



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“SECUENCIACION DEL RNA^m DEL FACTOR
DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A INSULINA
TIPO II (IGF-II) DURANTE EL DESARROLLO
ONTOGENETICO DE LA GONADA DEL RATON
B6Y^{DOM} Y SU EXPRESION EN LA CEPA SILVESTRE
Mus musculus”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
AMANDA CASTILLO COBIAN



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA IRMA VILLALPANDO FIERRO

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

28 26 15

2000



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Secuenciación del RNAm del factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (IGF-II) durante el desarrollo ontogenético de la gónada del ratón B6YDOM y su expresión en la cepa silvestre Mus musculus"

realizado por Amanda Castillo Cobián

con número de cuenta 9011835-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis
- ✓ Propietario Dra. María Irma Villalpando Fierro
- ✓ Propietario Dra. Genovevâ González Morán
- ✓ Propietario Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal *Ma del Carmen Uribe*
- ✓ Suplente Biól. Miguel Angel Palomino Garibay
- ✓ Suplente Biól. José Aquiles Bernal Moreno

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Edna María Suárez Díaz
Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**A la memoria de mi abuelo
José Cobián**

**A mi madre
Zoila Cobián Michel**

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme el acceso a una educación profesional de manera gratuita, especialmente a la Facultad de Ciencias por el conocimiento proporcionado en todos los aspectos de mi vida.

A la Dra. Irma Villalpando Fierro, por introducirme a la investigación en la biología del desarrollo, permitirme el uso de las instalaciones de su laboratorio, compartir conmigo sus experiencias profesionales y sobretodo por la dedicación a la revisión del presente trabajo.

A la Dra. Irma Sánchez Vargas del departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, por el tiempo dedicado a la enseñanza de la técnica de secuenciación, por las facilidades otorgadas para el uso del laboratorio, por la paciencia y el trabajo compartido.

Al M en C. Horacio Villafán Monroy, por la generosidad de compartir sus conocimientos en todas las técnicas desarrolladas en esta tesis y por las letras de las figuras.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por permitirme el uso de sus instalaciones y el acceso a la información bibliográfica.

A los sinodales por la revisión de la presente tesis y por sus valiosos comentarios.

Al personal del bioterio del IIB por los cuidados otorgados a las cepas de ratones B6 y B6Y^{DOM}.

A la Sra. Gloria Bustos por todo el material limpio y estéril utilizado en el desarrollo del presente estudio.

A mis compañeros del laboratorio por compartir un espacio y un tiempo juntos, Laura, Lilia, Lolita, Lupita, Horacio, Gloria, Dorys, Gabriel, Luis y Yetzi.

A mi hermano Omar Castillo Cobián con amor.

A las Guilles porque nunca terminaré de agradecerles.

A mi tía Rosa Cobián por el apoyo incondicional.

A mi padrino José María Acosta.

A Yaayé por Oaxaca y compartir a su familia conmigo.

A mis amigos de la Facultad Adrián, Amaranta y Dorina por los momentos inolvidables.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología, Arturo, Ana, Sara, Luis, Erwin, Ulises, Josexu, Julio y Javier.

Al Dr. Antonio Lazcano culpable de mi inclinación científica y siempre mi maestro.

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del proyecto DGAPA IN-215296 que me proporcionó una beca durante su realización.

“ Gregorio Samsa al despertarse esa mañana después de un sobresaltado sueño, se halló sobre su cama convertido en un repugnante bicho. Estaba apoyado sobre su espalda, que no era otra cosa que un duro caparazón, y al levantar la cabeza, pudo ver su vientre oscuro, atravesado por callosidades, cuyo volumen apenas si resistía la colcha, que ya iba resbalándose hacia el piso. Incontables patitas, muy débiles y flacas en comparación con el resto de su cuerpo se movían ante sus ojos desmañadamente.
-¿Qué me estará ocurriendo? -”

La metamorfosis
Franz Kafka

Í N D I C E

	Páginas
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
<i>1. Desarrollo y diferenciación de la gónada de los roedores</i>	2
a). Cresta urogenital	3
b). Gónada indiferenciada	4-5
c). Diferenciación sexual	
i) Testículo	5-6
ii) Ovario	6-7
<i>2. Gen determinante de la diferenciación testicular</i>	8
a). Características moleculares	8-9
b). Aspectos evolutivos	9
<i>3. Participación de los genes autosomales en la diferenciación gonadal</i>	9-10
a). Gen involucrado en la formación de la gónada indiferenciada	10
b). El factor esteroidogénico	11
c). Gen responsable de la diferenciación ovárica	11
<i>4. Factores de crecimiento semejantes a insulina</i>	11-12
<i>5. El factor de crecimiento semejante a insulina tipo II</i>	
a). Características moleculares	12-14
b). Receptores	14-15
c). Proteínas de unión	15
d). Expresión del IGF-II en etapas embrionarias	16
e). Papel del IGF-II durante la esteroidogénesis	16-18
f). Aspectos evolutivos	18-19

6. El ratón B6Y ^{DOM}	19-21
a). Desarrollo gonadal del ratón B6Y ^{DOM}	21-22
b). Posibles genes involucrados en el desarrollo gonadal del ratón B6Y ^{DOM}	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25
V. METODOLOGÍA	26
1. Reactivos	26
2. Animales	
3. Determinación de la edad de gestación	26
4. Identificación del sexo genético	27
a). Aislamiento del DNA	28
b). Amplificación del Sry	28
5. Obtención del RNA total	29
6. Amplificación del transcrito del IGF-II en la cepa B6	29-30
a). Obtención del DNA complementario	30
b). PCR	30
c). Visualización del transcrito del IGF-II	31
d). Fotografías	31
7. Secuenciación del producto amplificado	32
a). Preparación del DNA para secuenciación	33
b). Reacción de secuenciación	33
c). Preparación de las placas de secuenciación	34
d). Elaboración del gel	34
e). Electroforesis	35
f). Autoradiografía	35

VI. RESULTADOS	36
1. Determinación del sexo de los embriones por PCR	36
2. Amplificación del IGF-II en la cepa B6	36-38
3. Secuenciación del transcrito del IGF-II	38-40
VII. DISCUSIÓN	41-44
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. BIBLIOGRAFÍA	46-54
X. APÉNDICE	55-57

I. RESUMEN

La diferenciación sexual en los mamíferos es un fenómeno secuencial que se inicia con la determinación del sexo cromosómico en el momento de la fecundación. Este proceso es seguido por el desarrollo del sexo gonadal y culmina con el establecimiento de los caracteres sexuales secundarios. De tal forma que normalmente el sexo genético concuerda con el fenotipo sexual, pero ocasionalmente esto no sucede, tal es el caso de la cepa de ratones B6Y^{DOM} donde los machos sufren una reversión sexual hacia hembras fenotípicas. Actualmente se sabe que existen otros genes, además del factor determinante del desarrollo testicular (*Sry*), localizados en el cromosoma X o en los autosomas como el WT-1, DAX-1, SF-1, Tda-1 y 2 y los genes de la familia de proteínas denominadas SOX, que al parecer también intervienen dentro de la cascada de eventos que producirán la diferenciación gonadal.

