

8/
21



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

Ontogenia de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) para la enzima P450_{1,2,4} y la hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS) durante el desarrollo postnatal del ovario en el ratón B6.Y^{POS}

TESIS:

Que para obtener el título de :

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

David Roberto Pérez Vantine

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. RODRÍGUEZ SOTRES ROGELIO
Vocal	Prof. ORTEGA MUÑOZ RAQUEL
Secretario	Prof. VILLALPANDO FIERRO MARÍA IRMA
1er. suplente	Prof. ZAMBRANO GONZÁLEZ ELENA
2do. suplente	Prof. GIRAL BARNÉS CARMEN

Sitio donde se desarrolló el tema : INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



Asesor del tema: VILLALPANDO FIERRO MARÍA IRMA



Sustentante: PÉREZ VAN VANE DAVID ROBERTO

Agradecimientos

A la *Dra. Irma Villalpando Fierro* por permitirme participar en uno de los proyectos que se desarrollan en el Laboratorio de Embriología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Así como su valioso apoyo técnico y orientación durante el desarrollo de este trabajo, *GRACIAS*.

Al *Biólogo Horacio Villafán Monroy* por su valiosa asesoría e inversión de tiempo en el desarrollo de la técnica de la hibridación puntual, en la extracción y purificación de DNA plasmídico y por compartir sus conocimientos del tema, en general, por su gran apoyo y amistad, *GRACIAS*.

Este trabajo representa un enorme esfuerzo por parte de un *gran equipo*, cuyos integrantes participaron en sus diversas etapas y lo hicieron posible:

Sra. Gloria: Por la propagación y cuidado de la cepa con el inserto, así como la preparación del material de trabajo, elementos esenciales para la obtención de resultados.

Floria Lizárraga S.: Quien formó parte muy activa en el desarrollo de este trabajo al mantener la cepa B6.Y^{POS} y llevar el control de los nacimientos, así como encargarse de la purificación del inserto, entre muchas otras cosas. *Guadalupe Sánchez B.*: Por su valiosa asesoría en la técnica de extracción de RNA, el RT-PCR, etc. También quiero agradecer a los compañeros del laboratorio por aportar valiosas ideas, sugerencias y por su compañía durante el desarrollo de la tesis: Silvia, Lilia, Omar, Daniel B., Pilar, Mario y Yesenia.

Agradezco a los Fotógrafos: José y Jorge, al dibujante Rafael, al grupo del Dr. Merchant por su apoyo con equipo y el revelado de las placas fotográficas, a Martha por su apoyo con el espectrofotómetro, a Santiago por su asesoría en el marcado de la sonda y a las secretarías Dulce y Cielo.

Los reactivos y equipo de este proyecto fueron financiados en parte por el proyecto IN215296-DGAPA de la UNAM.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme una formación no sólo académica, sino también *deportiva* y cultural.

A la **Facultad de Química** y a sus profesores por ser una parte esencial de mi formación profesional.

Mis padres Susan y Héctor merecen un agradecimiento *muy especial* ya que esta tesis, así como toda la educación y oportunidades que he recibido, son producto de su gran esfuerzo y apoyo. **MUCHAS GRACIAS.** A mi hermano **Daniel** por su apoyo y compañía, **GRACIAS.** A ustedes se las dedico con mucho cariño.

Adriana, tú que has sido y seguirás siendo una parte *muy importante* y fundamental de mi vida, muchas gracias por tu compañía y el gran apoyo que me has brindado a lo largo de estos siete años.

A INRA, por su soporte con infraestructura y material para realizar este manuscrito.

A los compañeros que hicieron de esos años en la Facultad de Química inolvidables: Gustavo Rosales, Karl García, Carlos E., Adolfo, Claudia, Pablo, Tere, Tommy, Carmen, Omar, Rigel, Olivia, Claudia M., Verónica R., Fausto

GRACIAS

..... Y finalmente quiero agradecer a todos aquellos que de alguna u otra manera influyeron en mí a lo largo de este periodo de mi vida

17 de mayo de 1997



ÍNDICE

1.	RESUMEN	6
2.	INTRODUCCIÓN	7
2.1	Generalidades sobre diferenciación sexual en mamíferos	7
2.1.1	Sexo cromosómico	7
2.1.2	Sexo gonadal	7
	a) Migración de las células germinales primordiales	7
	b) Formación de la cresta genital	8
	c) La gónada indiferenciada	9
	d) Hipótesis sobre la colonización de la gónada	11
	e) Diferenciación sexual gonadal	12
	i. Diferenciación testicular	12
	ii. Diferenciación del ovario	13
2.1.3	Sexo fenotípico	13
2.2	Hormona inhibidora de los conductos de Müller	14
2.2.1	Aspectos históricos	14
2.2.2	Características	15
2.2.3	Hormona inhibidora de los conductos de Müller y el ovario postnatal	16
2.3	Fisiología del ovario postnatal	18
2.3.1	Generalidades	18
	a) Irrigación e inervación	18
	b) Componentes celulares	18
2.3.2	Ovario infantil	19
	a) Foliculogénesis y crecimiento	20
2.4	Esteroides gonadales	22
2.4.1	Clasificación	22
2.4.2	Biosíntesis	24
2.4.3	Papel de las gonadotropinas	27
2.5	Importancia de la enzima P450 _{17α}	30
2.5.1	Características	30
2.5.2	Regulación	31

2.6	Características de la cepa B6.Y ^{POS}	33
2.6.1	Origen y proporción de los sexos	33
2.6.2	El ovario B6.Y ^{POS}	35
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	38
3.1	Planteamiento del problema	38
3.2	Hipótesis	39
4.	OBJETIVOS	39
5.	MATERIAL Y MÉTODOS	40
5.1	Modelo biológico	40
5.2	Determinación del sexo genético por hibridación puntual	40
5.2.1	Obtención de la sonda	40
5.2.2	Electroelución	42
5.2.3	Determinación de la concentración de la sonda	42
5.2.4	Marcado de la sonda	43
5.2.5	Preparación de las membranas de hibridación	44
5.2.6	Prehibridación	44
5.2.7	Hibridación	45
5.2.8	Autorradiografía	45
5.3	Extracción y purificación de ARN	47
5.3.1	Homogeneización	47
5.3.2	Separación de fases	47
5.3.3	Precipitación	47
5.3.4	Lavados	49
5.3.5	Cuantificación del ARN	49
5.4	Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN (RT-PCR)	49
5.4.1	P450 _{17α}	49
	a) Visualización de los productos	51
	b) Fotografías	51
5.4.2	Hormona inhibidora de los conductos de Müller	53

6.	RESULTADOS	55
6.1	Identificación de las hembras XY	55
6.2	Amplificación de los ARNm	58
6.2.1	P450 _{17α}	58
6.2.2	Hormona inhibidora de los conductos de Müller	62
7.	DISCUSIÓN	66
8.	CONCLUSIONES	75
9.	BIBLIOGRAFÍA	76
10.	APÉNDICE	84
11.	LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	87

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
3 β -HSD	Enzima hidroxiesteroide deshidrogenasa
CGP's	Células germinales primordiales
cpm	Cuentas por minuto
D	Dalton
dATP	5' Trifosfato de desoxiadenuína
dCTP	5' Trifosfato de desoxicitidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
d.g.	Días de gestación
dGTP	5' Trifosfato de desoxiguanidina
dpp	Días <i>postpartum</i>
dTTP	5' Trifosfato de desoxitimidina
FSH	Hormona estimulante del folículo
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
hpg	Ratones que carecen de gonadotropinas circulantes
Hprt	Gen Hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa
17-HSOR	Enzima 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante

M1	Oligonucleótido para el MIS (5'- 3')
M2	Oligonucleótido para el MIS (3'- 5')
MIS	Hormona inhibidora de los conductos Mullerianos
ng	Nanogramo
OHasaP1	Oligonucleótido P1 para la P450 _{17α} (5' - 3')
OHasaP2	Oligonucleótido P2 para la P450 _{17α} (3' - 5')
P450scc	Enzima 20,22 desmolasa
P450arom	Citocromo P450 aromatasa
P450_{17α}	Enzima P450 17 α hidroxilasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSG	Suero de yegua preñada
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
SRY	Gen determinante del testículo en humano
Sry	Gen determinante de testículo en ratón
TDY	Factor determinante de testículo
TGF-β	Factor de transformación del crecimiento
v	Volt

1. RESUMEN

El cromosoma "Y" induce la diferenciación testicular, sin embargo, cuando la cepa *Mus musculus poschiavinus* (POS) se cruza con la cepa *Mus mus musculus* (B6) origina la cepa (B6.Y^{POS}), cuya descendencia XY desarrolla ovotestis y ovarios. La hembra XY, a pesar de su fenotipo normal, produce niveles bajos de progesterona, estradiol y testosterona (T) y no incrementa la síntesis de ésta última en presencia de gonadotropinas. Sin embargo, se desconoce si uno de los factores involucrados en la baja producción de testosterona es la variación en la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la enzima P450_{17 α} . Por otro lado, la hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS), cuya función más conocida es en la regresión de los conductos de Müller durante la diferenciación sexual, se ha detectado en células de la granulosa de ovario postnatal, sin embargo, aún se desconoce su ontogenia en el ovario XY. El objetivo de la presente investigación fue estudiar la expresión del ARNm de la P450_{17 α} y del MIS en los ovarios de hembras B6.Y^{POS} (XX y XY) durante la etapa temprana de desarrollo postnatal de 1 a 15 días *postpartum* (dpp). Se extrajo el ARN total de los ovarios B6.Y^{POS} y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los resultados obtenidos muestran que entre 1 y 8 dpp el ARNm para la P450_{17 α} no está presente en niveles detectables en los ovarios XX y XY. A partir de los 9 dpp se detecta la expresión del ARNm de la P450_{17 α} en el ovario XX, mientras que en el XY este mensajero se observó hasta los 12 dpp. Con base en los resultados obtenidos se propone que la baja producción de andrógenos en el ovario XY se debe a un defecto en el mecanismo de regulación de la expresión del ARNm de la P450_{17 α} . Por otro lado, los resultados observados de la ontogenia del ARNm para el MIS nos indican que el ARNm se expresa de manera constante a partir de los 4 dpp en el ovario XX y en forma constante a partir de los 6 dpp en el ovario XY. Por lo anterior proponemos que el retraso observado en la expresión de los mensajeros para el MIS y la P450_{17 α} en el ovario XY puede afectar de forma irreversible el desarrollo del ovario y, por lo tanto, su funcionamiento normal.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades sobre diferenciación sexual en mamíferos

2.1.1 Sexo cromosómico

El primer evento que ocurre en el proceso de diferenciación sexual de un individuo es el establecimiento del sexo cromosómico, el cual se lleva a cabo en el momento de la fertilización. Cuando el ovocito es fertilizado por un espermatozoide, los gametos femeninos contribuyen con un cromosoma sexual que únicamente puede ser X; por el contrario, el espermatozoide o gameto masculino aporta un cromosoma "X" o "Y". De tal forma que si el ovocito es fertilizado por un espermatozoide "X" el producto tendrá un genotipo XX (individuo femenino que desarrollará ovarios) y, en cambio, si es fecundado por un espermatozoide "Y" el genotipo del producto será XY (individuo masculino que desarrollará testículos). La siguiente fase de la diferenciación sexual es el desarrollo morfológico, bioquímico y funcional de las gónadas (Kofman-Alfaro *et. al.*, 1982; Gilbert, 1994).

2.1.2 Sexo gonadal

a) Migración de las células germinales primordiales

La gónada surge de tres componentes principales: el epitelio celómico, el mesénquima

que proviene de la región mesonéfrica y las células germinales primordiales (CGP's) de origen extragonadal. En la mayoría de los vertebrados, el primer proceso durante la diferenciación gonadal es la migración de las CGP's (Hing-Sing, 1994), las cuales, en el caso del ratón, se originan en el endodermo del saco vitelino y son detectadas a partir del día 8 de gestación (d.g.) en la base del alantoides (Merchant-Larios, 1991; Ozdzanski, 1972). La migración de las CGP's ocurre mediante dos tipos de movimientos: uno pasivo y otro activo. El primero es provocado por el crecimiento del embrión y por movimientos morfogénéticos lo que permite que las CGP's lleguen a su destino. El segundo movimiento es debido al desplazamiento de las CGP's, desde el intestino hacia la cresta genital (Merchant-Larios, 1991).

En el movimiento pasivo, el crecimiento del endodermo del saco vitelino provoca el desplazamiento de las CGP's al interior del embrión para formar parte del intestino primitivo. Mientras que en el movimiento activo es necesaria la formación de estructuras membranales como filopodios y lamelipodios (Merchant-Larios, 1991).

b) Formación de la cresta genital

Uno de los componentes del primordio gonadal es el epitelio celómico, el cual aparece como un engrosamiento en la parte media del mesonefros (Peters y Peters, 1980; Merchant-Larios, 1991). La fase siguiente en la formación de la cresta genital se inicia con

la llegada a la región de la cresta genital de las CGP's, la cuales comienzan a ser rodeadas por células somáticas que son de tres tipos: mesenquimáticas (de la región del mesonefros), mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (de los vasos sanguíneos) (Tabla 1); iniciándose así una proliferación de estos componentes que llevan a la formación del blastema gonadal.

Células somáticas que originan la gónada	
Mesoteliales o epiteliales celómicas	Precursoras de la gónada
Mesenquimáticas	
Endoteliales	Tejido diferenciado

Tabla 1. Resumen de las células somáticas que forman la gónada.

c) La gónada indiferenciada.

La etapa posterior a la formación del blastema gonadal se conoce con el nombre de gónada indiferenciada. En esta fase, común a ambos sexos, la gónada se encuentra morfológicamente indiferenciada y es independiente del sexo cromosómico de los individuos (XX o XY).

En el embrión de ratón la gónada es morfológicamente indistinguible desde los 9.5 hasta los 11.5 d.g., momento en el que ocurre un alineamiento de las células de Sertoli en los cordones sexuales. A esta edad la gónada bipotencial posee conductos de Wolff y de Müller. El desarrollo o la regresión de cada una de estas estructuras unipotenciales dependerá totalmente de la gónada que se diferencie. En la figura 1 se presenta un diagrama que resume estos eventos.

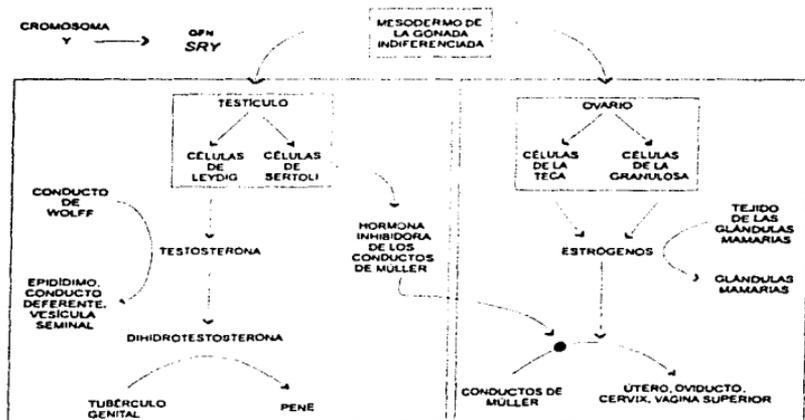


Figura 1. Esquema general de la diferenciación sexual en los mamíferos (modificado de: Gilbert, S. 1994 *Developmental Biology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc).

