocultures. *Exp. Cell Res.* 162:33-50.
- Vanelli, B.G., Barni, T., Orlando, C., Natali, A., Serio, A., and Balboni, G.C. (1988) Insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor in human testis: An immunohistochemical study. *Fertil. Steril.* 49:666-669.
- Wang, Z.Y., Qui, Q.Q., and Deuel, T.F. (1993) The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J. Biol. Chem.* 268,13:9172-9175.
- Werner, H., Rauscher III, F.J., Sukhatme, V.P., Drummond, I.A., Roberts, C.T., Jr., and LeRoith, D. (1994) Transcriptional repression of the insulin-like growth factor I Receptor (IGF-I-R) gene by the tumor suppressor WT1 involves binding to sequences both upstream and downstream of the IGF-I-R gene transcription start site. *J. Biol. Chem.* 269:12577-12582.