Por otra parte, se ha demostrado que los factores de crecimiento semejantes a insulina I y II son péptidos involucrados en procesos de mitogénesis, diferenciación en múltiples tejidos y esteroidogénesis en la etapa adulta. Sin embargo, no se ha establecido cual es la función de estos factores durante el desarrollo gonadal del ratón. El objetivo del presente trabajo fue detectar la expresión del factor semejante a insulina tipo II durante el desarrollo ontogenético del ratón *Mus musculus* (cepa B6) de los 10 a los 18 d.g., utilizando la técnica de RT-PCR. Se observó que hay una disminución de la expresión del RNA mensajero maduro de este gen en la etapa anterior a la diferenciación gonadal a los 11 d.g. en las gónadas XY, mientras que en todas las edades estudiadas posteriormente su expresión se mantuvo constante en ambos sexos. La secuenciación del transcrito, amplificado previamente durante el desarrollo gonadal de la cepa B6Y^{DOM} en los ovarios XY, por la técnica de los terminadores de la síntesis del DNA (dideoxinucleótidos) descrita por Sanger (1977), demostró 100% de homología con el cDNA descrito por Stempien y col. (1986). El registro constante del IGF-II durante el desarrollo gonadal de este ratón podría involucrarlo en los procesos de diferenciación, proliferación e inicio de la esteroidogénesis en la gónada. La disminución de su expresión antes de que se lleve a cabo la determinación sexual gonadal puede estar relacionándolo con la diferenciación del tejido testicular somático en las gónadas XY.

II. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual es un fenómeno biológico de trascendencia que asegura la perpetuación de las especies. El desarrollo de la sexualidad trajo consigo múltiples ventajas evolutivas ya que, además de asegurar la transmisión de las características de cada especie, permite que se lleve a cabo la recombinación genética. Este intercambio produce variabilidad lo que origina que los organismos tengan más posibilidades de adaptarse a los distintos medios, generando de esta forma una mayor biodiversidad.

La determinación del sexo en los mamíferos se lleva a cabo en tres etapas, en la primera ocurre la determinación sexual cromosómica que se realiza durante la fecundación, normalmente los individuos XX se desarrollan como hembras y los XY se diferencian como machos. Como consecuencia de la determinación cromosómica se lleva a cabo la determinación sexual gonadal, cada embrión posee un par de primordios gonadales así como, un sistema de conductos indiferenciados independientemente del sexo genético que posean, con la potencialidad de desarrollarse en ovarios o testículos. Si el embrión es hembra las gónadas se diferencian en ovarios y si es macho se diferencian en testículos. En la última fase ocurre la determinación sexual fenotípica en la cual se desarrollan los genitales sexuales internos y externos. En el caso de las hembras los conductos de Müller se diferencian en trompas de Falopio, útero y el tercio superior de la vagina mientras que en los machos, los conductos de Wolf forman el epidídimo, los vasos deferentes y las vesículas seminales (Revisado por: Gilbert, 1988).

1. Desarrollo y diferenciación de la gónada de los roedores

La diferenciación gonadal ocurre por la interacción de dos tipos celulares: las células germinales primordiales (CGPs) que inicialmente se encuentran en el alantoides a los 8.5 d.g. (días de gestación) en el ratón (Godin y Wylie, 1991) para posteriormente migrar hacia la región urogenital, y las células somáticas localizadas en la cresta urogenital (Merchant-Larios, 1984).

Durante el desarrollo gonadal se distinguen tres fases: la formación de la cresta urogenital, el establecimiento de la gónada indiferenciada y la diferenciación sexual

gonadal. Independientemente del sexo cromosómico que posean, machos y hembras llevan a cabo las dos primeras etapas (Merchant-Larios, 1984).

a). Cresta urogenital

En todos los vertebrados los gametos se desarrollan a partir de las CGPs que se pueden reconocer en el mesodermo extraembrionario debido a su contenido de fosfatasa alcalina (Ginsburg y col., 1990). De aquí inician su migración hacia las crestas urogenitales, la cual ocurre en dos fases: en la primera se mueven del endodermo hacia el intestino posterior por un transporte pasivo del endodermo en invaginación. En la segunda fase el transporte se lleva a cabo activamente a través del mesenterio dorsal intestinal hacia las crestas genitales, entre los días 9.5-11.5 (Ffrench-Constant y col., 1991). Durante esta migración el número de CGPs se incrementa de 100 a 4000 aproximadamente (Godin y col., 1990), se ha planteado que la proliferación de éstas células es controlada por el balance entre distintos factores de crecimiento (Mercola y Stiles, 1988; Godin y col., 1990). Actualmente no se conocen con exactitud los factores que controlan la migración de las CGPs, aunque se ha demostrado que para su desplazamiento requieren de fibronectina como substrato (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986), y se han encontrado evidencias que sugieren que las crestas genitales secretan una proteína perteneciente a la familia del TGF- β 1 (Factor de crecimiento transformante beta 1) que es capaz de atraer a las CGPs del ratón (Godin y Wylie, 1991).

Cuando las CGPs comienzan a llegar a la zona urogenital, aquí se encuentran con diferentes tipos de células somáticas de origen mesodérmico. Entre ellas células mesoteliales, mesenquimatosas, mesonéfricas y endoteliales (Merchant-Larios, 1991). Los dos primeros tipos celulares son los que participan directamente en la formación de la gónada indiferenciada como células precursoras. Las células mesonéfricas y endoteliales en cambio, son parte de tejidos ya diferenciados (el mesonefros y sistema circulatorio respectivamente) que sólo indirectamente participan en la morfogénesis de la gónada, aunque este punto sigue siendo controversial ya que algunos estudios apoyan la intervención de células mesonéfricas durante el desarrollo gonadal (Buehr y col., 1993).

La cresta urogenital aparece como un engrosamiento en la parte ventral del mesonefros, que a su vez es derivado de las interacciones inductivas del mesodermo intermedio.

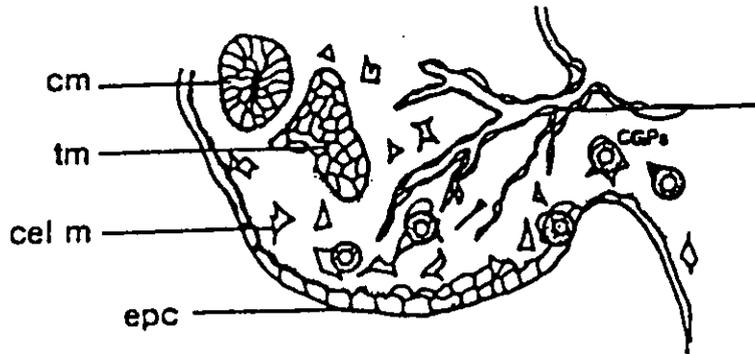


Fig 1. Diagrama de la cresta urogenital de un embrión de ratón de 9.5 d.g. Se señalan varios tipos celulares que en conjunto participarán en el desarrollo posterior de la gónada indiferenciada como: CGPs, células del epitelio celómico (epc), células mesenquimáticas (cel m), el conducto mesonéfrico (cm) y el túbulo mesonéfrico (tm) formado a partir de la condensación del mesénquima urogenital (Tomado de: Merchant-Larios, H. 1991. Tópicos selectos de biología de la reproducción, p11-29).

b). Gónada indiferenciada

En esta etapa las CGPs y las células somáticas en la cresta genital están fuertemente compactadas y adheridas a la superficie del epitelio formando un primordio gonadal (Merchant-Larios, 1984). Esta fase se caracteriza por tres eventos morfogenéticos: la condensación de las células somáticas a lo largo de las crestas genitales, la deposición gradual de los componentes de la lámina basal alrededor de las células epiteliales, así como, una actividad mitótica disminuida de las células epiteliales. Conforme llegan las CGPs las células somáticas proliferan formando en conjunto el "blastema gonadal" (Merchant-Larios, 1984). Estos movimientos morfogenéticos coordinados conllevan a la formación de los cordones gonadales (Merchant-Larios y Taketo, 1991). Al terminar esta etapa se puede apreciar en la gónada indiferenciada un

componente epitelial que contiene a la mayoría de las células germinales y un componente estromático a partir del cual posteriormente se desarrollarán los vasos sanguíneos, las células precursoras del tejido conectivo de las gónadas y las células intersticiales esteroideogénicas (Merchant-Larios, 1984). En el ratón esta etapa abarca de 9.5-11.5 d.g.