La gónada se forma básicamente por dos tipos de células: a) células somáticas son todas aquellas que forman un organismo, las cuales se diferencian para realizar funciones específicas y mueren con el individuo. En el caso de la gónada indiferenciada, éstas están representadas por las células precursoras de la teca y de la granulosa en el ovario y por las antecesoras de las células de Sertoli, Leydig y mioides en el testículo; b) células germinales primordiales que dan origen a los gametos masculinos y femeninos y que contribuyen en la formación del cigoto (Kofman-Alfaro *et. al.*, 1982; Hickman *et. al.*, 1988).

La formación de los cordones sexuales se inicia cuando se deposita una lámina basal entre las células del blastema gonadal, estableciéndose así la gónada indiferenciada (Merchant-Larios, 1991).

d) Hipótesis sobre la colonización de la gónada

Para explicar la dirección de la migración de las CGP's se han propuesto tres modelos (Tomado de: Merchant-Larios, 1991) :

1. Atracción por un gradiente de concentración, el cual se da por factores desconocidos secretados en las células epiteliales de la región urogenital,
2. Guía por contacto, teoría que establece la existencia de receptores para "factores de adhesión", como la fibronectina, sintetizados por células localizadas en el camino a la cresta urogenital,
3. Organización de células somáticas, donde se explica que las células, por su

organización topográfica, forman un túnel por el cual migrarían las CGP's hasta la cresta urogenital.

e) Diferenciación sexual gonadal

i. Diferenciación testicular

El evento morfogenético más importante, estructuralmente hablando, que ocurre durante la diferenciación de la gónada es la separación de los cordones epiteliales del epitelio celómico, proceso que ocurre en machos genéticos (Merchant-Larios, 1984). El desarrollo de un mamífero como macho es consecuencia de la formación de un testículo en el embrión, evento iniciado a nivel molecular con la expresión del factor determinante de testículo (TDY), el cual se ha localizado en el cromosoma "Y" (Koopman *et. al.*, 1990). Actualmente se sabe que el TDY es un gen, conocido como SRY en humanos y Sry en otros vertebrados (Berta *et. al.*, 1990; Gubbay *et. al.*, 1990; Tiersch, 1991), mismo que se localiza en el brazo corto del cromosoma "Y" y que está presente en una sola copia en el genoma masculino. Hasta la fecha se desconoce(n) el(los) mecanismo(s) mediante el cual este gen determina la diferenciación gonadal.

En el macho ocurren dos eventos fundamentales durante la diferenciación morfológica y funcional del testículo embrionario: 1. La secreción por parte de las células de Sertoli de la hormona inhibidora de los conductos Müllermanos (AMH o MIS) que trae como consecuencia la regresión de los conductos de Müller y 2. La producción de testosterona

por las células de Leydig.

ii. Diferenciación del ovario

Existen dos diferencias citológicas en el desarrollo del ovario con respecto al testículo: primero, los cordones epiteliales del ovario mantienen su continuidad con el epitelio superficial y segundo, las CGP's entran a la profase de la primera división meiótica. De los 15 a 17 d.g. en el ratón, el parámetro que identifica el desarrollo de un ovario es el inicio de la meiosis de las CGP's. Es importante hacer notar que el ovario no muestra cambios con respecto a la estructura morfológica de la gónada indiferenciada y se identifica por la ausencia de características testiculares (Merchant-Larios, 1991).

Una vez iniciada la meiosis da inicio el proceso de foliculogénesis, en el cual los ovocitos -que se encuentran agrupados en el interior de los cordones sexuales- son separados entre sí por células epiteliales que adquieren una forma cúbica, formándose de esta manera los primeros folículos (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989).

2.1.3 Sexo fenotípico

La formación tanto del ovario como del testículo se da durante la diferenciación gonadal, sin embargo, este evento no da una distinción fenotípica completa. Para alcanzar una apariencia masculina es necesario que las células de Leydig en el testículo sintetizen testosterona, la cual se convierte en 5- α -dihidrotestosterona por medio de la 5- α -reductasa

e induce la diferenciación del tracto masculino en vesículas seminales, conductos deferentes y el epidídimo (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991). Debido a que las hembras no poseen la 5α reductasa el sistema de conductos de Wolff degenera y los conductos de Müller dan origen a los oviductos, el útero y a la vagina superior; proceso que no depende de ningún factor (Austin *et. al.*, 1972).

2.2 Hormona inhibidora de los conductos de Müller

2.2.1 Aspectos históricos

La existencia del MIS fue postulada por Lillie (1916) como una explicación al fenómeno del freemartinismo. Éste último es un fenómeno natural que se observa en los bovinos, en donde la hembra de un par de gemelos heterosexuales (XX y XY) unidos por anastomosis vascular de la placenta, se masculiniza debido a la difusión de la testosterona producida por el macho. Posteriormente Jost en 1947 observó que la testosterona no era lo único que se requería para producir un desarrollo normal en machos y propuso la existencia de un factor adicional, al cual denominó MIS, necesario para explicar la regresión de los conductos de Müller.

Se sabe que el MIS es una glucoproteína expresada por las células de Sertoli (Tran y Josso, 1982; Price, 1979; Donahoe *et. al.*, 1977; Blanchard y Josso, 1974) durante la diferenciación de la gónada en machos, que se produce antes de que pueda notarse una

diferencia morfológica (Cate *et. al.*, 1986; Behringer *et. al.*, 1990), y que su expresión conduce a la regresión de los conductos de Müller, que de no darse impide una virilización completa del macho (Cate, *et. al.*, 1986). El MIS induce en ovarios fetales, cultivados *in vitro*, la formación de estructuras semejantes a los túbulos seminíferos, lo que sugiere su influencia en la diferenciación testicular (Vigier *et. al.*, 1987; Berhinger *et. al.*, 1990). Existen varias semejanzas entre las células de Sertoli y las de la granulosa, entre las cuales se encuentran: 1. forman una barrera entre las células somáticas y las germinales, 2. secretan productos en común como la inhibina, plasminógeno y proteoglicanos, 3. ambas secretan la hormona inhibidora de los conductos de Müller (Vigier *et. al.*, 1984).

2.2.2 Características

El MIS es un dímero de 140 kDa que se compone de dos subunidades idénticas de 70 kDa cada una. Parte de la secuencia cercana al extremo carboxílico comparte una elevada homología con una familia de proteínas conocidas como TGF- β , característica que comparte con otros factores de crecimiento y diferenciación, como la inhibina y la activina (Pepinsky *et. al.*, 1988). La mayoría de las proteínas de esta familia requieren de una activación proteolítica, pero la proteína completa del MIS induce la regresión de los conductos de Müller, sin embargo, en estudios *in vitro* en los cuales se utilizó el MIS generado por técnicas de ADN recombinante y sometido a proteólisis con plasminógeno se observan fracciones de 70, 57 y 12 kDa, se observó además que el MIS digerido

mantiene su actividad (Pepinsky *et. al.*, 1988). El patrón de aminoácidos que rodea el sitio activo del MIS y en particular la presencia de argininas en posiciones -1 y -4 conforman una secuencia que ha sido propuesta como señal para el procesamiento de ciertas prohormonas (Pepinsky *et. al.*, 1988).

2.2.3 Hormona inhibidora de los conductos de Müller y el ovario postnatal

La función más conocida del MIS es la regresión de los conductos de Müller, pero se ha postulado que esta hormona pudiera ejercer algún papel en el desarrollo del ovario. Lo anterior se deduce ya que este factor se ha localizado en las células de la granulosa (Vigier *et. al.*, 1984). En las hembras de ratones el MIS es detectado, al principio, en las células de la granulosa de folículos preantrales pequeños y continúa hasta localizarse en las células de la granulosa de folículos antrales y preantrales, aunque se encuentra ausente en los folículos primordiales y atréticos (Hirobe *et. al.*, 1992). En estudios realizados en la rata se observó que en los ovarios de adultos hay una disminución en la expresión del MIS en los folículos preovulatorios justo antes de la ovulación cuando los ovocitos terminan el arresto meiótico (Ueno *et. al.*, 1989).

En otro estudio realizado en rata se observó que existía una cantidad abundante del mensajero del MIS en las células de la granulosa de folículos antrales pequeños, en las cuales existe una gran actividad mitótica de las células de la granulosa. Cuando el folículo inicia su crecimiento las células de la granulosa más alejadas del ovocito dejan de dividirse

y de expresar el mensajero del MIS; mientras que, las más cercanas al ovocito continúan expresándolo (Hirobe *et. al.*, 1992; Ueno *et. al.*, 1989).

Por otra parte, se sabe que los efectos intracelulares de la FSH pueden ser modificados por péptidos intraováricos y esteroides que tienen una función paracrina o autócrina; un ejemplo de esto es el MIS (Meunier *et. al.*, 1988). Hirobe y colaboradores en 1992 realizaron experimentos de Northern Blot e hibridación *in situ* en los cuales observaron que el MIS está restringido a las células de la granulosa de folículos antrales pequeños y preantrales, pero no en folículos preovulatorios. Con base en lo anterior proponen que el MIS pudiese ejercer una función regulatoria del crecimiento función similar al TGF- β durante el desarrollo temprano del folículo.

2.3 Fisiología del ovario postnatal

2.3.1 Generalidades

a) Irrigación e inervación

Los ovarios se encuentran localizados en la cavidad abdominal, cubiertos por un epitelio superficial, el cual se encuentra en constante ruptura y reparación y que genera un espacio periovárico. En el caso del ratón y la rata dicho epitelio superficial permite el intercambio de líquidos entre ambos tejidos (Zukerman y Weir, 1977).

La irrigación se realiza por medio de la arteria ovárica y ramas de la uterina, mientras que la salida se realiza por una red de vénulas, las cuales rodean a las arterias provocando una estrecha relación entre ellas. Existen también terminales nerviosas simpáticas y parasimpáticas, pero su papel en el desarrollo del ovario aún se desconoce (Baird, 1982).

b) Componentes celulares

El ovario adulto se compone de tres unidades funcionales: el estroma, el folículo y el cuerpo lúteo, estructuras que se encuentran en cambio continuo. El estroma deriva del mesénquima o de la región proveniente del mesonefros y forma la matriz celular en donde se encuentran distribuidos los folículos, los cuales al madurar provocan una diferenciación del tejido estromático en células de la teca y de la granulosa (Baird, 1982).

Los folículos, que constituyen la unidad funcional del ovario, se encuentran

distribuidos a lo largo y a lo ancho del ovario, al madurar éstos tendrán varios tipos celulares que rodean al ovocito. Las células de la granulosa están separadas de las células de la teca por una membrana basal. Las células de la teca, se localizan alrededor del folículo y se dividen en teca interna y externa, las primeras están irrigadas y permiten el flujo hacia el folículo de los nutrientes y péptidos necesarios para la función adecuada del ovario (Baird, 1982).

El cuerpo lúteo se forma por células de la teca y de la granulosa después que ha ocurrido la ovulación. En los roedores el número de cuerpos lúteos presentes se encuentra directamente relacionado con la cantidad de ovocitos liberados (Austin *et. al.*, 1972).

2.3.2 Ovario infantil

Cuando el ratón nace, el ovario es un órgano sólido que posee células germinales y tejido estromático. En el ratón los ovocitos son pequeños y se han estacionado en profase meiotica durante la etapa embrionaria a los 17 d.g., como se mencionó en el punto 2.1.2, pero al momento de nacer algunos aún se encuentran en la fase transitoria de la profase de la primera división meiótica (paquiteno y diploteno), (Peters, 1969).

Jones y Krohn en 1961 propusieron una clasificación de los folículos del ovario, basada en el tamaño y el número de células de la granulosa que los componen y los dividieron en: folículos pequeños (tipo 1,2 y 3a, figura 2), folículos preantrales (tipo 3b,4,5a y 5b, figura 2) y folículos antrales (tipo 6,7 y 8, figura 2) (Peters, 1969).

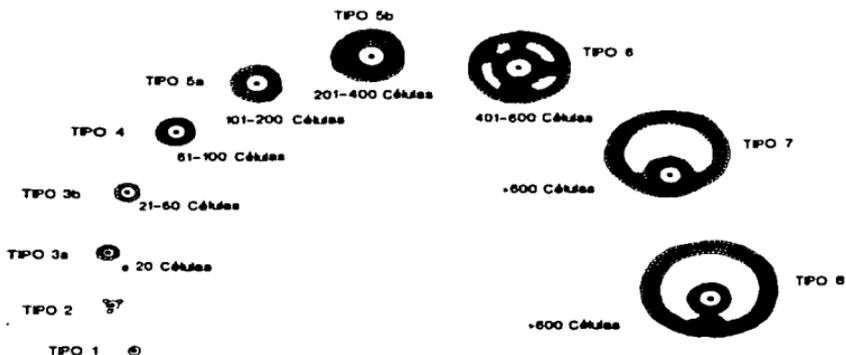


Figura 2. Esquema que describe el desarrollo del folículo, se muestra la clasificación de los mismos en base a su tamaño y madurez (Modificado de: Peters H., 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity, Acta Endocrinológica, 62:98-116).

a) Folliculogénesis y crecimiento

A los 7 dpp se observan los siguientes cambios en el ovario de ratón: todos los ovocitos se encuentran bien separados, tienen bordes celulares bien definidos y sus núcleos se encuentran en la fase estacionaria de la meiosis (dictiatio). El crecimiento del ovocito se inicia en la vida postnatal (Peters, 1969).

A los 7 dpp se empiezan a observar folículos jóvenes en los cuales los ovocitos se encuentran rodeados por una o dos capas de células de la granulosa. En esta etapa se inicia la formación de la membrana basal y la proliferación de células de la teca. Al concluir la primera semana, se observa en algunos folículos un desarrollo claro de la teca; durante esta etapa se observan folículos hasta del tipo 3b como se observa en la tabla 2 (Peters, 1969).

A los 14 dpp los ratones se encuentran en etapas más avanzadas de desarrollo, los folículos se han desarrollado hasta el tipo 4 y 5a. La membrana basal ya se encuentra completamente cerrada y se observa una capa de células de la teca bien definida (Peters, 1969).

Durante la tercera y cuarta semanas de vida existen simultáneamente folículos en varias etapas de desarrollo en el ovario. El 90% del total de los folículos son del tipo 2 y 3a, aunque se observan folículos que ocupan la mayor parte de la corteza del ovario (Jones y Krohn, 1961).

Edad en días	Etapa de desarrollo / número de folículos			
	3a	3b	4	5a
7	375	141	-	-
14	479	155	125	31
21	461	163	113	54

Tabla 2. Desarrollo folicular, considerando el número de folículos en diferentes etapas del desarrollo. Tomado de: Peters H., 1969. The development of the mouse ovary from birth to maturity, *Acta Endocrinológica*, 62:98-116.