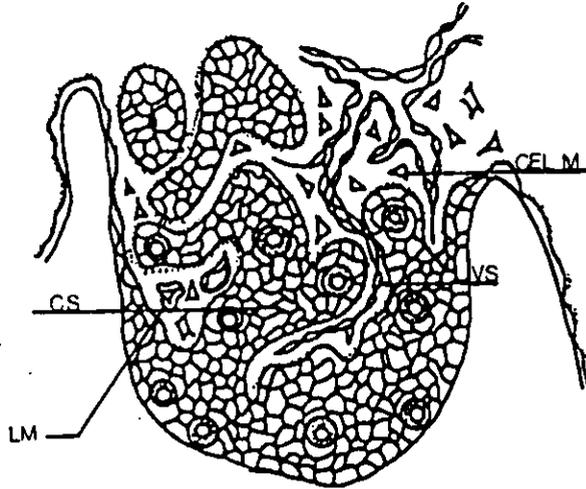


Fig 2. Establecimiento de la gónada indiferenciada. Formación de los cordones sexuales (CS), células de tipo epitelial limitadas por una lámina basal (lm), células mesenquimatosas (cel m) y vasos sanguíneos (vs) (Tomado de: Merchant-Larios, 1991. Tópicos selectos de biología de la reproducción, p11-29).

c). Diferenciación sexual

i) Testículo

En los mamíferos, la primera manifestación estructural de la diferenciación sexual, se detecta en la gónada de los machos. En el ratón la diferenciación del testículo se inicia a los 12 d.g., lo primero que se observa es una separación gradual de los cordones sexuales del epitelio superficial de la gónada. Esta separación se produce tanto por un mayor compactamiento de los cordones, como por una invasión y proliferación de tejido mesenquimatoso y vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica. Ya en la médula del testículo, los cordones sexuales reciben el nombre de “cordones seminíferos” y cuando adquieren un lumen se denominan “tubos seminíferos”. Estas estructuras

conservan la lámina basal que envuelve tanto a las células somáticas epiteliales o pre-Sertoli, como a las germinales (Merchant-Larios, 1991). En el tejido estromático que rodea a los cordones seminíferos se encuentran los siguientes tipos celulares: células mioideas, vasos sanguíneos, fibroblastos y células de Leydig (Merchant-Larios, 1991). Una vez que ocurre la diferenciación gonadal los testículos en desarrollo producen dos factores, la hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS) secretada por las células de Sertoli aproximadamente a los 12 d.g en el ratón y la testosterona producida por las células de Leydig a los 12.5-13 d.g, que estimula el desarrollo del tracto masculino a partir de los conductos de Wolf (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991; Donahue, 1992).

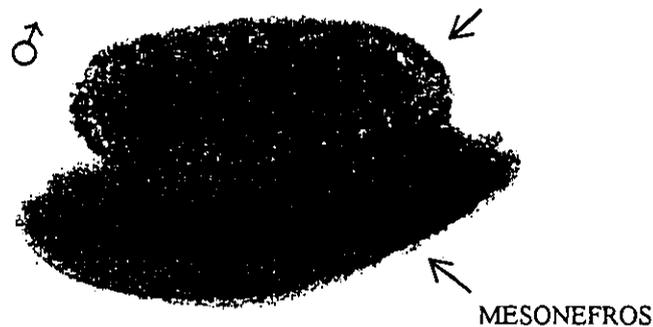


Fig 3. Testículo embrionario de 13 d.g. de la cepa de ratones B6. La flecha señala el testículo embrionario que se encuentra localizado sobre el mesonefros (Tomado de: Nagamine y col., 1998. Dev Biol 196: 24-32).

ii) Ovario

Excepto por cierto crecimiento debido a la proliferación tanto de las células somáticas como de las CGPs, el ovario no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada (Merchant-Larios, 1991). La primera indicación de diferenciación sexual en las hembras es el inicio de la meiosis en las células germinales alrededor de los 13.5 d.g en los ratones. En los ovarios de los mamíferos el epitelio celómico se separa del epitelio superficial en una etapa tardía en comparación con el desarrollo del testículo (Merchant-Larios, 1984). La diferenciación comienza en

los remanentes de los túbulos mesonéfricos, éstos se encuentran de manera continua con el epitelio gonadal formando el *rete ovarii*. De esta zona se desarrollarán los ovocitos primarios, que son rodeados por células somáticas organizadas a manera de epitelio cúbico y separadas por la lámina basal del estroma gonadal. En esta etapa las células germinales se encuentran embebidas por el epitelio (que dará origen a las células de la granulosa) y posteriormente formarán los folículos primordiales. Los folículos se forman por fragmentación de los cordones ováricos. Este proceso comienza cerca del *rete ovarii* y gradualmente se extiende a la región cortical del ovario en desarrollo (Merchant-Larios, 1984). A partir del tejido estromático que rodea a los ovocitos se originarán los siguientes tipos celulares: la teca interna, constituida por fibroblastos y células mioides y posteriormente la teca externa (Merchant-Larios, 1984). La producción de estrógenos se inicia al mismo tiempo que en el macho a los 13 d.g.

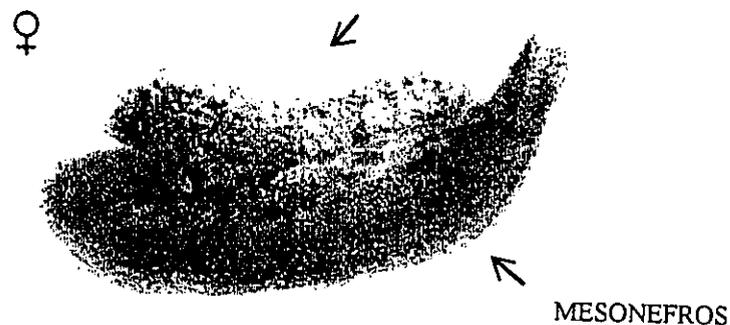


Fig 4. Ovario embrionario de 13 d.g. de la cepa de ratones B6. La flecha señala el ovario embrionario que se encuentra localizado sobre el mesonefros (Tomado de: Nagamine y col., 1998. Dev Biol 196: 24-32).

Los experimentos clásicos llevados a cabo por Jost (1953) demuestran que el patrón básico de desarrollo en los mamíferos es el femenino; por lo tanto, existe un factor dentro del cromosoma Y que está desencadenando la cascada de eventos morfogenéticos que tienen como resultado el desarrollo testicular.

2. Gen determinante de la diferenciación testicular

Dentro del cromosoma Y cerca de la zona pseudoautosomal del brazo corto 'p' que comprende aproximadamente 35 kb (kilobases) se encuentra localizado el gen determinante de la diferenciación testicular conocido como **SRY** en el humano y **Sry** en el ratón respectivamente (Berta y col., 1990; Koopman y col., 1990).

El **Sry** pertenece a una superfamilia de proteínas caracterizadas por tener un motivo de unión al DNA conocido como **HMG** (High mobility group) que comprende aproximadamente 79 aminoácidos (a.a) (Rimini y col., 1995) y se encuentra agrupado dentro de una clase de factores de transcripción denominados proteínas **SOX** que poseen una homología de más del 60% con el **Sry** (Whitfield y col., 1993).

La evidencia directa que relaciona al **SRY** como el factor determinante de la diferenciación testicular se obtuvo a partir del análisis de los genomas de mujeres XY con disgenesia gonadal. En dos de estos casos las mujeres que presentaban reversión sexual poseían mutaciones en el gen del **SRY** que no se presentaban en los padres. La correlación entre esta mutación *de novo* con la reversión sexual implicaba que el **SRY/Sry** se requiere para el desarrollo normal de los testículos. Además, se demostró que un fragmento genómico de ratón de 14 kb (kilobases) que incluía el **Sry** producía desarrollo normal de testículos en hembras XY transgénicas (Koopman y col., 1991).

a). Características moleculares

El gen del **Sry** del ratón está formado por un exón y tiene una estructura muy particular ya que consiste en una región de 2739 pb (pares de bases) que contiene un marco de lectura abierto rodeado de una secuencia repetida e invertida de aproximadamente 17 kb (Gubbay y col., 1992), además, el transcrito cuyo tamaño es de 1.3 kb se encuentra de forma circular en la etapa adulta (Capel y col., 1993).

Se ha demostrado que el **Sry** se une en general a tres secuencias consenso posibles tal como 5' -TCAAAGG y más específicamente a 5'-AGAACAATGG y 5'-AACAAT/A (Jeske y col., 1996). Se ha planteado que el **Sry** al unirse a su secuencia respectiva induce un ángulo de 76° en el DNA lo que promueve y/o reprime la expresión de otros genes (Pontiggia y col, 1994; Jeske y col., 1996). Al estudiar la expresión del **Sry** se

mostró en un inicio que se realizaba específicamente en las células de la cresta genital durante las fases de 10.5 a 12 d.g (Koopman y col., 1991), posteriormente con técnicas como la transcriptasa reversa (RT-PCR) e hibridación *in situ* se amplió el registro de su expresión hasta los 13.5 d.g. (Jeske y col., 1996). La máxima expresión del Sry en la gónada XY del ratón de la cepa B6 se lleva a cabo a los 11 d.g (Lee y Taketo, 1994).

Se ha demostrado que durante las primeras etapas de desarrollo gonadal el sexo de las células somáticas depende de la expresión del Sry. Si este gen no se expresa, si su expresión se ve retardada o se realiza en un número muy reducido de células somáticas, éstas células se diferenciarán en pre-foliculares y el desarrollo continuará hacia el patrón femenino. En cambio, las células somáticas donde la expresión del Sry se lleva a cabo de manera correcta se diferenciarán en pre-Sertoli e intervendrán en la formación del testículo (Revisado por: McLaren, 1991).

b). Aspectos evolutivos

El Sry se encuentra en una sola copia en una variedad de euterios y algunos metaterios como los primates y el ratón, en cambio en las ratas podemos localizar hasta 4 copias del gen (Nagamine, 1994). Aunque el Sry es un regulador del desarrollo importante su secuencia es poco conservada entre especies fuera del dominio HMG (Whitfield y col., 1993; Pamilo y col., 1997). Es posible que la expresión de este gen coincida espacio-temporalmente con otros genes y/o factores de crecimiento, lo cual podría estar regulando la diferenciación gonadal en los mamíferos.

3. Participación de los genes autosomales en la diferenciación gonadal

Se han identificado algunos genes autosomales que debido a las características de su expresión y el tipo celular que los expresa, se ha propuesto su participación en la diferenciación gonadal. Sobre todo los genes de la familia de proteínas denominadas SOX a cuyo grupo pertenece el Sry. Estudios de homología a nivel de sus secuencias han demostrado que el gen evolutivamente más cercano al Sry es el Sox3, que se localiza en el cromosoma X. La divergencia entre ambos genes puede haber sido una consecuencia de la evolución del cromosoma X y Y, lo que probablemente lo involucra en procesos de

determinación sexual. Sin embargo, se ha visto que las deleciones de este gen sólo han producido disminución en la función testicular pero no una reversión sexual (Lim y col., 1998).

Por otra parte, se ha demostrado que el gen *Sox9* se encuentra involucrado en la determinación sexual gonadal. Este gen está localizado en el cromosoma 11 y su expresión se lleva a cabo en sitios donde sucede la condrogénesis. Sus mutaciones se han asociado con la patología conocida como displasia campomélica en donde una alta proporción de los pacientes exhiben una reversión sexual completa o parcial lo que lo involucra en procesos de determinación sexual así como, anormalidades en el desarrollo del esqueleto (Foster y col., 1994; Schafer y col., 1995; Kent y col., 1996; Pevny y col., 1997). Su expresión en el ratón se localiza en la cresta urogenital alrededor de los 10.5 a 11.5 d.g y se lleva a cabo de manera diferencial entre machos y hembras. Durante la diferenciación del ovario su expresión disminuye mientras que en el macho aumenta por lo que se ha relacionado directamente con la expresión del *Sry*. Existe un modelo que propone que el gen *Sox3* y el *Sry* compiten por la unión en los sitios reguladores de la expresión del *Sox9*, cuando se trata de una hembra el factor que se está uniendo al *Sox9* es el *Sox3* y si es macho sucede de manera inversa (Lim y col., 1998).

a). Gen involucrado en la formación de la gónada indiferenciada

Otro de los genes que se encuentra involucrado en procesos de determinación sexual es el WT-1 (Wilm's tumor 1) que básicamente participa en el desarrollo urogenital. Su expresión ha sido detectada en las células mesenquimatosas del metanefros y luego en las epiteliales mientras se diferencian en los túbulos mesonéfricos. Mutaciones de este gen producen el síndrome de Denys-Drasch caracterizado por serias malformaciones, incluyendo la presencia de genitales ambiguos. Además de ser el responsable del desarrollo del tumor de Wilm's en el hígado de infantes, que también parece involucrar al factor de crecimiento semejante a insulina II (IGF-II) ya que se detecta una sobreexpresión de este gen durante el desarrollo de este tumor (Kreidberg y col., 1993; Hawkins, 1995).

b). El factor esteroideogénico (SF-1)

Los estudios bioquímicos y experimentos de cultivo celular han indicado la participación de el factor esteroideogénico-1 (SF-1) en la regulación del gen que codifica para la MIS (Luo y col., 1995). En ratón adulto este gen se expresa en todos los tejidos esteroideogénicos primarios incluyendo la corteza adrenal, las células de Leydig, las de la teca y de la granulosa. Disrupciones génicas en el ratón provocan fallas en el desarrollo adrenal y gonadal. Es el único factor, además del Sry, que se expresa diferencialmente en la gónada femenina y masculina en desarrollo, el inicio de su expresión en las crestas genitales precede a la del factor determinante del testículo (9-9.5 d.g) (Luo y col., 1994; Parker y col., 1998).

c). Gen responsable de la diferenciación ovárica

Se ha detectado la presencia de un factor que interviene de manera directa en la diferenciación del ovario en las hembras que se ha denominado DAX-1 y que se encuentra localizado dentro del cromosoma X en la región conocida como sensible a dosis génica (Dosage sensitive region) (Zanaria y col., 1994). Se ha comprobado su participación en la esteroideogénesis de enzimas clave como la aromatasas P450scc (Lalli y col., 1998). Mutaciones en este gen producen hipoplasia adrenal que está caracterizada por la ausencia de corteza adrenal y una desorganización estructural de las gónadas lo que produce bajas concentraciones de glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos. Su expresión se puede localizar en el ovario en desarrollo, testículo adulto y glándulas adrenales. Si se encuentra duplicado en los machos puede producir reversión sexual fenotípica hacia hembras. Al parecer el DAX-1 funciona como un antagonista de la expresión del Sry (Swain y col., 1996 y 1998).