2.4 Esteroides gonadales

2.4.1 Clasificación

Los esteroides directamente involucrados en funciones a nivel de ovario, pueden clasificarse químicamente por su relación a una estructura base que se forma a partir de 3 anillos de ciclohexano y uno de ciclopentano, el cual se conoce como núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno o simplemente núcleo esteroidal (figura 3). Los esteroides ováricos se relacionan y pueden ser considerados como derivados químicos de los siguientes compuestos: colestano del cual derivan el pregnano, androstano y estrano. Por otro lado, se clasifican de acuerdo a sus efectos biológicos, en tres grupos: progestinas, andrógenos y estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

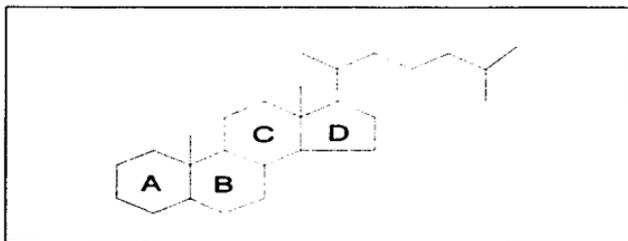


Figura 3. Estructura base de los esteroides

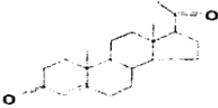
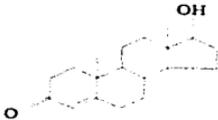
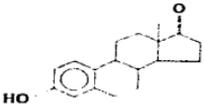
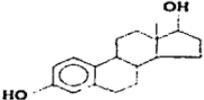
P R O G E S T I N A S	 <p>PREGNENOLONA (C-21)</p>	 <p>PROGESTERONA (C-21)</p>
A N D R O G E N O S	 <p>ANDROSTENDIONA (C-19)</p>	 <p>TESTOSTERONA (C-19)</p>
E S T R O G E N O S	 <p>ESTRONA (C-18)</p>	 <p>17-β - ESTRADIOL</p>

Tabla 3. Principales esteroides sintetizados por el ovario.

2.4.2 Biosíntesis

Fisiológicamente los estrógenos, la estrona y el 17β -estradiol, son los esteroides foliculares más importantes, además la androstendiona y testosterona son los precursores biosintéticos inmediatos de estos esteroides estrogénicos. La pregnenolona es la progestina más importante producida por el folículo, debido a su posición clave como precursora de todas las hormonas esteroides. El paso limitante en la biosíntesis de andrógenos por el folículo, como en todos los órganos secretores de andrógenos, es la enzima $P450_{17\alpha}$ (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

En las gónadas, la biosíntesis de esteroides se inicia con la síntesis del colesterol, del cual la mayor proporción proviene del hígado por vía sanguínea, otra parte se obtiene mediante la absorción intestinal y una cantidad pequeña es sintetizada en la gónada a partir del acetato. El colesterol entra a las células esteroidogénicas acoplado a complejos proteicos conocidos como lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), las cuales interactúan con receptores de membrana. Una vez internalizadas éstas, el colesterol se libera rápidamente y es utilizado, o bien, almacenado en forma de ésteres en el citoplasma. En las figuras 4 y 5 se muestra la síntesis de estrógenos por parte del ovario y las enzimas involucradas en el proceso.

Estudios sobre el origen del colesterol, que es utilizado en la síntesis de esteroides -específicamente la progesterona- han demostrado que la principal fuente de este

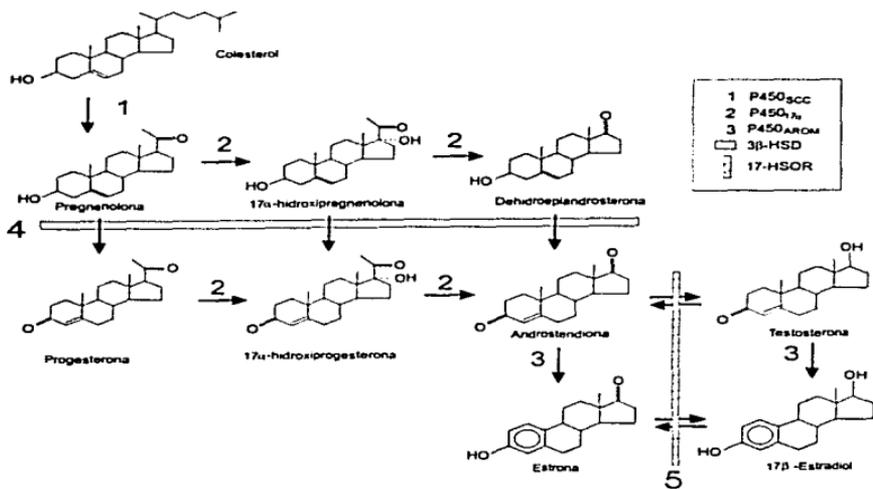


Figura 4. Biosíntesis de esteroides a partir del colesterol, en donde se observan las principales enzimas involucradas en este proceso: 1. Enzima 20,22 desmolasa (P450_{scc}), 2. Enzima 17 α hidroxilasa (P450_{17 α}), 3. P450 aromatasa (P450_{arom}), 4. Enzima hidroxiesteroide deshidrogenasa (β -HSD) y 5. 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17-HSOR). (modificado de: Adashi E. y Leung P.1993. The Ovary. Raven Press Inc. New York).

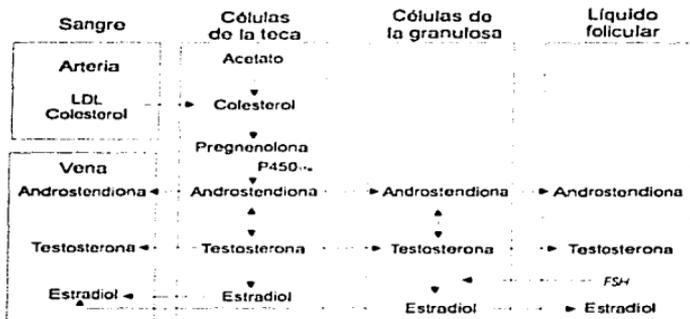


Figura 5. Biosíntesis de esteroides en el ovario. Modificado de: Baird T. 1982. The Ovary. En: *Reproduction in mammals, Vol 3. Hormonal control of reproduction*. Editado por Austin C.R. y Short R.V. Segunda edición, Cambridge University Press, Cambridge.

metabolito son las lipoproteínas del suero en lugar de la síntesis de *novo* a partir de acetato (Tureck y Strauss, 1982; Carr *et al.*, 1981). Se ha demostrado en el humano que existe la necesidad de LDL para una síntesis óptima de progesterona, en otras especies como en los bovinos y borregos se ha observado que ésta se da también a partir de HDL (Hinshelwood *et al.*, 1993)

Las moléculas generadas en la biosíntesis de estrógenos en el folículo ovárico

requieren de una reducción en el número de átomos de carbono de su precursor el "colesterol" como se observa en la figura 4; esto ocurre mediante una serie de reacciones de hidroxilación que son catalizadas por tres proteínas que son: 1. La citocromo P450 liasa de cadena lateral dependiente de citocromo P450 (P450_{scc}) ó 20,22 desmolasa, 2. Citocromo P450 17- α -hidroxilasa (P450_{17 α}) y 3. Citocromo P450 aromatasa (P450_{arom}); cuyos genes se encuentran agrupados en una super familia (dividida en 12 familias) que es conocida como citocromos P450 (Hinshelwood *et. al.*,1993;Youngblood *et. al.*,1991; Nelson *et. al.*,1993).

De las dos posibles vías enzimáticas (Δ^4 y Δ^5) la vía que se favorece para la conversión de colesterol a andrógenos en las células de la teca de humanos (Aakvaag, 1969) y en bovinos (Lacroix *et. al.*, 1974) es la vía Δ^5 ; la dehidroepiandrosterona producida por esta vía luego es metabolizada a androstendiona (figura 4).

2.4.3 Papel de las gonadotropinas

La hipófisis anterior produce al menos 6 hormonas trópicas, cuya función principal es regular glándulas endócrinas, de las cuales 2 ejercen una actividad reguladora en la gónada de mamíferos y se conocen como gonadotropinas: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas gonadotropinas participan en la

regulación de los procesos esteroideogénicos del ovario. En los mamíferos las principales células involucradas en la esteroideogénesis folicular son de dos tipos (Gore-Langton y Armstrong, 1988):

- Células sensibles a la LH, las cuales se forman por las células de la teca del folículo y las células intersticiales del estroma ovárico.
- Células sensibles a la FSH, estas se constituyen exclusivamente por células de la granulosa, las cuales al madurar adquieren la habilidad de responder a la LH.

Las gonadotropinas FSH y LH aumentan la actividad de las enzimas esteroideogénicas en las células de la teca y de la granulosa después de interactuar con su receptor y activar procesos vía AMPc. Esto tiene como consecuencia una mayor síntesis y acumulación de esteroides en la circulación así como en el líquido folicular (Ireland, 1987).

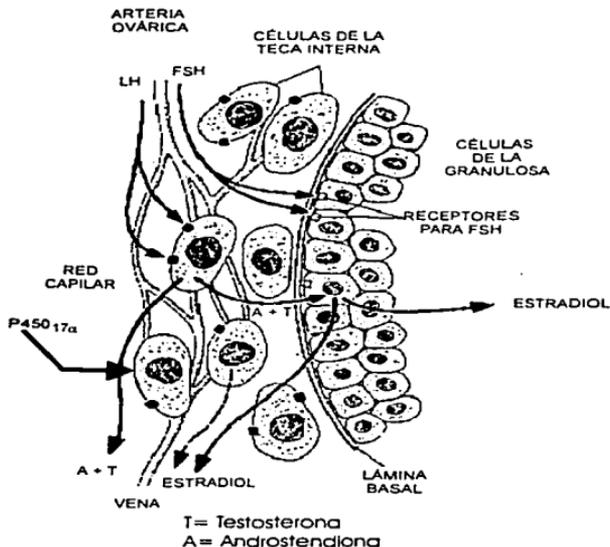


Figura 6. Diagrama que muestra la acción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) en el folículo, así como las células en donde se localiza la proteína P450_{17α} y la síntesis de esteroides (Modificado de: Baird T. 1982 *The Ovary in Reproduction in mammals* Vol 3. Hormonal control of reproduction editado por Austin C.R. y Short R.V. Segunda edición, Cambridge University Press, Cambridge).

2.5 IMPORTANCIA DE LA ENZIMA P450_{17 α}

2.5.1 Características

La P450_{17 α} pertenece a una familia de enzimas que participan en el metabolismo de numerosos compuestos endógenos como: esteroides, ácidos biliares, ácidos grasos, prostaglandinas, leucotrienos y aminas biogénicas. Muchas de estas enzimas también participan en el metabolismo de una gran gama de moléculas exógenas como: fármacos, contaminantes atmosféricos y alcoholes (Nelson *et. al.*, 1993). Es importante hacer notar que la nomenclatura de esta enzima varía en muchas de las referencias utilizadas (17 α hidroxilasa, P-450_{17 α /17-20 liasa}, P450 17 α hidroxilasa/C17-20), por lo que se decidió utilizar en este trabajo la nomenclatura sugerida por el "P450 Nomenclature Committee" para nombrar la P450_{17 α} (Nelson *et. al.*, 1993).

La P450_{17 α} cataliza dos reacciones, la primera es una hidroxilación (en el carbono 17) de la Δ^4 -progesterona o la Δ^5 -pregnenolona; estos productos además de ser precursores de esteroides gonadales son precursores, en la corteza adrenal, del cortisol. La segunda, es un corte de la cadena lateral del carbono 20 del núcleo esteroideal (función 17,20 liasa), lo que resulta en la formación de ácido fórmico y androstendiona o dehidroepiandrosterona, precursores de testosterona y estrógenos. Se ha observado que en la mayoría de las especies, incluyendo al humano y al bovino, la P450_{17 α} favorece más a la conversión de 17- α -hidroxipregnenolona a dehidroepiandrosterona que a la

conversión de 17- α -hidroxiprogesterona a androstendiona (Fevold *et. al.*, 1989; Chung *et. al.*, 1987). Este paso enzimático está sujeto a regulación hormonal y es uno de los puntos clave en el control folicular de la secreción de esteroides (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Chung *et. al.*, 1987).

La P450_{17 α} para catalizar sus reacciones requiere un donador de electrones que es la flavoproteína reducida NADPH-citocromo P450 reductasa, localizada en el retículo endoplásmico de las células esteroideogénicas. El gen que codifica para la P450_{17 α} de ratón (*Cyp-17*) se ha aislado y caracterizado y posee una secuencia en el sitio de inicio de la transcripción que es regulada por AMPc (Youngblood y Payne, 1992).

En estudios de inmunohistoquímica en ovario de rata se ha localizado la P450_{17 α} en células de la teca interna y en células intersticiales, en las cuales se lleva a cabo la producción de androstenediona en el ovario. De igual manera, se ha observado que la baja en la producción de estrógenos, que ocurre justo antes de la ovulación, es consecuencia de la degradación de la enzima y no por disminución de su actividad (Ishimura *et. al.*, 1990).

2.5.2 Regulación

En estudios realizados en células de Leydig de ratón adulto se observó que el AMPc es esencial para la expresión del ARNm de la P450_{17 α} y que además existe un efecto represor de la testosterona sobre la síntesis del mensajero. Por el contrario, el

estradiol no produjo el mismo efecto (Payne y Linli, 1991; Youngblood y Payne, 1992). Dicho estudio también demostró que se requieren mediadores proteicos sintetizados "de novo", cuya naturaleza se desconoce hasta el momento, para que el AMPc induzca el mensajero para la P450_{17 α} (Youngblood y Payne, 1992; Zuber *et. al.*, 1986).

Existe una expresión constitutiva de la 3 β HSD y P450_{scc}, mientras que la expresión del mensajero para P450_{17 α} depende totalmente de la estimulación continua mediada por AMPc (Payne y Linli, 1991). En estudios realizados en testículo de ratón que carecen de gonadotropinas endógenas (hpg), se ha demostrado que las gonadotropinas no son necesarias para la actividad basal de las enzimas P450_{17 α} y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. En este modelo se observaron niveles bajos de actividad para la P450_{17 α} , sin embargo, al administrar LH se incrementó 11 veces la actividad de la P450_{17 α} por lo cual se propone que la síntesis de esta enzima es dependiente de LH. En estos estudios se demostró que la P450_{17 α} depende de la estimulación por LH para manifestar su actividad y que es altamente sensible a la presencia de LH (O'Shaughnessy, 1991; Bogovich y Richards, 1982). Por otro lado, se observó que en testículos de ratas hipofisectomizadas existe una disminución en la actividad de la P450_{17 α} con respecto al control (Purvis *et. al.*, 1973).

2.6 Características de la cepa B6.Y^{POS}

2.6.1 Origen y proporción de los sexos

Eicher y colaboradores en 1982 reportaron que la transferencia del cromosoma "Y" del ratón *Mus musculus poschiavinus* (POS) a la cepa *Mus musculus musculus* (C57BL/6J) da origen a un número de hembras mucho mayor a lo esperado en una camada normal. Sin embargo, al hacer un análisis de los embriones B6.Y^{POS} de 14 y 16 días de gestación (d.g.) encontraron que la mitad de los embriones genotípicamente XY presentaban ovarios bilaterales y la otra mitad se desarrollaba como hermafroditas, con un ovario o un ovotestis (gónada con tejido ovárico y testicular) o con dos ovotestis. De tal forma que por definición, no existen machos normales en la etapa embrionaria en esta cepa (Eicher y Washburn, 1986). En la figura 7 se muestra un diagrama que ejemplifica lo anterior. Es importante hacer notar que la cantidad de tejido testicular puede variar y dar origen a machos con testículos bilaterales que son capaces de fertilizar hembras B6, para mantener la producción de hembras XY.