4. Factores de crecimiento semejantes a insulina

Los factores de crecimiento son moléculas mitogénicas que participan en la diferenciación y proliferación celular (Froesch y col., 1985; Zapf y Froesch, 1986). Se ha propuesto que también juegan un papel importante en procesos patológicos como el cáncer y otras enfermedades (Mercola y Stiles, 1988).

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGFs) fueron caracterizados bioquímicamente a partir de plasma humano por Rinderknecht y Humble (1978) y se denominaron IGF-I e IGF-II (Insulin-like growth factor I y II). Estos son péptidos con capacidad mitogénica de bajo peso molecular (7649 D el IGF-I y 7471 D el IGF-II), cadena sencilla con tres puentes disulfuro intracatenarios, relacionados estructuralmente con la insulina (Sara y Hall, 1990). El IGF maduro posee los dominios A,B,C,D y E, los dos primeros son homólogos a las cadenas A y B de la insulina (Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992). La principal fuente de secreción de los IGFs es el hígado en la etapa adulta, sin embargo, durante la etapa fetal se encuentran en diversos tejidos como riñón, hígado, pulmón y en todo el sistema nervioso central, por lo que se han considerado factores de secreción endócrina, parácrina y autócrina. La regulación del IGF-I se realiza principalmente por la GH (Hormona de crecimiento), el IGF-II parece ser independiente de GH y es regulado por el lactógeno placentario (Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992).

5. El factor de crecimiento semejante a insulina tipo II

a). Características moleculares

El gen que codifica para el IGF-II en el ratón está localizado en el autosoma 7 junto con la insulina con la que comparte la misma polaridad de transcripción. Este gen está formado por 6 exones, 5 intrones y 2 pseudoexones. El péptido maduro consta de 67 a.a y tiene un precursor de 180 a.a (Stempien y col., 1986). Los extremos 3' de los exones 1-3 son escindidos diferencialmente y pueden ser unidos al exón 4, así que los mensajeros se transcriben a partir de tres regiones únicas que no son traducidas (Rotwein y Hall, 1990). Las regiones propiamente codificantes son las contenidas en los exones 4-6 para el precursor. El exón 4 codifica 24 a.a que corresponden al péptido señal, así como los primeros 28 a.a del péptido maduro. Lo que resta del IGF-II maduro se encuentra en el exón 5 que a su vez, codifica los primeros 11 a.a del dominio E de 89 a.a correspondientes al extremo carboxi terminal de la proteína. El exón 6 contiene los 78 a.a del último dominio y una región extensa 3' que no se traduce. Los exones 1-3 son homólogos a los correspondientes para el gen de la rata y los exones 2-3 son similares a los exones 4 y 5 del humano (Stempien y col., 1986; Rotwein y Hall, 1990). Ya que el

inicio de la transcripción se lleva a cabo a partir de tres promotores, se han identificado distintas especies de RNA_m cuya expresión se ha propuesto se realiza de manera específica para el tejido y la etapa de desarrollo (Sara y Hall, 1990). En el caso del humano en hígado adulto se transcribe en su mayoría un mensajero de 5.3 kb a partir del promotor P1 que sólo es activo en esta etapa, también se han identificado dos mensajeros transcritos a partir del promotor P2 de 6 y 2.2 kb debido a mecanismos de poliadenilación y un transcrito a partir del P3 cuyo tamaño es de 4.8 kb, además un mensajero adicional de 1.8 kb (Sara y Hall, 1990).

El gen del IGF-II en el ratón es transcrito a partir de tres promotores (P1, P2 y P3) distintos localizados dentro de cada uno de los tres primeros exones (1, 2, 3) que son escindidos diferencialmente para su formación. Los promotores P2 y P3 tienen ciertas regiones regulatorias típicas como cajas TAATA y zonas ricas en GC, ambos poseen un sitio único de iniciación a la transcripción. En contraste, el P1 contiene 3 probables sitios de iniciación a la transcripción distribuidos en una región de aproximadamente 550 bp y carece de elementos reguladores típicos (Rotwein y Hall, 1990). La expresión diferencial de estos promotores puede explicar diversas especies de RNA mensajeros (RNA_m) que se han encontrado en distintos órganos, tejidos y etapas del desarrollo tanto en humano, como en rata y ratón (Stempien y col., 1986; de Pagter-Holthuizen y col., 1987; Rotwein y Hall, 1990; Holthuizen y col., 1993; Gangji y col., 1998). Se han correlacionado el uso diferencial de promotores con el envejecimiento y carcinogénesis, debido principalmente a la metilación del promotor (Issa y col., 1996). En el humano se demostró que un mecanismo de metilación temprana selecciona el promotor que va a ser expresado, una falla en este mecanismo y se promueve la expresión de otro promotor lo que guarda una relación con el envejecimiento y la aparición de procesos patológicos como la leucemia (Issa y col., 1996).

El IGF-II es uno de los veinte genes que son producto de una impronta parental (parental imprinting), es decir, sólo se expresa uno de los alelos, en este caso el paterno, aunque se ha detectado que en tejido nervioso existe una expresión bialélica (DeChiara y col., 1990; Lee y col., 1993; Hu y col., 1995). El proceso de la impronta es un fenómeno relativamente nuevo, poco conocido y falta realizar numerosos estudios para lograr comprender como es que se lleva a cabo. Al parecer en el caso del IGF-II existe una

relación con otro gen (H19) y ambos se improntan en conjunto, se ha reconocido la participación de un amplificador (enhancer), elemento regulador importante, que al parecer es el que promueve que se lleve a cabo esta impronta (Pedone y col., 1994).