Eicher y colaboradores en 1982 concluyeron, en base a sus trabajos, que el desarrollo anormal que ocurre en el B6.Y^{POS}, es debido a que el gen determinante del testículo del *M. poschiavinus* (Tdy^{POS}) interactúa inadecuadamente con un gen putativo y recesivo del B6, denominado gen autosómico determinante del testículo (Tda-1) (Eicher y Washburn, 1986 y Nagamine *et. al.*, 1987) o bien, por un gen T-asociado a la reversión

del sexo (Tas) localizado en el cromosoma 17 (Washburn y Eicher ,1983; Eicher y Washburn, 1986).

Mus musculus poschiavinus (POS) X *Mus musculus musculus* (C57BL/6J)

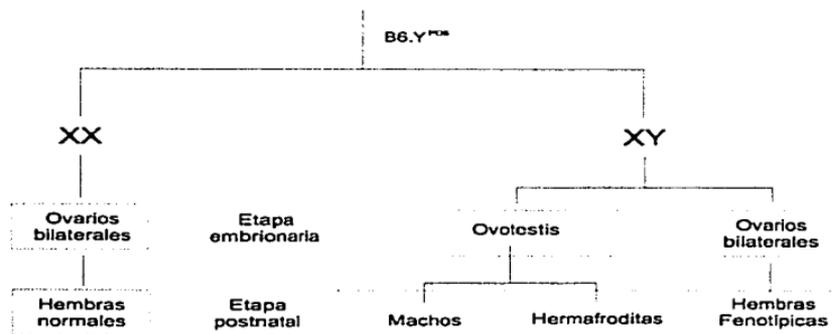


Figura 7. Esquema del origen del B6.Y^{POS}

Existen dos propuestas para explicar el posible papel del Tda-1 en este efecto (Eicher y Washburn, 1986): la primera menciona que el Tda-1 puede ser un elemento de la cascada que lleva a la diferenciación testicular y la segunda que existe un gen

determinante del ovario que actúa antes en el B6 que en el Y^{POS} .

Palmer y Burgoyne (1991) realizaron experimentos mediante los cuales demostraron que el cromosoma Y^{POS} causa un retraso de 14 horas en el inicio de la formación de cordones testiculares con respecto al cromosoma "Y" de la cepa B6. Así mismo, proponen que las anomalías en este modelo son consecuencia de un inicio tardío en la función del Td Y^{POS} .

En la gónada del B6. Y^{POS} a los 11 d.g. el inicio de la expresión del Sry es normal, mientras que los eventos moleculares subsecuentes como son la inactivación de este gen y el inicio de la expresión de genes como el de la P450_{17 α} , la aromatasa y el MIS se retrasan, lo que provoca un desarrollo testicular anormal (Lee y Taketo, 1994). Se ha propuesto que el retraso en el desarrollo no es programado por el cromosoma Y^{POS} directamente, sino que por el contrario, el problema puede ser a nivel de traducción o expresión de genes como resultado de una interacción inadecuada entre el Sry y sus moléculas blanco. La causa específica de esta reversión sexual no se ha esclarecido completamente y los estudios aún continúan.

2.6.2 El ovario B6. Y^{POS}

En observaciones morfológicas, se ha visto que el ovario XY es indistinguible del XX

entre los 12 y 16 d.g. Sin embargo, a los 17 y 19 d.g. en el primero, todos los ovocitos de la médula degeneran mientras que los de la corteza permanecen y posteriormente forman folículos (Taketo-Hosotani *et. al.*, 1989).

Las hembras con genotipo XY poseen ovarios bilaterales y se ha observado que copulan pero no llevan a término la preñez (Eicher *et. al.*, 1982; Taketo-Hosotani *et. al.*, 1989). Los ovocitos liberados por el ovario B6.Y^{POS} pueden ser fertilizados eficientemente e iniciar el desarrollo, pero todos los embriones mueren durante periodos tempranos de preimplantación, lo cual ocurre generalmente en etapa de dos células (Merchant-Larios *et. al.*, 1994). Las hembras XY carecen de un ciclo estral regular y permanecen en un estado de diestro permanente (Taketo-Hosotani *et. al.*, 1989).

Se ha propuesto que el problema de la hembra XY es a nivel de ovario, ya que al transplantar ovarios XY a individuos XX y viceversa, se observó en las hembras XY -con ovarios transplantados de hembras XX- un ciclo estral regular y en el caso de las hembras XX con ovarios XY se detuvo el ciclo estral regular. Con estos resultados se concluyó que la glándula pituitaria de hembras XY puede responder normalmente a las señales producidas por el ovario (Taketo-Hosotani *et. al.*, 1989).

Eicher y Washburn en 1986 observaron que se podía inducir la ovulación con PMSG y gonadotropina coriónica humana (hCG); con estos resultados proponen que una de las posibles causas de la infertilidad es la función endócrina inadecuada del ovario de las hembras B6.Y^{POS}. Existe una muerte precoz de ovocitos en la región medular que evita la

formación de folículos, lo cual trae una diferenciación anormal de las células esteroideogénicas (Taketo-Hosotani, *et. al.*, 1989). Se ha observado que el ovario XY produce niveles menores de esteroides que los observados para el XX del periodo neonatal hasta la pubertad; de igual manera el ovario XY no responde a las gonadotropinas para producir progesterona y testosterona (Villalpando *et. al.*, 1993). En este estudio también se observó que la baja actividad esteroideogénica del ovario XY no se puede atribuir a la cantidad de tejido ya que no se observan diferencias en el contenido de proteínas al comparar los ovarios XX y XY (Villalpando *et. al.*, 1993).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

3.1 Planteamiento del problema

El cromosoma "Y" induce la diferenciación testicular, sin embargo, cuando la cepa del ratón *Mus musculus poschiavinus* (POS) se cruza con la cepa *Mus mus musculus* (B6) la descendencia XY (B6.Y^{POS}) desarrolla ovotestis y ovarios en la vida fetal, pero nunca testículos normales. Algunos machos son fértiles, sin embargo la hembra XY a pesar del fenotipo normal produce niveles bajos de progesterona, testosterona y 17 β - estradiol y además es infértil. El ovario infantil no puede incrementar la síntesis de testosterona en presencia de PMSG, probablemente debido a que hay un número pequeño de receptores a gonadotropinas, o bien, a una deficiencia enzimática en la síntesis de este andrógeno. Tomando en cuenta lo anterior, se considera importante estudiar la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para la enzima P450_{17 α} , proteína determinante de la síntesis de esteroides en el ovario.

Se ha demostrado que el MIS se encuentra presente en ovarios postnatales y se ha relacionado con el desarrollo folicular, pero aún se desconoce su función específica, con base en los antecedentes descritos es importante determinar la ontogenia de este factor en el ovario XY. Para lograr lo anterior se plantea un estudio de la expresión del mensajero del MIS, a lo largo del desarrollo de las gónadas XX y XY para aportar elementos que nos hablen de su posible relación con la disfunción del ovario XY.

3.2 Hipótesis

En la cepa B6.Y^{POS}, los problemas de baja producción de testosterona así como los de infertilidad están relacionados con la síntesis de los mensajeros para la P450_{17α} y el MIS o con procesos que requieren la presencia de estos mensajeros en etapas tempranas del desarrollo postnatal.

4. OBJETIVOS

- Determinar el sexo genético de hembras B6.Y^{POS} por hibridación puntual.
- Analizar con la técnica de RT-PCR la expresión del ARNm de la enzima P450_{17α} en ovarios, de 1 a 15 dpp, de hembras B6.Y^{POS}, con genotipo XX y XY.
- Estudiar la ontogenia del ARNm para el factor inhibidor de los conductos Müllermanos entre ovarios posnatales XX y XY, de las edades arriba mencionadas, utilizando para ello RT-PCR.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Modelo biológico

Se utilizaron hembras B6.Y^{POS} de 1 a 15 dpp (lactantes), obtenidas a partir de la cruce de *Mus musculus poschiavinus* (POS) y *Mus musculus musculus* (C57BL/6J ó B6), las cuales estuvieron expuestas a 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Las madres fueron alimentadas con alimento LAB DIET[®] The Richmond Standard™, Mouse Diet de PMI Feeds Incorporated y se les proporcionó agua potable estéril para que bebiesen a voluntad.

5.2 Determinación del sexo genético por hibridación puntual

Por análisis de fragmentación de ADN con enzimas de restricción y clonación molecular se obtuvo una sonda denominada 145SC5 que reconoce secuencias repetidas de ADN en el cromosoma Y del ratón *mus musculus* (Nishioka, 1988). Esta sonda de 1.5 kilobases (kb) clonada en el plásmido pUC8 fue donada amablemente por el Dr. Nishioka de la Universidad McGill en Montreal, Canadá. El inserto se corta con la enzima de restricción EcoR1 que reconoce la secuencia palindrómica GAATTC3'.

5.2.1 Obtención de la sonda

El ADNc se digirió con la enzima EcoR1 de GIBCO, BRL durante tres horas a 37 °C y se centrifugó brevemente cada 20 minutos. Se preparó un gel de agarosa al 0.8% para

separar la sonda del plásmido para lo cual se colocaron 26 μ l de la muestra digerida en cada carril; en uno de ellos se incorporó un marcador de peso molecular, fragmentos de ADN del fago λ cortado con la enzima Hind III (*ADNA/HIND III Fragments*).

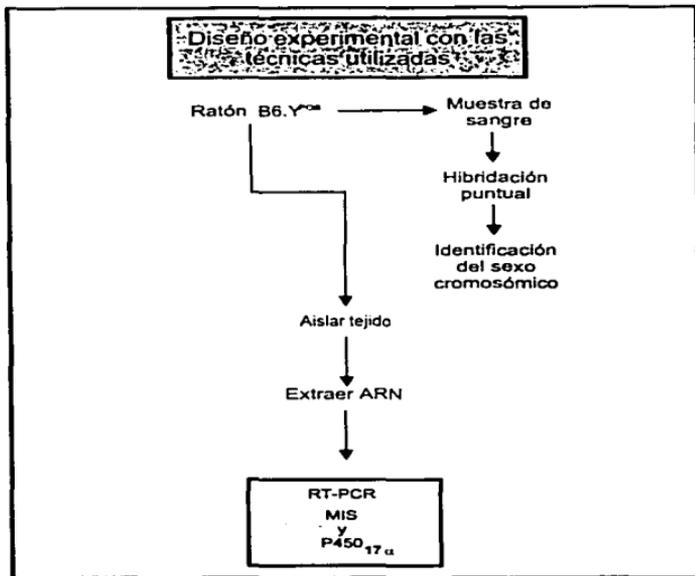


Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento experimental realizado.

Se realizó una electroforesis a 100 volts (v) por tres horas a temperatura ambiente.

El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio de 10 mg/ml, durante 10 minutos y las bandas se visualizaron en un transiluminador SIGMA T-1202 con luz ultravioleta. Se cortó el fragmento de agarosa que contenía la banda de peso molecular de 1.5 kb, la cual corresponde a la sonda (inserto Cy).

5.2.2 Electroelución

El fragmento Cy se colocó en una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 6000 a 8000 Daltons (D) con 500 μ l de amortiguador TBE pH 8.0 (TRIS 89 mM, ácido bórico 89 mM, ácido etilendiaminotetracético disódico (EDTA) 2.5 mM). Se realizó una electroelución una durante hora y treinta minutos a 100 v y a 4°C. Posteriormente el amortiguador se colocó en un tubo Eppendorf, se adicionaron: 15 μ l de NaCl 5M, 2 volúmenes de etanol absoluto y se precipitó por 24 horas a -20°C. La muestra se lavó con etanol al 70%, se centrifugó a 8000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, se decantó y resuspendió en 5 μ l de amortiguador TBE.

5.2.3 Determinación de la concentración de la sonda

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% y se aplicaron 6 μ l de la muestra eluida. Se realizó una electroforesis, bajo las condiciones descritas anteriormente. El gel se tiñó con bromuro de etidio (10 mg/ml) y la banda se comparó con un gradiente de diversas concentraciones de ADN de 50 a 300 ng.

5.2.4 Marcado de la sonda

La sonda se marcó con el kit **Random Primer** de GIBCO, BRL. Para el marcado se utilizaron 250 ng de la sonda como molde y se adicionaron secuencialmente los siguientes nucleótidos:

- 2 μ l de dCTP
- 2 μ l de dGTP
- 2 μ l de dTTP
- 5 μ l de [α - 32 P] dATP (Amersham).

Se agregaron 15 μ l del amortiguador incluido en el kit y 1 μ l del fragmento Klenow, se incubó dos horas a 25 °C.

La sonda se purificó en una columna de Sephadex G-50 en TE (TRIS 10 mM + EDTA 0.1 mM, pH 7.5). La columna se empacó en una jeringa de 1 ml y se centrifugó a 2000 rpm, 4 minutos. Se repitió dos veces este proceso hasta que se observó el nivel adecuado de Sephadex en la columna (5 cm). Se adicionó 0.1 ml de amortiguador TEN (TRIS 10 mM, EDTA 1mM, NaCl 100 mM a pH 8) y se centrifugó dos veces más. Se adicionó a la columna el volumen total de la muestra marcada (aproximadamente 50 μ l diluido a 150 μ l con TEN) y se centrifugó a 2000 rpm, 4 minutos a 4 °C. El residuo colectado corresponde a la sonda purificada. En un contador de emisiones β (modelo Tri-Carb 1500 de Packard) se determinó la cantidad de radioactividad incorporada en 1 μ l de muestra, ésta se cuantificó en cuentas por minuto (cpm).

5.2.5 Preparación de las membranas de hibridación

En una membrana de nylon cargada positivamente (Gene Screen Plus Membrane de DuPont), se colocaron 2 μ l de sangre de la cola de cada ratón. En las membranas se colocan aproximadamente 40 muestras de sangre como se muestra en la figura 9.

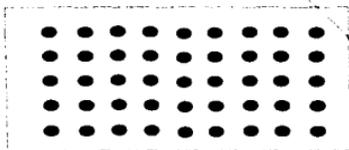


Figura 9. Representación de una membrana de hibridación, con las muestras individuales de sangre.

La membrana se homeó al vacío, en un horno NAPCO mod. 5831, 2 horas a 80°C y se desnaturalizó por tratamiento en NaOH 0.4 N y NaCl 0.5 M por 60 minutos. Posteriormente se neutralizó con TRIS 1 M pH 7.0, durante 60 minutos a temperatura ambiente.

5.2.6 Prehibridación

La membrana se prehibridó en una solución que contiene: formamida al 50%, sulfato de dextrán al 25%, NaCl 1M y SDS al 0.5%. Se desnaturalizaron 0.2 ml de ADN de

esperma de salmón (10 mg/ml) a 95°C y se adicionaron a la solución anterior. En una bolsa de plástico se colocaron la membrana y la solución de prehibridación, se selló por calor y se incubó en un baño de agua de 18 a 24 horas a 42 °C. Este procedimiento se resume en el diagrama de flujo de la figura 10.

5.2.7 Hibridación

Se desnaturalizó la sonda marcada durante 10 minutos a 95 °C y se enfrió inmediatamente en hielo con NaCl. Se agregó el volumen de solución de sonda equivalente a 5 millones de cpm a la solución de hibridación y la membrana obtenida en el paso anterior se dejó incubando toda la noche a 42°C.

5.2.8 Autorradiografía

La membrana se lavó dos veces con SSC 1X y SDS al 5% durante 25 minutos a 60 °C y se expuso a una placa fotográfica X-OMAT de Kodak, utilizando dos pantallas intensificadoras de DuPont, se almacenó a -70 °C por 24 horas y se reveló con la técnica de rutina: 5 minutos en revelador Dektol de Kodak, 5 minutos en agua, 5 minutos en fijador, 5 minutos en agua y finalmente 10 a 20 minutos de secado.

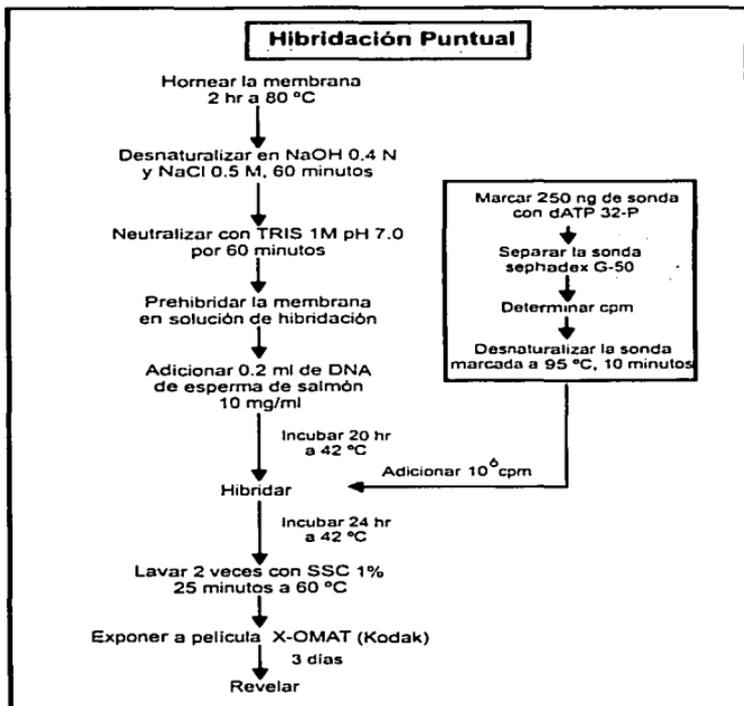


Figura 10. Diagrama de flujo que muestra las condiciones para la hibridación puntual.

5.3 Extracción y purificación de ARN

Para realizar esta separación se utilizó el reactivo TRIZOL[®] de Gibco, BRL, cuya preparación se basa en la técnica de extracción con tiocianato de guanidina descrita por Chomczynski y Sacchi, en 1987. El TRIZOL permite la extracción de proteínas y ADN de la misma muestra además de reducir considerablemente el riesgo de degradación del ARN (Chomczynski, 1993). El procedimiento se resume en la figura 11.

5.3.1 Homogeneización

Se homogeneizó el tejido en un homogeneizador (TRI-R; STIR-R, Modelo S63C), utilizando para ello 500 µl de TRIZOL[®] por cada par de gónadas y se dejó reposar el tejido 5 minutos a temperatura ambiente.

5.3.2 Separación de fases

Se adicionaron 100 µl de cloroformo a cada muestra, los tubos se agitaron 15 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos, finalmente se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos.

5.3.3 Precipitación

Se separó la fase acuosa (superior) y se le adicionaron 250 µl de isopropanol, se dejaron precipitar a temperatura ambiente por 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C.

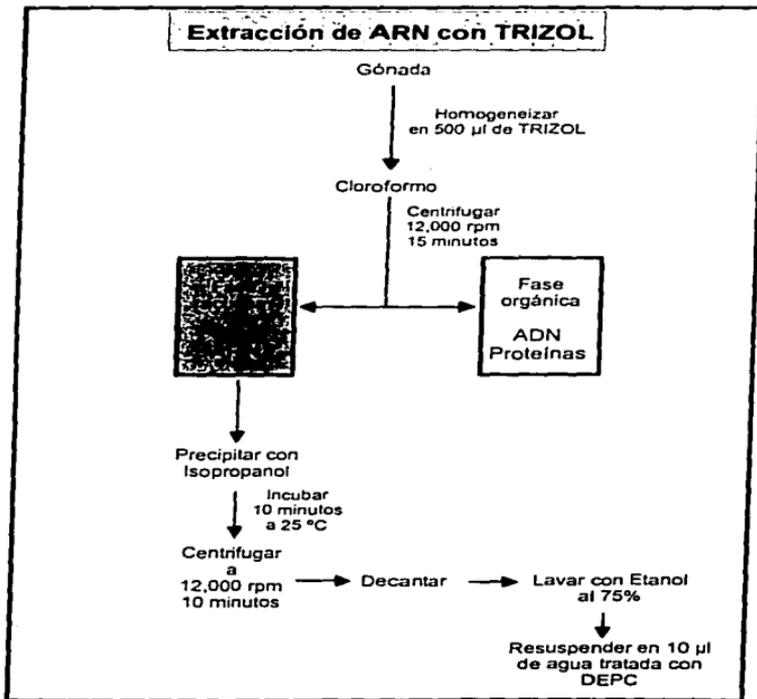


Figura 11. Diagrama de flujo de la técnica de extracción de ARN.

5.3.4 Lavados

Se decantó el contenido de cada uno de los tubos, se les adicionó 500 μ l de etanol al 75%, se agitaron ligeramente y se centrifugaron a 7,500 rpm por 5 minutos a 4 °C. Finalmente los tubos se decantaron y se secaron al vacío por 10 minutos. El ARN se resuspendió en 10 μ l de agua tratada con DEPC, las muestras se almacenaron a -70 °C.

5.3.5 Cuantificación del ARN

Se tomó una alícuota de 2 μ l de cada una de las muestras, las cuales se diluyeron 1:200 con agua tratada con DEPC. Se realizaron lecturas a 260 nm y 280 nm respectivamente, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro Beckam DU-600. Se determinó la concentración, así como la pureza de la muestra. Para lo cual se consideró que una densidad óptica de 1 equivale a 42 μ g/ml de ARN (Sambrook *et. al.*, 1989).

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa a partir de ARN (RT-PCR)

5.4.1 P450_{17 α}

Se obtuvo el ADNc a partir del ARN total, utilizando para ello el kit de PERKIN ELMER *Gene Amp*[®] RNA PCR Kit. Se utilizó el equivalente a 1 μ g de ARN total, el cual se desnaturalizó a 95 °C por 5 minutos, se le adicionó: solución de MgCl₂ (5mM), amortiguador (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.3), dGTP, dTTP, dCTP, dATP (1mM).

inhibidor de RNAsa 1U/μl, transcriptasa reversa MuLV 2.5 U/μl e iniciadores con secuencias al azar. Las muestras se introdujeron al termociclador Perkin Elmer 9600 con las condiciones que se muestran en la tabla 4.

Tiempo	Temp.
10 min	25 °C
60 min	42 °C
5 min	99 °C

Tabla 4. Condiciones del termociclador para la síntesis del ADNc.

Una vez concluido este ciclo se adicionó a cada tubo solución de MgCl₂ para tener una concentración final de 2mM, amortiguador, agua desionizada(estéril) y el equivalente a 2.5 U de Amplitaq[®] ADN polimerasa. Posteriormente se adicionó 1 μl de cada primer (OHasa-P1 y OHasa-P2), sintetizados en la Unidad de Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Secuencia de los oligonucleótidos	
OHasa-P1	5' GAG-AAC-AAG-GAT-CCG-ATA-CTG-ACT-ACC-ATA-CAG 3'
OHasa-P2	5' GTG-CAC-CAG-GAA-AGC-CAG-GAT-CCA-GTT-CAG 3'

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados para la P450_{17α}.

Las muestras se centrifugaron 30 segundos, posteriormente se incubaron en el termociclador con las condiciones indicadas en la tabla 6. En la figura 12 se resume el procedimiento utilizado para el RT-PCR.

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min
	55°C	15 seg
	72°C	30 seg
28	94°C	15 seg
	55°C	15 seg
	72°C	30 seg
1	94°C	15 seg
	55°C	15seg
	72°C	10 min

Tabla 6. Tiempos, temperaturas y ciclos utilizados para la amplificación de la P450_{17 α} .

a) Visualización de los productos

Se preparó un gel de agarosa al 1.5%; en cada carril se colocaron 15 μ l de los productos amplificados, en uno de ellos se colocó el marcador de peso molecular (pBR 322 / *Hinf* I). Se realizó una electroforesis a 100 v por tres horas a temperatura ambiente. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio de 10 mg/ml. Finalmente los productos se visualizaron en el transiluminador.

b) Fotografías

Los geles de agarosa se fotografiaron bajo luz ultravioleta, utilizando 35 seg de tiempo de exposición, posteriormente se revelaron con la técnica de rutina. Los negativos se positivaron en papel RP-4 marca Oriental.

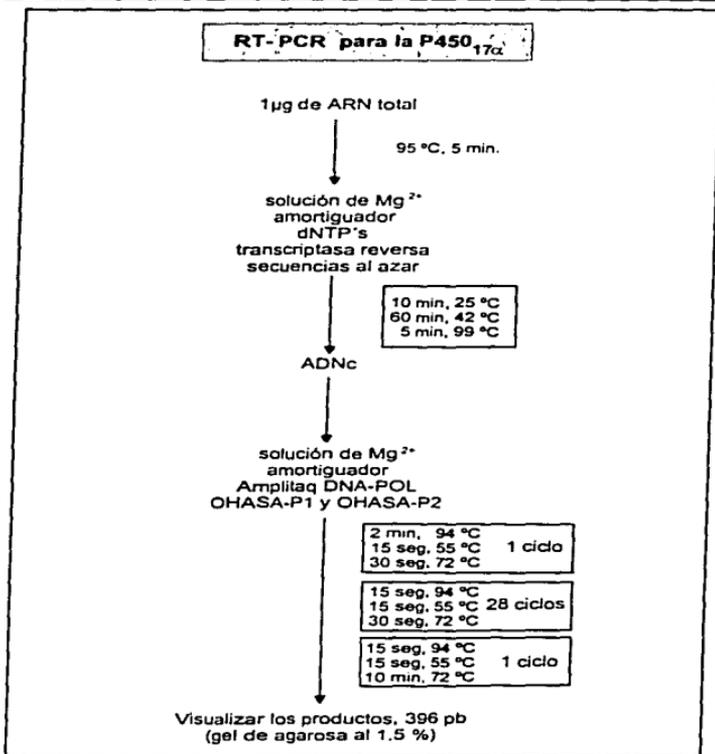


Figura 12. Diagrama de flujo de la amplificación por PCR a partir del ARN, de la P450_{17α}.

5.4.2 Hormona inhibidora de los conductos de Müller

La técnica utilizada fue la misma que la anterior pero con las siguientes modificaciones: los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con base en el ADNc para el MIS (Lee y Taketo, 1994). Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la tabla 7 y el número de ciclos para la amplificación del MIS fue de 29 (figura 13).

Secuencia de los oligonucleótidos para el MIS	
M1	5' TCC-TAC-ATC-TGG-CTG-AAG-TGA-TAT-GGG-AGC 3'
M2	5' CTG-AGG-GTG-GCA-CCT-TCT-CTG-CTT-GGT-TGA 3'

Tabla 7. Secuencia de los oligonucleótidos sintetizados para el MIS.

La visualización de los productos se realizó utilizando 15 µl de producto del PCR y siguiendo lo descrito para la P450_{17α}; las fotografías se tomaron bajo las mismas condiciones que lo descrito anteriormente para P450_{17α}.

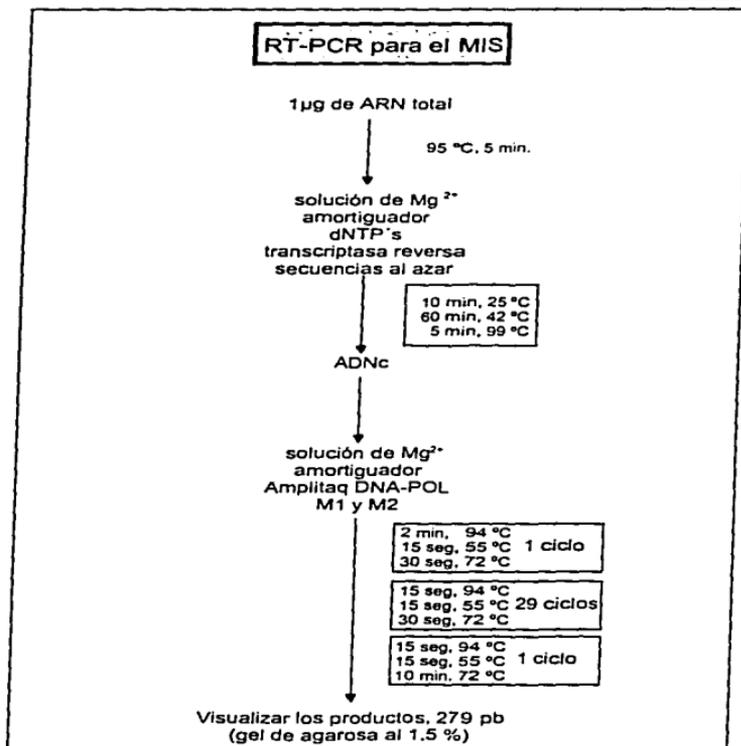


Figura 13. Diagrama de flujo de la amplificación por PCR a partir del ARN, del MIS.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de las hembras XY

La figura 14 muestra el patrón electroforético, en un gel de agarosa al 0.8%, del ADN que se utilizó como sonda para identificar a los individuos XY (Nishioka, 1988). Para localizar el fragmento de 1.5 kb, se incorporó en el carril 1 el ADN del fago λ digerido con la enzima *Hind III* (PM1) y en el carril 5 el ADN del plásmido pBR322 digerido con la enzima *Hinf I* (PM2), los cuales tienen fragmentos de ADN con peso molecular conocido. En el carril 2 se observa el ADN del plásmido pUC8 sin digerir (SD) y en el carril 3 las cuatro bandas que se obtienen al digerir este plásmido con la enzima de restricción *EcoRI* (D). Es importante hacer notar que el fragmento 145SC5 que se utilizó para la hibridación se observa a la altura de 1.5 kb en el carril 3.

En la figura 15 se presenta un ejemplo de los resultados obtenidos de una hibridación puntual con el fragmento de 1.5 kb antes mencionado utilizando la técnica descrita por Nishioka en 1988 con las modificaciones descritas en material y métodos. La figura 15 corresponde a una foto de la placa fotográfica revelada después de someterse a una exposición de 72 horas a la membrana hibridada con la sonda marcada con dATP [α - 32 P], en donde los puntos negros muestran los positivos, sangre que hibridó con la sonda 145SC5 y que en este caso corresponden a las hembras XY; además se incluyen controles positivos (machos) en cada membrana. Se hibridaron un total de 8 membranas en las cuales se observaron resultados consistentes a los mostrados en la figura 15.