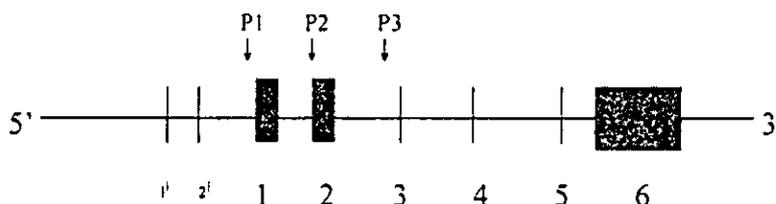


Fig 5. Organización del gen del IGF-II del ratón. Se señalan los 6 exones que lo conforman, también se muestran los promotores (P1, P2 y P3) en los exones 1,2 y 3 a partir de los cuales se transcriben los mensajeros de forma diferencial. Los números 1' y 2' señalan a los dos pseudoexones, identificados a partir de la homología que comparten con el humano y que no son transcritos en el ratón.

b). Receptores

Los IGFs ejercen su acción fisiológica interactuando con receptores específicos en la superficie de la membrana celular. Se han reconocido dos tipos de receptores, el tipo I y el tipo II. El IGF-I muestra una mayor afinidad por el receptor de tipo I, mientras que el IGF-II por el tipo II (Roth, 1988). Sin embargo, la acción fisiológica de ambos factores se lleva a cabo principalmente por su interacción con el tipo I (Czech, 1989) que es una glicoproteína heterotetramérica (posee dos cadenas alfa y dos cadenas beta), con actividad de tirosina cinasa y un 70% de identidad con el receptor de la insulina (Morgan y col., 1987; MacDonald y col., 1988). El receptor tipo II es una glicoproteína de cadena sencilla, el 90% de su estructura lineal se encuentra en forma extracelular, este dominio está compuesto por aproximadamente 15 repeticiones de una misma secuencia

conservada. El dominio citoplásmico más pequeño es hidrofílico y no se ha encontrado que presenta actividad de tirosina cinasa (MacDonald, 1988). El análisis de su secuencia complementaria demuestra que posee un 79% de identidad con el receptor para la Manosa-6-fosfato (Morgan y col., 1987; MacDonald y col., 1988; Roth, 1988). Se ha propuesto que el receptor tipo II regula el exceso de IGF-II secuestrándolo ya que su actividad fisiológica es mediada tanto por el receptor tipo I como por el receptor para la insulina (Morgan y col., 1987; MacDonald y col., 1988; Roth, 1988; Giudice, 1992; Nishimoto, 1993; Nissley y col., 1993; Schultz y col., 1993; Louvi y col., 1997; Morrione y col., 1997).

c). Proteínas de unión

Los IGFs a diferencia de la insulina que circula libremente por el torrente sanguíneo, se encuentran asociados con una familia específica de proteínas conocidas como IGFBPs (Insuline-like binding proteins)(Giudice, 1992). Se han reconocido 6 especies distintas de estas proteínas: IGFBP-1 a la 6 en ratón, rata y humano (Giudice, 1992; Murphy y Barron, 1993). Se cree que estas proteínas participan en la regulación de estos factores de crecimiento prolongando su vida media así como, regulando sus efectos endocrinos (Cohen y col., 1991). Asimismo, se ha planteado que modulan la acción local del IGF-II de forma parácrina y/o autócrina (Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992). Las IGFBPs inhiben los efectos mitogénicos de los IGFs posiblemente secuestrándolos extracelularmente y limitando su acceso a receptores específicos, aunque en otros casos pueden potenciar sus efectos (Cohen y col., 1991; Giudice, 1992; Clemmons, 1993). Se ha propuesto que tienen sitios de reconocimiento para integrinas, que son componentes importantes de la matriz extracelular (Giudice, 1992). Las IGFBPs se dividen en dos clases: las dependientes de GH y de alto peso molecular y las independientes de GH y de bajo peso molecular, ninguna es capaz de unirse a la insulina y las segundas independientes de GH y de bajo peso molecular tienen una mayor afinidad por el IGF-II (Giudice, 1992). Existe una expresión diferencial de distintas especies de RNA_m para los IGFs así como, para sus receptores y sus IGFBPs. Sin embargo, la expresión del IGF-II durante el desarrollo gonadal no ha sido estudiada.

d). Expresión del IGF-II en etapas embrionarias

La expresión del IGF-II en el ratón es detectada en todos los derivados trofoectodérmicos y después de manera transitoria en el endodermo primitivo parietal y visceral. Posteriormente su expresión es registrada en el mesodermo extraembrionario y luego en el mesodermo embrionario, en una zona lateral anterior y después extendiéndose a toda la región. El gen del IGF-II es expresado intensamente en todos los componentes que eventualmente formarán parte de la placenta corioalantoidea y delimita el interior de la cavidad del saco vitelino (Lee y col., 1990). Se han detectado transcritos en embriones de ratas de 10-16 d.g en el mesénquima de la cabeza, formado por una porción mesodérmica y otra cefálica de la cresta neural (Lee y col., 1990). También en todos los tejidos derivados de los somitas, mesodermo cardiaco, cartílago, tejido vascular y en el hígado e hipófisis (Bondy y col., 1990). Utilizando la técnica de RT-PCR se demostró la presencia del IGF-II y de sus receptores en embriones de dos células de ratón (Heyner y col., 1989). En adulto su expresión persiste a nivel de las meninges y en músculo estriado (Gray y col., 1987). Además, se ha identificado la participación del IGF-II directamente en el desarrollo de la placenta, ya que una delección del gen provoca una disminución en el crecimiento de la misma (DeChiara, 1990).

En el humano los estudios de la expresión del IGF-II durante el desarrollo fetal demuestran su presencia sobretodo en tejido conectivo, además en varios órganos como es el hígado, riñón y glándulas adrenales (Brice y col., 1989). La expresión del IGF-II es mucho mayor durante la etapa fetal que la adulta. Se ha propuesto que esta reducción está asociada con la diferenciación de un tipo celular en un tejido específico, sobretodo en el riñón y en las glándulas adrenales (Brice y col., 1989). Una supresión similar de la expresión del IGF-II relacionada con la diferenciación de un tipo celular se ha demostrado en hígado de rata alrededor del día de nacimiento y en el testículo fetal humano (Voutilainen y Miller, 1988).

e). Papel del IGF-II durante la esteroidogénesis

El desarrollo gonadal involucra además de cambios morfofisiológicos la capacidad de iniciar la esteroidogénesis, paso fundamental en la diferenciación posterior de las características sexuales secundarias. En el caso del desarrollo ovárico, este es un

fenómeno complejo que involucra la poliferación y diferenciación de los constituyentes foliculares, que de forma clásica es regulado por las gonadotropinas FSH (Hormona foliculo estimulante) y LH (Hormona luteinizante) (Giudice, 1992). Se ha demostrado que otras moléculas de origen ovárico también pueden regular este fenómeno como el estradiol, la progesterona, inhibina, activina, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento fibroblástico, factores angiogénicos y los IGFs (Revisado por Giudice, 1992). Las evidencias experimentales existentes, en cuanto a la participación del IGF-II en la esteroidogénesis, proceden de estudios realizados en células en cultivo e *in vivo* de adrenales (Mesiano y Jaffe, 1993), la granulosa (Mason y col., 1994), la teca (Nahum y col., 1995) e intersticiales de Leydig (Yuan y col., 1996), en distintos modelos de animales como son el humano, el porcino, la oveja, la rata y el ratón.

En el caso del humano y los porcinos se han realizado experimentos *in vitro* en donde tanto el IGF-I como el IGF-II estimulan directamente la producción de progesterona en células del cuerpo lúteo y amplifican el efecto de la gonadotropina coriónica (GC) (Caubo y col., 1989; Apa y col., 1996). También se ha visto que la insulina y el IGF-II poseen un efecto sinérgico en la esteroidogénesis de células de la granulosa (Mason y col., 1996; Xu y col., 1997). Además, ambos factores regulan la producción de andrógenos en células de la teca (Nahum y col., 1995; Willis y col., 1998) y el IGF-II incrementa la secreción basal de cortisol y de DHEA-S (Sulfato de dehidroepiandrosterona) inducidas por ACTH (Hormona adrenocorticotrópica) en las adrenales (Mesiano y Jaffe, 1993). Los estudios *in vivo* demuestran que el IGF-II incrementa la producción de esteroides inducida por ACTH en células fetales adrenales debido a el incremento de la expresión de enzimas esteroidogénicas clave como son la aromatasas P450_{ssc}, 17 α -hidroxilasa y 3 β HSD (3-beta hidroxiesteroidehidrogenasa) (Mesiano y Jaffe, 1993). Por otra parte, se ha demostrado que el RNA_m del IGF-II disminuye mientras que el IGF-I aumenta durante el desarrollo testicular de los porcinos y que el incremento en la expresión del IGF-II en células de la teca se relaciona con el aumento del tamaño folicular (Yuan y col., 1996).