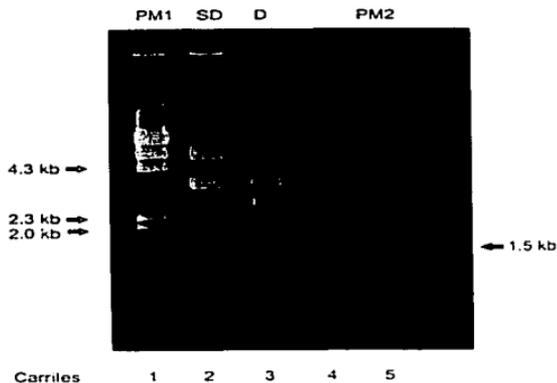


Figura 14. Gel de agarosa al 0.8% en TBE en donde se observa en el primer carril el marcador de peso molecular λ DNA/*Hind* III (PM1), en el segundo el DNA plasmídico sin digerir (SD), en el tercero se muestra el resultado de la digestión con *Eco*R1 (D) y en el quinto carril se muestra el marcador de peso molecular pBR 322/*Hinf* I (PM2). En el tercer carril (D) y a la altura de la banda de 1.5 Kb del marcador de peso molecular se observa la sonda utilizada para la hibridación puntual.

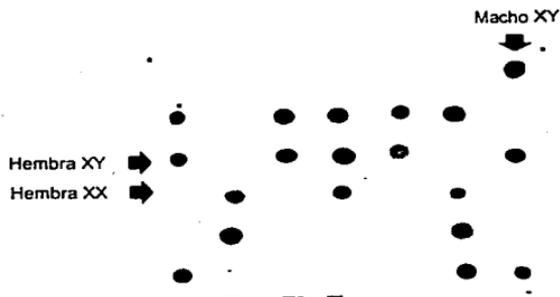


Figura 15. Hibridación puntual de muestras de sangre periférica del ratón B6.Y^{pos}. Los puntos indican la hibridación positiva con la sonda específica para el cromosoma Y (145SC5) presente en las hembras XY; los espacios en blanco corresponden a hembras XX. Se señala el control positivo macho XY.

6.2 Amplificación de los ARNm

6.2.1 P450_{17 α}

El fragmento esperado para el ARNm de la P450_{17 α} es de 396 pb (Lee y Taketo, 1994), lo cual se verificó utilizando los marcadores de peso molecular obtenidos a partir de la digestión del plásmido pBR 322 con *Hinf I* (que nos permite visualizar bandas de peso molecular del intervalo de 1631 a 154 pb) lo que se observa en el carril marcado como PM de la figura 16. La banda de la P450_{17 α} se observa a la altura de la banda 3 del marcador, misma que corresponde a 396 pb, lo cual es congruente con el tamaño esperado.

Los resultados del análisis de la expresión del ARNm para la P450_{17 α} por RT-PCR se muestran en las figuras 16 y 17. En el análisis realizado en las muestras menores a los 9 dpp tanto para los ovarios XX como para los XY no se detectó la presencia del mensajero. En la figura 16, se muestran los resultados obtenidos para las edades de 8 a 11 dpp en ovarios XX y XY, en el carril de extrema izquierda se observa el marcador de peso molecular, en los carriles siguientes se observan las muestras experimentales(+) de 8 a 14 dpp con su respectivo control sin transcriptasa reversa (-).

Desde 1dpp hasta los 8 dpp no se detectó el mensajero en los ovarios XX ni XY. A partir de los 9 dpp en el ovario XX se observó una banda muy tenue, mientras que en el ovario XY la banda no se visualizó. A los 10 dpp se vió una banda tenue del mensajero en el ovario XX, mientras que en el ovario XY no se detectó ninguna banda. A los 11 dpp el ARNm para la P450_{17 α} en el ovario XX es más intensa, pero aún el mensajero para esta

enzima esta ausente en el ovario XY.

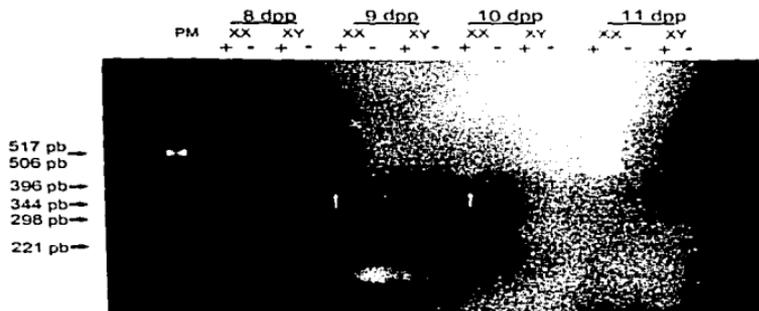


Figura 16. Amplificación por RT-PCR del ARNm para la P450₁₇, de los 8 a 11 dpp. Fragmentos observados en un gel de agarosa al 1.5%. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, pBR 322 digerido con *Hinf I* (PM). Los carriles con signo positivo (+) corresponden a muestras con transcriptasa reversa (RT) y los carriles con signo negativo (-) corresponden al control sin RT.

En la figura 17 se muestran los resultados del PCR de las edades de 12 a 20 dpp para la P450_{17 α} . A los 12 dpp se observa por primera vez durante el desarrollo postnatal del ovario XY el mensajero para la P450_{17 α} , aunque la banda que se observa es muy tenue. Como se observa en la figura 17 el mensajero en el ovario XY aumenta gradualmente hasta los 14 dpp, edad en la que aparecen con la misma intensidad tanto para el XX como para el XY. A los 15 y 20 dpp la banda del producto de la amplificación también se detecta.

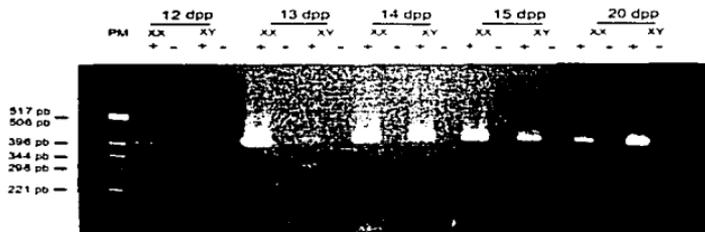


Figura 17. Amplificación por RT-PCR del ARNm para la P450_{17α} de los 12 a los 20 dpp. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, pBR 322 digerido con *Hinf I* (PM). Los carriles con signo positivo (+) corresponden a las muestras con transcriptasa reversa (RT) y los carriles con signo negativo (-) corresponden al control sin RT. En todos los ovarios XX se detectó la banda del ARNm para la P450_{17α}.

6.2.2 Hormona inhibidora de los conductos de Müller

Con la técnica descrita por Lee y Taketo en 1994 y con las modificaciones descritas en material y métodos se amplificó el fragmento de 279 pb, que en este caso corresponde al MIS; la banda que se observó en los geles de agarosa se localiza entre las bandas de 298 y 221 pb del marcador de peso molecular pBR322/*Hinf I*.

En la figura 18 se muestra el gel donde se presentan los resultados de la amplificación del MIS para las edades de 3 a 7 dpp. Se observa que el mensajero para el MIS se detecta a partir de los 4 dpp para el ovario XX y gradualmente aumenta su intensidad hasta los 6dpp. Es importante hacer notar que para el ovario XY a los 3 dpp se nota la presencia de una banda muy tenue, resultado que permaneció constante en varios ensayos realizados en esta edad. La banda para el ovario XY no se detecta a los 4 ni 5 dpp, mientras que para el ovario XX a los 4 y 5 dpp la banda se vió en forma tenue.

A los 6 dpp se observa una clara expresión de las bandas para el MIS tanto en el ovario XX como en el ovario XY. En la figura 19 se presentan los resultados de 8 a 12 dpp en donde se detectó un resultado positivo en todas las edades, pero se observa una gran irregularidad en la intensidad de las bandas, resultado que se aprecia hasta los 13 dpp, sin embargo, como se observa en la figura 20 (edades de 13 a 20 dpp), a partir de los 14 dpp se observa un aumento considerable en la intensidad en las bandas XX y XY.

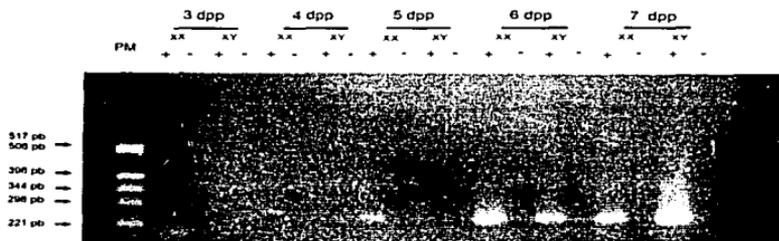


Figura 18. Amplificación por RT-PCR del ARNm para el MIS de los 3 a los 7 dpp. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, pBR 322 digerido con *Hinf I* (PM). Los carriles con signo positivo (+) corresponden a muestras con transcriptasa reversa (RT) y los carriles con signo negativo (-) corresponden al control sin RT. En los ovarios XX a partir de los 4 dpp detectó la banda. En el ovario XY se detectó una banda a los 3 dpp (banda tenue) y a partir de los 6 dpp se detecta en ambos genotipos.

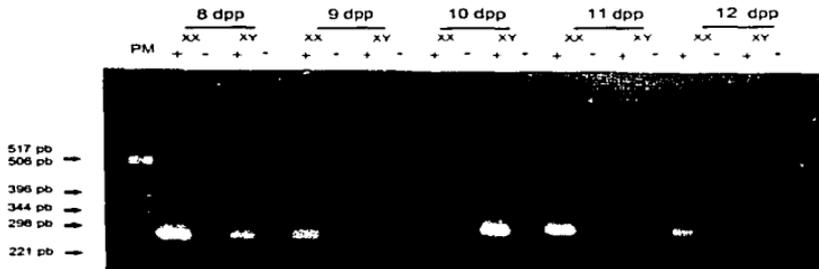


Figura 19. Amplificación por RT-PCR del ARNm para el MIS de los 8 a 12 dpp. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, pBR 322 digerido con *Hinf I* (PM). Los carriles con signo positivo (+) corresponden a muestras con transcriptasa reversa (RT) y los carriles con signo negativo (-) corresponden al control sin RT. En todas las edades, tanto en ovarios XX como XY, se detectó la banda del MIS. En estas edades se observa una gran variación en la intensidad de las bandas.

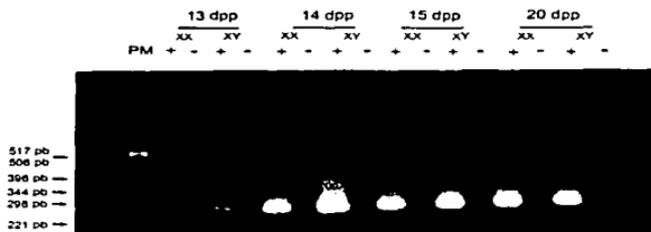


Figura 20. Amplificación por RT-PCR del ARNm para el MIS de los 13 a 20 dpp. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, pBR 322 digerido con *Hinf I* (PM). Los carriles con signo positivo (+) corresponden a muestras con transcriptasa reversa (RT) y los carriles con signo negativo (-) corresponden al control sin RT. A partir de los 14 dpp se observan intensidades similares tanto para ovarios XX como XY.

7. DISCUSIÓN

La hibridación puntual descrita por Nishioka en 1988 permite determinar con certeza el sexo genético de las hembras B6.Y^{POS} ya que utiliza una sonda específica (145SC5) que hibrida con un gen en el cromosoma Y. Una ventaja de esta técnica es que utiliza sangre periférica de ratón, lo que permite hacer la hibridación directamente sin la necesidad de extraer y purificar el ADN de la muestra, lo cual facilita el procesamiento simultáneo de un gran número de muestras. Con esta sonda se puede detectar hasta el 1% de contaminación de ADN de macho en una mezcla de ADN hembra-macho (Nishioka, 1988).

La variación en la intensidad de los puntos de hibridación observados en algunas muestras de las placas fotográficas, después de su exposición a las membranas de hibridación marcadas, es consecuencia probablemente del número de células, pero esto no interfiere de ninguna manera con el resultado ya que claramente se identifican las muestras positivas. Por otro lado, se ha demostrado que la especificidad de este ensayo permite una fluctuación en el número de células por punto entre 6 y 8 veces sin afectar la interpretación del resultado (Nishioka, 1988). Esta técnica es útil ya que en este trabajo fue necesario identificar a las hembras fenotípicas con genotipo XY y además los resultados obtenidos al hibridar las membranas fueron consistentes en todos los ensayos; lo anterior fue verificado al incluir en cada membrana machos normales como control

positivo.

La extracción de ARN por TRIZOL es una nueva versión de la técnica con tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo inicialmente descrita por Chomczynski y Sacchi, en 1987. El TRIZOL es una solución de una sola fase que contiene fenol, tiocianato de guanidina, amortiguador y agentes solubilizantes (Chomczynski, 1993). Este reactivo, que además de permitir la extracción simultánea de ADN y proteínas, resultó ser mejor que la técnica original empleada en el laboratorio descrita por Chomczynski y Sacchi, en 1987, ya que reduce el riesgo de degradación del ARN al reducir el tiempo de ensayo de 6 a 2 horas (dependiendo del número de muestras), así como el manejo de la muestra.

La reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), que amplifica el ADNc obtenido a partir de ARN por transcriptasa reversa, permite estudiar la expresión de genes importantes para diversos procesos fisiológicos. En este ensayo se utilizó el RT-PCR para evaluar la expresión del mensajero para la enzima P450_{17 α} y el MIS.

Para el diseño de los oligos para la P450_{17 α} se tomó como referencia la secuencia del ADNc publicado (Youngblood *et. al.*, 1991) y las condiciones de amplificaciones previas de este mensajero (Lee y Taketo, 1994). Para verificar que esta secuencia de oligos flanquea el fragmento del ADNc que se seleccionó, en estudios previos se sometió el producto de PCR a digestiones con las enzimas de restricción *Mae III* y *Taq I* y a

secuenciaciones parciales, experimentos con los cuales se verificó que los sitios de corte y los fragmentos resultantes correspondieran a lo esperado (Lee y Taketo, 1994). Para los oligos del MIS se utilizó la enzima *Alu I* y además se secuenció el producto de PCR (Lee y Taketo, 1994).

El número de ciclos seleccionados para la amplificación corresponde a un rango en el cual la amplificación es exponencial (Lee y Taketo, 1994). El objetivo de este estudio fue determinar si están o no presentes las bandas del ARNm para la P450_{17 α} en las edades estudiadas para de ahí establecer nuevas hipótesis de trabajo sobre la baja producción de esteroides por parte del ovario XY. Como control experimental de amplificación se incluyó en cada muestra de PCR, un control negativo, muestra de ARN a la cual no se le adicionó RT, lo cual permite verificar que los fragmentos amplificados no fueron producto de contaminación por ADN externo; así como para confirmar que la amplificación observada fue producto del ARN de la muestra.

Al analizar los productos de PCR obtenidos para la P450_{17 α} , observamos que este gen aparentemente está ausente en las edades menores a los 9 dpp en ambos ovarios. Para comprobar que este resultado negativo no se debió a que se empleó una cantidad pequeña de tejido, se utilizó 1 μ g de ARN total en cada una de las muestras estudiadas por PCR para así tener un valor inicial constante en todas las muestras analizadas. Además, se realizaron experimentos con 3 μ g de ARN total para tratar de ver la banda,

la cual no apareció en las edades mencionadas. Así mismo, las muestras que resultaron negativas (1 y 3 µg de ARN total) se sometieron a una reamplificación, lo cual también resultó negativo. Por otro lado, se realizaron experimentos con Hprt (gen constitutivo) en los cuales se observa amplificación de ARNm en esas edades por lo que se pudo establecer que el RNA extraído en esas edades no está degradado. Además, se observó la expresión del MIS en esas edades. Tomando en cuenta todo lo anterior se estableció que no existe expresión de ARNm para P450_{17α} de 1 a 8 dpp a niveles detectables con la técnica utilizada. La inexistencia de las bandas de la P450_{17α} en edades menores a los 9 dpp, indica que el mensajero no se está expresando o bien que existe una cantidad tan pequeña de producto amplificado que el gel de agarosa no permita su visualización lo cual es improbable ya que la sensibilidad del PCR teóricamente permite amplificar un gen a partir de una sola copia (Mullis, 1990; Erlich *et. al.*, 1991)

Así mismo, la ausencia en la expresión del ARNm para la P450_{17α} puede deberse a que durante la primera semana no se observan células de la teca en ovario de ratón. Al final de la primera semana existen algunos folículos en los cuales se observa la presencia de células de la teca que rodean a una membrana basal, lo cual es signo del desarrollo de la capa de células de la teca, ésto se observa entre los 7 y 10 dpp; en esta edad en el ratón hay dos o tres capas de células de la teca. En la segunda semana se observa claramente definida la capa de células de la teca que se empieza a engrosar por proliferación y se observan hasta tres capas de células (Richards *et. al.*,1980; Peters,

1969). Lo anterior puede explicar que la P450_{17 α} se exprese a partir de los 9 dpp en forma tenue en el ovario XX y esté ausente en el ovario XY hasta los 11 dpp ya que es en las células de la teca donde se localiza esta enzima (Ishimura *et. al.*, 1990). Es posible que el ARNm pudiera estar siendo transcrito o degradado de manera diferencial en el ovario XY.

En otro estudio de la esteroidogénesis en ovario de ratón, en el cual utilizan ratones *hpg*, los cuales carecen de gonadotropinas circulantes (O'Shaughnessy y Mannan, 1994), se observó que el ARNm para la enzima P450_{5CC}, enzima inmediata anterior a la P450_{17 α} , en la biosíntesis de esteroides (Figura 4) se expresa tenuemente durante la primera semana pero a los 8 dpp se detecta un incremento considerable en su expresión. Lo anterior podría indicar que a esta edad se presentan las señales que inducen la síntesis de esta enzima y posiblemente de la P450_{17 α} , efecto que se observa a partir de los 9 dpp para el ovario XX.

En resultados preliminares se ha visto que el factor de crecimiento semejante a insulina tipo I posiblemente está involucrado en la regulación de la síntesis de esteroides en el ovario de ratón (Villalpando-Fierro, datos sin publicar) y además se ha observado que la expresión del mensajero para el IGF-I se encuentra retrasada en la hembra XY de la cepa B6.Y^{POS} (Villalpando-Fierro *et. al.*, 1996).

También es importante mencionar que el mensajero para el receptor a FSH en roedores está presente desde el nacimiento pero no aparece completo sino hasta los 5 dpp (O'Shaughnessy *et. al.*, 1994). El mensajero para el receptor a LH, gonadotropina que regula la actividad de la P450_{17 α} , no se ha estudiado en ratón, sin embargo, en la rata el receptor completo se presenta entre los 5 y 7 dpp (Sokka *et. al.*, 1992).

La banda para la P450_{17 α} en el ovario XX a los 9 dpp es muy tenue y lo mismo ocurre a los 10 dpp (apenas visibles en los geles de agarosa) pero, ésta se observa con mayor intensidad a los 11 dpp lo cual podría sugerir que existe un aumento en la expresión del ARNm para la P450_{17 α} , posiblemente debido a que el desarrollo de la capa de células de la teca aumenta. Por el contrario, para el ovario XY la expresión del ARNm para la P450_{17 α} está retrasada tres días, esto puede ser una de las causas que los niveles de testosterona estén disminuidos en el ovario XY y no se incrementen en respuesta a las gonadotropinas a los 14 dpp (Villalpando *et. al.*, 1993).

A partir de los 14 dpp se observan bandas similares de la amplificación del mensajero para la P450_{17 α} para ambos ovarios, esto indica que el mensajero ya está presente en el ovario XX al igual que en el ovario XY. Una de las características de la cepa B6.Y^{POS} es que a los 14 dpp presenta niveles bajos de testosterona y no los incrementa en presencia de PMSG (Villalpando *et. al.*, 1993) una de las preguntas originada de esos resultados fue determinar si está o no presente el mensajero para

P450_{17 α} en esa etapa del desarrollo del ovario XY. Con los resultados de esta tesis se demuestra la presencia del mensajero para P450_{17 α} a los 14 dpp, sin embargo, no se puede descartar que el retraso observado en el ovario XY no afecte el desarrollo posterior del ovario, o bien que el mensajero no se traduce lo que puede originar los problemas de baja producción de esteroides. También es importante mencionar que el mecanismo que controla la expresión de este mensajero no se conoce (Youngblood y Payne, 1992, Payne y Lintl, 1991; Zuber *et. al.*, 1986), por otro lado, se ha demostrado que no existen diferencias significativas entre el ovario XX y XY en lo que respecta a la cuantificación del AMPc a los 14 dpp (Guerrero, 1994).

En estudios recientes en el ovario B6.Y^{POS} se ha visto que al tratar el ovario XY con PMSG no se incrementa la producción de testosterona (Villalpando *et. al.*, 1993). Por otro lado, el desarrollo folicular se promueve en el ovario XY con la administración de PMSG (Amleh *et. al.*, 1996). Tomando en cuenta que: el PMSG contiene una mezcla FSH y LH, que la síntesis de testosterona está regulada por LH y que la aromatasas y el desarrollo folicular están regulados por la FSH; se ha propuesto que la insensibilidad del ovario XY pudiera ser atribuida a la acción de la hGC/LH (Amleh *et. al.*, 1996). En el mismo estudio, se demostró que no existen diferencias en la unión de LH a receptores entre el ovario XX y XY, por lo que es probable que el defecto se presente en el mecanismo de transducción de señales. Nosotros detectamos únicamente un retraso en la expresión del mensajero para P450_{17 α} , sin embargo, no se puede descartar que ese retraso tenga efectos

irreversibles en el desarrollo folicular. Por otro lado, es importante determinar la actividad de la P450_{17 α} ya que ésta es regulada fuertemente por LH (O'Shaughnessy, 1991; Bogovich y Richards, 1982).

En los resultados presentados se demuestra la presencia del ARNm para el MIS a partir de los 4 dpp en el ovario XX, pero la banda se expresa con mayor intensidad a partir de los 6 dpp, mientras que para el ovario XY se observa una banda a los 3 dpp y no se vuelve a detectar hasta los 6 dpp, edad a partir de la cual se expresa en forma constante durante las etapas estudiadas. En estudios de hibridación *in situ* de ARN en ovario de ratón se detectó el MIS a partir de los 6 dpp (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991) y a partir de los 5 dpp en cantidades bajas en la rata (Baarends *et. al.*, 1995). Nuestros resultados muestran una expresión a partir de los 4 dpp en el ovario XX (en forma muy tenue) esto se puede deber a que el PCR es un método de amplificación a partir de un número muy pequeño de copias, lo cual permite visualizar un resultado que con otras técnicas sería difícil detectar. También, es importante mencionar que la expresión de la proteína del MIS así como su inmunoreactividad son dependientes del grado de madurez folicular y no necesariamente de la edad del animal (Josso *et. al.*, 1994; Münsterberg y Lovell-Badge, 1991).

Durante la primera semana del desarrollo postnatal en los folículos se inicia la proliferación de células de la granulosa (Peters, 1969), células en las que se ha detectado

la proteína y expresión del mensajero del MIS (Vigier *et. al.*, 1984; Ueno *et. al.*, 1989; Hirobe *et. al.*, 1992; Münsterbreg y Lovell-Badge, 1991) por lo que las variaciones en la intensidad de las bandas observadas hasta los 14 dpp y con mayor frecuencia de los 6 a los 12 dpp son probablemente consecuencia de la proliferación activa de células de la granulosa y de la variación en la madurez en cada uno de los ovarios. Esta intensidad puede deberse también a la presencia o ausencia de otros factores como péptidos que pueden estar regulando la expresión de este gen.

En esta investigación se observó que a partir de los 14 dpp las bandas del MIS aparecen con una intensidad similar, lo cual es debido probablemente a que para esta edad el número de células de la granulosa es mucho mayor y a que la mayor parte del ARN total extraído es el que proviene de células de la granulosa. Por lo anterior, en las edades de 14 dpp en adelante, la intensidad similar observada en las bandas podría deberse a un efecto de la gran cantidad de mensajero para el MIS presente en el ARN total extraído, puesto que, en este caso se alcanzaría la meseta en la amplificación. (Murphy *et. al.*, 1990; O'Shaughnessy y Murphy, 1993).

8. CONCLUSIONES

- El ovario XY presenta un retraso de 3 días en la expresión del ARNm de la P450_{17 α} con respecto al ovario XX.
- La expresión del ARNm para P450_{17 α} a los 14 dpp, en el ovario XX y XY, podría indicar que la baja producción de esteroides por el ovario XY en esta edad no es consecuencia de la ausencia en la expresión del ARNm para la P450_{17 α} , pero no se puede descartar que el retraso observado tenga efectos posteriores e irreversibles en la síntesis de andrógenos por parte del ovario XY.
- Se detectó la presencia del MIS tanto en el ovario XY como en el control XX, pero se observa un retraso así como una expresión irregular en el ovario XY. Lo anterior podría originar un desarrollo inadecuado del folículo.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aakwaag A. (1969). Pathway in the biosynthesis of androstendione in the human ovary in vitro. *Acta Endocrinologica*, **60**:517-526.

Adashi E. y Leung P. (1993). *The Ovary*. Raven Press. New York.

Amleh A., Ledee N., Saeed J. y Taketo T. (1996). Competence of Oocytes from the B6.Y^{DOM} Sex-Reversed Female Mouse for Maturation, Fertilization and Embryonic Development in Vitro. *Developmental Biology*, **178**:263-275.

Austin C., Short R. Baker T., Monesi V. y Sandlier (1972). Células germinales y fertilización. La prensa Médica Mexicana.

Baarends W., Uilenbroek J., Kramer P., Hoogerbrugge J., Van Leeuwen E., Themmen A. y Grootegoed A. (1995). Anti-Müllerian Hormone and Anti-Müllerian Hormone Type II Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovaries during Postnatal Development, the Estrous Cycle, and Gonadotropin-Induced Follicle Growth. *Endocrinology*, **136**(11):4951-4962.

Baird T. (1982). "The ovary" en: *Reproduction in Mammals*. Book 3. Hormonal Control of Reproduction. Editado por Austin C.R. y Short. Segunda edición Cambridge University Press. Cambridge .

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

Berta P., Hawkins J., Sinclair A., Taylor A., Griffiths B., Goodfellow P., y Fellous M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, **348**:448-450.

Blanchard M.G. and Josso N. (1974). Source of the anti-mullerian hormone synthesized by the fetal testis: Mullerian inhibiting activity of fetal bovine Sertoli cells in tissue culture. *Pediatric Research*, **8**:968.

Bogovich K. and Richards J. (1982). Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 α -hydroxylase and C17-20 lyase activities. *Endocrinology*, **111**(4):1201-1208.

Carr, B., Sedler R., Rochelle D., Stamalach M., MacDonald P., Simpson E. (1981).

Plasma lipoprotein Regulation of Progesterone Biosynthesis by human corpus luteum tissue in organ culture. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, **52:875-881**.

Cate R.L., Mattaliano R.J., Hession C., Tizard R., *et al.* (1986). Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *CELL*, **45:685-698**.

Chomczynski P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15(3):532-536**.

Chomczynski P and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162: 156-159**.

Chung B., Picado-Leonard J., Haniu M., Bienkowski M., Hall P., Shively J. y Miller W. (1987). Cytochrome P450c17 (steroid 17 α -hydroxylase/17,20 lyase): Cloning of human adrenal and testis cDNAs indicates the same gene is expressed in both tissues. *Biochemistry*, **84:407-411**.

Donahoe P., Ito Y., Price M., Hendren W. (1977). Mullerian inhibiting substance in human testes after birth. *Journal Pediatrics Surgery*, **12:323-330**.

Eicher E.M., Linda L Washburn, Whitney J Barry, Morrow E.K. (1982). *Mus poschiavinus* Y Chromosome in the C57BL/6J Murine Genome causes Sex Reversal. *Science*, **217:536-537**.

Eicher E.M and Washburn L. (1986). Genetic control of primary sex determination in mice. *Annual Review of Genetics*, **20: 327-360**.

Erich H., Gelfand D., Sninsky J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, **252:1643-1650**.

Fevold R., Lorence M., McCarthy J., Trant J., Kagimoto M, Waterman M and Mason I. (1989). Rat P45017 α from testis: Characterization of a full-length cDNA encoding a unique steroid hydroxylase capable of catalyzing both Δ^4 - and Δ^5 - steroid-17,20-lyase reactions. *Molecular Endocrinology*, **3: 968-975**.

Gilbert Scott F. 1994. Developmental Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers. Estados Unidos.

Gore-Langton y Armstrong D. (1988). Follicular steroidogenesis and its control. en: The physiology of reproduction. Editado por E. Knobil Niell J. et. al. Raven Press. Ltd. New York.

Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Münsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*, **346:245-250**

Guerrero S. (1994). Diferenciación y regulación de la actividad endócrina del ovario XY. Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM.

Hickman C., Roberts L., Hickman F. 1988. Integrated principles of zoology. Eight Edition. Times Mirror/Mosby College Publishing. 8. St Luis, MO.

Hing-Sing Yu. 1994. Human Reproductive Biology. CRC Press.

Hinshelwood M., Demeter-Arlotto M., Means G., Simpson E. 1993. Molecular Biology of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes in The Ovary. En: The Ovary. Editado por Adashi E. y Leung P. Raven Press Inc. New York

Hirobe S, He W, Lee M y Donahoe P. (1992). Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*, **131:854-862**.

Ireland J. (1987). Control of follicular growth and development. *Journal of Reproduction Fertility Supplement*, **34:39-54**

Ishimura K, Yoshinaga-Hirabayashi T., Tsuru H., Kominami S., Takemori S y Fujita H. (1990) Immunocytochemical and biochemical studies on the localization and changes of 17- α -hydroxylase/C17-C20 lyase activity in immature rat ovary treated with PMSG and hCG. *Histochemistry*, **94:225-229**

Jones E., y Krohn (1961). The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *Journal of Endocrinology*, **21:469-494**.

Josso N., Imbeaud S., Picard J. The gene for Anti-Müllerian Hormone (1994). En: Molecular Genetics of Sex Determination, editado por Wachtel S. Academic Press, Inc. San Diego, USA .