En el caso de la rata los trabajos *in vitro* muestran que el IGF-II aumenta la esteroidogénesis inducida por LH/GC en células de la granulosa (Davoren y col., 1986; Cara y Rosenfeld, 1988) y en los cultivos de células intersticiales de Leydig donde se

postula que este efecto es parte de un control parácrino de este factor (DeMellow y col., 1987), además se ha detectado la expresión de las proteínas acarreadoras IGFBP-4 y 5 en células de la granulosa (Liu y col., 1993).

Por último en el conejo existe un sinergismo importante entre los IGFs y el estradiol en la regulación de la producción de la progesterona por células del cuerpo lúteo (Miller y Obasiolu, 1996).

Todo esto nos demuestra que los IGFs están participando dentro de la esteroidogénesis en células adrenales y gonadales en los mamíferos, además ya que se desconoce cuáles son los factores que inducen la esteroidogénesis en la etapa fetal, el estudio de la expresión del IGF-II durante el desarrollo gonadal de ratón es de suma importancia.

f). Aspectos evolutivos

La familia de los factores semejantes a insulina comprende a la insulina, a los IGFs y a la relaxina, agrupados por su parecido estructural con la primera, todos ellos son esenciales para el desarrollo, crecimiento y el metabolismo. Se ha propuesto que la insulina y los IGFs poseen un ancestro en común y que divergieron después de una duplicación génica que separó a la insulina de una molécula ancestral tipo IGF. Posteriormente ésta al duplicarse nuevamente dio origen al IGF-I y II, sin embargo, no se conoce con exactitud cuando se llevó a cabo esta divergencia (LeRoith y col., 1993; McRory y Sherwood, 1997). Se han realizado radioinmunoensayos que han permitido reconocer moléculas muy parecidas a la insulina, por ejemplo en moluscos e insectos, la molécula de insulina más antigua que se ha reconocido pertenece al grupo de los tunicados, lo que nos lleva a extender el origen de la insulina hasta un poco antes de la aparición de los vertebrados (McRory y Sherwood, 1997). También se ha reconocido una molécula tipo IGF en los tunicados, el *Amphioxus* (protocordado) y en el pez bruja, al parecer se trata de una molécula muy parecida a la que dio lugar a la divergencia entre el IGF-I y II, que ya reconocemos como tales a partir de los peces (aproximadamente 300 millones de años) (McRory y Sherwood, 1997).

Aunque los tres poseen un ancestro en común, la composición de bases del gen de la insulina y los IGFs es diferente. Las regiones codificantes de la insulina y del IGF-II son

ricas en GC (aproximadamente 65%), en cambio para el IGF-I es de 55% (Ellsworth y col., 1994). Esto podría deberse a que las presiones de selección para cada molécula han sido diferentes, en el caso del IGF-II este gen permanece en el mismo cromosoma junto con la insulina (7 en el ratón), en cambio el IGF-I se encuentra en otro cromosoma (10 en el ratón) debido a una translocación posterior a la duplicación, lo que nos llevaría a pensar que han seguido caminos evolutivos distintos (Ellsworth y col., 1994). De los estudios realizados se puede concluir que tanto la insulina como los IGFs aparecieron tempranamente en la historia evolutiva de los animales, especialmente de los vertebrados.

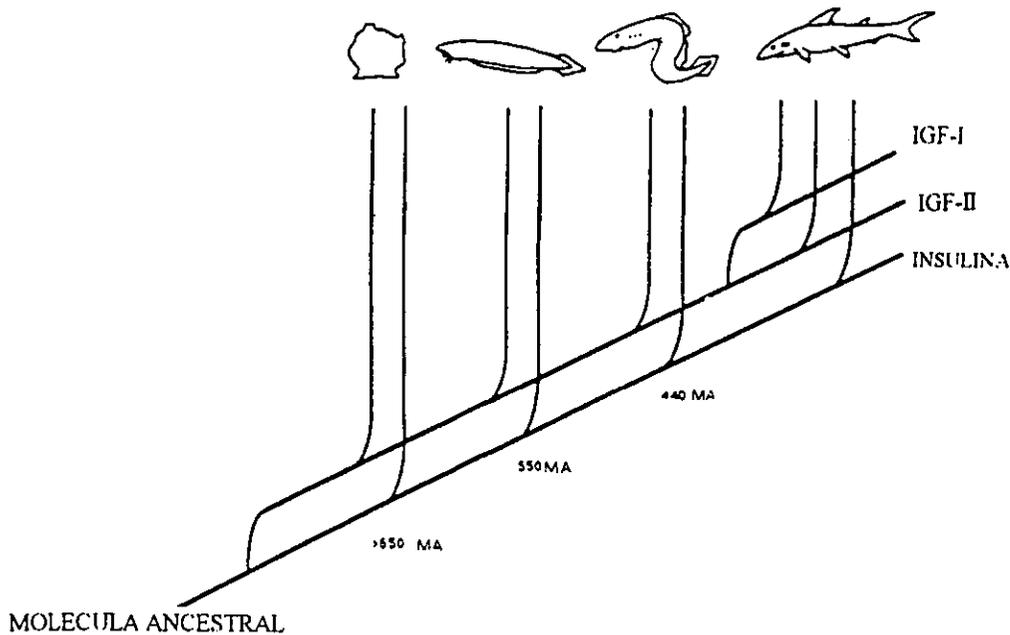


Fig 6. Arbol filogenético de los IGFs. (Tomado de: McRory y Sherwood, 1997. *DNA Cell Biol* 16: 939-949.)

6. El ratón $B6Y^{DOM}$

Buscando inducir inversiones en cromosomas metacéntricos utilizando hembras pertenecientes a la cepa de ratones C57BL/6J (B6) y cruzándolas con machos de la especie *Mus musculus poschiavinus* (POS A), Eicher y col (1982 y 1986) encontraron que a partir de la generación 4 la relación entre los sexos se inclinaba en favor de las hembras. Comenzaron a diseñar experimentos para intentar dar una posible explicación, al realizar el análisis cromosómico se mostró que algunas de las hembras eran machos

XY ($B6Y^{DOM}$) y que esto no tenía ninguna relación con la mutación bioquímica de alfa talasemia que produjeron a los machos tratados en la F1 (primera generación). Posteriormente, se llegó al descubrimiento de que las hembras XY sólo se producían si sus padres poseían el cromosoma Y heredado de un macho perteneciente a la generación F1. Este resultado indicaba que existía una mutación ligada al cromosoma Y que producía que los individuos XY sufrieran una reversión sexual hacia hembras fenotípicas. El 50% de los embriones XY desarrollaban ovarios mientras que el otro 50% eran hermafroditas desarrollando un ovario y un ovotestis o dos ovotestis respectivamente (Eicher y Washburn, 1986). De estos resultados se dedujo que existen genes autosomales en la cepa B6 que no se relacionan adecuadamente con el locus del Sry presente en la cepa POS A y que esta interacción anormal produce la reversión sexual. En otros estudios se observó que cuando se cruzaban ratones de la cepa B6 con la cepa *Mus musculus domesticus* se producía una reversión sexual a partir de la F2 (segunda generación) al igual que la reportada para *M. musculus poschiavinus* (Eicher y col., 1982; Eicher y Washburn, 1986).