Jost A. (1947). Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon du lapin. III

Roles des gonades foetales dans la differenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.*, **36:271-315**

Kofman-Alfaro S., Merchant-Larios H., Pérez-Palacios Gregorio. (1982). Diferenciación Sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev. Invest. Clin. (Mex)*, **34:349-359**.

Koopman Peter, Münsterberg A., Capel B., Nigel V. and Lovell-Badge Robin. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, **348:450-452**.

Lacroix, E., Eechaute W., Leusen I. (1974). the biosynthesis of oestrogens by cow follicules. *Steroids*, **23:337-356**.

Lee C-H. and Taketo T. (1994). Normal onset, but prolonged expresion, of Sry gene in the B6.Y^{DOM} sex-reversed mouse gonad. *Developmental Biology*, **165: 442-452**.

Lillie F. (1916). Theory of the freemartin. *Science*, **43:611-613**.

Merchant-Larios H.(1978). Ovarian Differentiation en: The Vertebrate Ovary Comparative Biology and Evolution. Editado por Jones R. Plenum Press, New York.

Merchant-Larios H. (1984). Germ and somatic Cell interactions during gonadal morfogenesis. En: *Ultrastructure of reproduction*, editado por Van Blerkom, J. and Motta, P.M. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.

Merchant-Larios H. y Chimal-Monroy J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Developments in ultrastructure of reproduction*, **55-63**

Merchant-Larios H.(1991) Gametogénesis. En: Tópicos selectos de biología de la reproducción. Editado por Domínguez R., Programa Universitario de Investigación en Salud de la Coordinación de Investigación Científica, UNAM. Primera edición. México.

Merchant-Larios H.,Clarke H. y Taketo T. (1994). Developmental Arrest of fertilized Eggs From the B6.Y^{DOM} Sex-reversed Female Mouse. *Developmental Genetics*, **15:435-442**.

Meunier H, Cajander S.B, Roberts V.,River C, Sawchenko P,Hsueh A y Vale W. (1988). Rapid changes in expression of α -, β A-, β B- subunits in ovarian cell types during rat estrous cycle. *Molecular Endocrinology*, **2:1352-1363**.

Mullis K. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, Abril **36-43**.

Münsterberg A. y Lovell-Badge R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, **113:613-624**.

Murphy L., Herzog C., Rudick J., Fojo A. y Bates S. (1990). Use of Polymerase Chain Reaction in the quantitation of *mdr-1* Gene Expression. *Biochemistry*, **29:10351-10356**.

Nagamine Claude N., Teruko T. y Gloria C. (1987). Studies on the genetics of tda-1 XY sex reversal in the mouse. *Differentiation*, **33:223-231**.

Nelson D., Kamataki T., Waxman F., *et al.* (1993). The P450 Superfamily: Update on New sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, early Trivial names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA and Cell Biology*, **12:1-51**

Nishioka Y. (1988). Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology*, **38:181-185**.

O'Shaughnessy P. (1991). Steroidogenic enzyme activity in the hypogonadal mouse (hpg) mouse testis and effect of treatment with luteinizing hormone. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, **39:921-928**

O'Shaughnessy P. y Murphy L. (1993). Cytochrome P-450 17 α -hydroxylase protein and mRNA in the testis of the testicular feminized (Tfm) mouse. *Journal of Molecular Endocrinology*, **11:77-82**

O'Shaughnessy P. y Mannan M. (1994). Development of cytochrome P-450 side chain cleavage mRNA levels in neonatal ovaries of normal and hypogonadal (hpg) mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **104:133-138**.

O'Shaughnessy P., Marsh P. y Dudley K. (1994). Follicle-stimulating hormone receptor mRNA in the mouse ovary during post-natal development in the normal mouse and in the adult hypogonadal (hpg) mouse: structure of alternate transcripts. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **101:197-201**.

Ozdzenski W. (1972). Observation on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica Pol.*, **17:367-379**.

Palmer S y Burgoyne P. (1991). The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex reversal in C57BL/6-Y^{PO5} mice. *Development*, **113**:709-714

Payne A. y Linli S. (1991). Multiple Mechanisms for regulation of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4-Isomerase, 17- α -hydroxylase/C_{17,20} Lyase Cytochrome P450, and Cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 messenger Ribonucleic Acid Levels in primary cultures of mouse Leydig cells. *Endocrinology*, **129**:1429-1435.

Pepinsky B., Sinclair L., Pinogchang E., Mattaliano R., Mangaro T., Donahoe P., Cate R. (1988). Proteolytic processing of Mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor β -like fragment. *Journal Biological Chemistry*, **263**(35):18961-18964.

Peters H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinologica*, **62**:98-116.

Peters H. and Peters K. (1980). The ovary, a correlation of structure and function in mammals. Granada Publishing N.Y.

Price J.M. (1979). The secretion of Mullerian inhibiting substance by cultured isolated Sertoli cells of the neonatal calf. *American Journal of Anatomy*, **156**:147.

Purvis J. L., Canick J.A., Latif S., Rosenbaum J., Hologgitas J and Menard R. (1973). Control of cytochrome P-450 in rat testis mitochondria by human chorionic gonadotropin. *Archives of Biochemistry and Biophys.*, **159**:39-49.

Richards J., Jahnsen T., Hedin L., Lifka J., Ratoosh S., Durica J. y Goldring N. (1980). Ovarian Follicular Development: from Physiology to Molecular Biology. *Recent Progress in Hormone Research*, **43**:231-276.

Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Volumen 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second edition 1989.

Sokka T., Hämäläinen T. y Huhtaniemi I., (1992). Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. *Endocrinology*, **130**:1738-1740.

Taketo-Hosotani T., Nishioka Y., Nagamine C., Villalpando I y Merchant-Larios H. (1989). Development and fertility of ovaries in the B6.Y^{DOM} sex-reversed female

mouse. *Development*, **107**:95-105.

Tiersch T., Mitchell M., Wachtel S. (1991). Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Human Genetics*, **87**:571-573.

Tran D., Josso N. (1982). Localization of anti-mullerian hormone in the rough endoplasmic reticulum of the developing bovine sertoli cell using immunocytochemistry with a monoclonal antibody. *Endocrinology*, **111**:1562.

Tureck R., Strauss J. (1982). Progesterone synthesis by luteinized human granulosa cells in culture: The role of *de novo* synthesis and lipoprotein-carried sterols. *Journal of Clinical Endocrinological Metabolism*, **54**: 367-373.

Ueno S., Takashi M., Manganaro T., Ragin R and Donahoe P. (1989). Cellular localization of Mullerian inhibiting substance in the developing rat ovary. *Endocrinology*, **124**:1000-1006.

Vigier B., Picard J, Tran D. Legeai L., Josso N. (1984). Production of anti-Mullerian Hormone: Another homology between Sertoli and granulosa cells. *Endocrinology*, **114**:1315-1320.

Vigier B, Watrin F, Marge S., Tran D and Josso N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it *in vitro*. *Development*, **100**:43-55.

Villalpando I., Nishioka Y and Taketo T. (1993). Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology*, **45**:265-273.

Villalpando-Fierro I., Villafán-Monroy H. y Pacheco P. (1996). Delayed expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex-reversed female mouse ovary. *International Journal of Developmental Biology*, **40**:477-482

Washburn L. and Eicher E. (1983). Sex reversal in XY mice caused by dominant mutation on Chromosome 17. *Nature*, **303**:338-340.

Youngblood G., Sartorius C., Taylor B., y Payne A. (1991). Isolation, Characterization, and Chromosomal Mapping of Mouse P450 17 α -Hydroxylase/C₁₇,₂₀ Lyase. *Genomics*, **10**:270-275.

Youngblood G. and Payne A. (1992). Isolation and Characterization of the mouse

P450 17- α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ Lyase gene (cyp17) transcriptional regulation of the gene by cyclic adenosine 3' 5' monophosphate in MA-10 Leydig cells. *Molecular Endocrinology*, **6:927-934**

Zuber MX, John ME, Okamura T., Simpson E.R., Waterman MR. (1986). Bovine adrenocortical Cytochrome P45017 α regulation of gene expression by ACTH and elucidation of primary sequence. *Journal Biological Chemistry*, **261:2475-2482**.

Zukerman L. y Weir B. The Ovary. Volume I, General Aspects. Segunda edición Academic Press, New York 1977

10. APÉNDICE

1. Gel de agarosa al 0.75% (20 ml)

- Vaciar 0.15 g. de agarosa (SIGMA) en un matraz Erlenmeyer.
- Adicionar 20 ml de una solución 1:1 de TBE pH 8.0 y H₂O.
- Calentar a ebullición.
- Enfriar hasta 50-55 °C.
- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y dejar enfriar de 15 a 20 minutos.

2. Amortiguador TBE pH 8.0 (1 litro)

- Pesar 10.8 g de TRIZMA® Base (tris[hidroximetil]aminometano) de SIGMA (concentración final es de 89 mM).
- Pesar 5.5 g de ácido bórico (J.T. Baker), (concentración final de 89 mM).
- Pesar 0.933 g. ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica (EDTA Na₂) (2.5 mM).
- Disolver en H₂O destilada, ajustar el pH a 8.0 con ácido clorhídrico.
- Aforar a 1 litro.

3. Amortiguador TE (100 ml)

- Pesar 0.1211 g de TRIZMA® Base (tris[hidroximetil]aminometano) de SIGMA, (concentración final es de 10 mM).
- Pesar 0.0372 g de ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica (EDTA Na₂), lo cual da una concentración final de 0.1 mM.
- Disolver en H₂O destilada, ajustar el pH a 8.0 con ácido clorhídrico.
- Aforar a 100 ml.

4. Solución de hibridación (20 ml)

- En un vaso de precipitados, adicionar 10 ml de formamida, (concentración final de 50% V/V).
- Se pesan 0.1 g de dodecilsulfato de sodio de SIGMA, lo cual da una concentración final de 0.5 % P/V.
- Pesar 1.1688 g de cloruro de sodio (J.T. Baker), cuya concentración final será 1M.
- Pesar 1.0 g de sulfato de dextran, (concentración de 5% P/V).
- Aforar a 20 ml.

5. Solución SSC 1X (1 litro)

- Pesar 8.766 g de NaCl de J.T. Baker, (concentración final de 0.15 M).
- Pesar 1.4705 g de citrato de sodio, (concentración de 0.015 M).
- Disolver en agua destilada, ajustar a pH 7.0 con HCl y aforar a 1 litro.

6. Agua y material tratado con dietilpircarbonato (DEPC)

- Colocar en un vaso de precipitados 1 litro de agua destilada.
- Adicionar 1 ml de DEPC por cada litro de agua.
- Agitar constantemente hasta observar una mezcla homogénea.
- Adicionar el material, dejar reposar 24 horas y esterilizar dos veces (120 °C y 1.5 libras de presión por 40 minutos).
- Secar el material y esterilizar
- Manejarlo con guantes.

7. Amortiguador TEN pH 7.0 (1 litro)

- Pesar 1.211 g de TRIZMA[®] Base (tris[hidroxiometil]aminometano) de SIGMA, (concentración final de 10 mM).
- Pesar 0.372 g de ácido etilendiaminotetraacético, sal disódica (EDTA Na₂), (concentración final de 0.1 mM).
- Pesar 2.922 g de NaCl J.T. Baker.
- Disolver en H₂O destilada, ajustar el pH a 8.0 con ácido clorhídrico.
- Aforar a 1 litro.

8. Resina de Sephadex G-50

- Pesar 2 g de Sephadex G-50 (SIGMA, Molecular Biology)
- Adicionar el Sephadex a un vaso de precipitados con 200 ml de agua, se deja sedimentar, se agita con una varilla de vidrio, el sobrenadante se desecha y finalmente se lava 3 veces hasta que no se observen finos en la fase superior
- Se equilibra la resina con TEN (pH 7.0).
- Esterilizar 20 minutos a 1.05 kg/cm².
- Almacenar a 4 °C.

9. Columna de Sephadex G-50

- Colocar en una jeringa de 1ml un poco de fibra de vidrio y compactarla.
- Llenar la jeringa con Sephadex G-50, equilibrado en TEN pH 8.0.
- Centrifugar la jeringa a 1600 g por 4 minutos a temperatura ambiente. Adicionar resina y recentrifugar, repetir hasta observar un nivel de 0.9 ml.
- Adicionar 0.1 ml de TEN y recentrifugar.
- Guardar a 4 °C.

10. Digestión del DNA del plásmido pBR322 con la enzima *Hinf I*

- Se adicionó lo equivalente a 1 µg del DNA del plásmido pBR 322, a un tubo Eppendorf.
- Se agregó lo necesario del amortiguador 10X (Reactivo 2, GIBCO, BRL), para tener una concentración final 1X de 50 mM Tris-HCl a pH 8.0, MgCl₂ 10 mM y NaCl 50 mM.
- Se adicionó el equivalente a 2 unidades, por cada tubo de reacción (20 µl), de la enzima de restricción *Hinf I* (Life Technologies, GIBCO, BRL)
- Se incubó la mezcla de reacción por tres horas a 37 °C, centrifugando brevemente cada 20 minutos.

11. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Resumen de las células somáticas que forman la gónada.....	9
Tabla 2.	Desarrollo folicular.....	21
Tabla 3.	Principales esteroides sintetizados por el ovario.....	23
Tabla 4.	Condiciones para la síntesis del ADNc.....	50
Tabla 5.	Secuencia de los oligos sintetizados para la P450 _{17α}	50
Tabla 6.	Tiempos, temperaturas y ciclos utilizados para la amplificación de la P450 _{17α}	51
Tabla 7.	Secuencia de los oligos sintetizados para el MIS.....	53

FIGURAS

Figura 1.	Esquema general de la diferenciación sexual.....	10
Figura 2.	Esquema que describe el desarrollo de los folículos.....	20
Figura 3.	Estructura base de los esteroides.....	22
Figura 4.	Biosíntesis de esteroides.	25
Figura 5.	Biosíntesis de esteroides por el ovario.....	26
Figura 6.	Diagrama que muestra la acción de las gonadotropinas en el folículo.....	29
Figura 7.	Esquema del origen del B6.Y ^{POS}	34
Figura 8.	Resumen del procedimiento experimental realizado.....	41
Figura 9.	Membrana de hibridación.....	44

Figura 10. Diagrama de flujo para la hibridación puntual.....	46
Figura 11. Diagrama de flujo de la técnica de extracción de ARN.....	48
Figura 12. Diagrama de flujo de la amplificación por PCR a partir del RNA, de la P450 _{17α}	52
Figura 13. Diagrama de flujo de la amplificación por PCR a partir del RNA, del MIS.....	54
Figura 14. Gel donde se presenta la digestión de la sonda 145SC5.....	56
Figura 15. Hibridación puntual.....	57
Figura 16. Amplificación por RT-PCR del ARNm para la P450 _{17α} (8 a 11 dpp).....	59
Figura 17. Amplificación por RT-PCR del ARNm para la P450 _{17α} (12 a 20 dpp).....	61
Figura 18. Amplificación por RT-PCR del ARNm para el MIS (3 a 7 dpp).....	63
Figura 19. Amplificación por RT-PCR del ARNm para el MIS (8 a 12 dpp).....	64
Figura 20. Amplificación por RT-PCR del ARNm para el MIS (13 a 20 dpp).....	65