El grupo de Eicher (1986) propuso que existía un gen autosomal que denominaron Tda-1 (Testis autosomal determining- 1) cuyo alelo en la cepa *M. musculus poschiavinus* o *domesticus* era dominante (TDA-1) y en la cepa B6 recesivo (tda-1). Lo que sucedía en la F1 era que al expresarse el alelo heterocigo, el gen dominante TDA-1, interaccionaba adecuadamente con el Y proveniente de la cepa *M. musculus poschiavinus/domesticus*. Mientras que, a partir de las retrocruzas teníamos un alelo homocigo recesivo que al expresarse no se relacionaba correctamente con el Sry del *M. musculus poschiavinus/ domesticus*. Ellos se plantean la hipótesis de que el alelo para el Sry perteneciente al $B6Y^{DOM}$ se expresa tardíamente en comparación con el del B6 y esto permitía la diferenciación del tejido ovárico (Eicher y Washburn, 1982 y 1986; Palmer y Burgoyne, 1991).

Posteriormente Lee y Taketo (1994) demostraron que la expresión del Sry se inicia de manera normal en ambas cepas lo que sucede en el caso del ratón $B6Y^{DOM}$ es que la inactivación de su expresión se ve retardada, es decir, los transcritos se localizan hasta los 14 d.g y no como en la cepa B6 cuya inactivación ocurre a los 12.5 d.g.

La evidencia genética indica que el *Sry* no es el único gen involucrado en la determinación sexual gonadal. Se ha postulado que una serie de genes autosomales o dentro del cromosoma X, deben actuar coordinados espacio-temporalmente con el *Sry* para iniciar la diferenciación testicular.

a). Desarrollo gonadal del ratón B6Y^{DOM}

La gónada del ratón B6Y^{DOM} puede diferenciarse en dos tipos distintos: ovarios u ovotestis, ya que nunca existe el desarrollo de un testículo normal (Lee y Taketo, 1994). Morfológicamente el ovario XY es igual al ovario XX, es durante el desarrollo postnatal cuando en el caso del XY existe una pérdida paulatina y constante de ovocitos, si éstos llegan a ser fecundados no se desarrollan más allá del estadio de dos células y pierden contacto celular con las células del cumulus (Taketo-Hosotani y col., 1989; Merchant-Larios y col., 1994; Lee y Taketo, 1994; Amleh y col., 1996). Además, poseen una baja producción de esteroides y no presentan una respuesta a dosis exógenas de gonadotropinas, particularmente durante la síntesis de testosterona (Villalpando y col., 1993). Las hembras presentan una conducta sexual normal ya que copulan con los machos, lo que se ha comprobado por la aparición de los tapones de cópula, aunque no llegan a producir crías. Se cree que el error es producto del desarrollo del mismo ovario ya que se ha visto que el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se establece en forma normal en las hembras XY (Merchant-Larios y col., 1994; Lee y Taketo, 1994; Vanderhyden y col., 1997). Por otra parte, se realizaron estudios con ratones quiméricos en donde se transplantaron ovocitos XY en gónadas donde el tejido somático es XX de ratones Balb/c y ovocitos XX en gónadas cuyo tejido somático es XY (B6Y^{TIR/DOM}). Los resultados mostraron que es el sexo genético en los ovocitos el que les produce una falla en su desarrollo posterior, ya que los ovocitos XX llegaron a ser fértiles aún cuando el tejido somático que los rodeaba era XY (Amleh y Taketo, 1998).

En el caso del ovotestis, este órgano está compuesto por una zona ventral que posee tejido testicular así como, una zona craneal y caudal donde se desarrolla tejido ovárico, razón por la cual estos individuos son considerados como hermafroditas. La túnica albúginea se desarrolla sólo en la zona donde encontramos los túbulos seminíferos, en cambio la región ovárica es cubierta por una capa sencilla de epitelio. En algunos

ovotestis en el punto donde se encuentran las regiones del testículo y el ovario, se observa que las células de la túnica albúginea mantienen un arreglo antiparalelo a la superficie gonadal (Nagamine y col., 1987). Dentro de la zona ovárica se presentan numerosas células germinales en meiosis, lo que indica el desarrollo de los ovocitos, aunque estas zonas posteriormente pueden ir degenerando. Podemos observar un gradiente en la cantidad de tejido ovárico y testicular que puede desarrollar una ovotestis, es decir, algunas gónadas presentan una gran cantidad de tejido testicular, donde la región ovárica es segregada hacia una de las puntas e incluso casi desaparecer, este tipo de ovotestis puede producir espermatoцитos y ser fértiles (Nagamine y col., 1987). Otros estudios ha demostrado que la expresión de la MIS en los ovotestis se encuentra retrasada en la cepa Y^{DOM} en comparación con la B6 en la cual sus componentes celulares están fuertemente teñidos indicando una activa expresión de la hormona, en cambio en los ratones $B6Y^{DOM}$ la expresión es muy tenue (Taketo y col., 1991). Esto podría sugerir que la reversión sexual de esta cepa de ratones es una consecuencia de la falla en la expresión de diversos factores, no necesariamente el Sry, sino de aquellos que se encuentran actuando hacia abajo de la cascada de eventos genéticos desencadenada por el factor determinante de el testículo.



Fig 7. Ovotestis de 13 d.g. de la cepa de ratones $B6Y^{DOM}$. La flecha señala el tejido ovárico, mientras que en la región anterior podemos observar el tejido testicular* (Tomado de: Nagamine y col., 1998. *Dev Biol* 196: 24-32).

b). Posibles genes involucrados en el desarrollo gonadal del ratón B6Y^{DOM}

A partir del modelo de reversión sexual que sufre la cepa B6Y^{DOM} se propuso que existían algunos genes autosomales involucrados en la diferenciación testicular. Posteriormente, con el estudio de locus genéticos ligados a una función específica se vio que eran dos los posibles factores involucrados mismos que se denominaron Tda-1 y Tda-2, localizados en los cromosomas 4 y 2 respectivamente. Se cree que las proteínas TDA podrían estar participando en la regulación de la expresión del Sry o ser activadas y/o reprimidas por dicho factor. Por otro lado se ha sugerido que los Tda pueden ser determinantes del ovario que se activan normalmente en embriones XX y que permanecen inactivos en los XY, pero que en el caso de la cepa B6Y^{DOM / POS} esto no sucede (Eicher, 1996).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Dentro del cromosoma Y existe una zona en el brazo corto que contiene el gen determinante de la diferenciación testicular conocido como Sry (Berta y col., 1990; Koopman y col., 1990). Los transcritos de este gen están presentes durante la etapa de gónada indiferenciada a los 10.5 d.g y desaparecen ya que ha ocurrido la diferenciación gonadal a los 13.5 d.g (Koopman y col., 1990; Jeske y col., 1996). La expresión de este gen coincide espacio temporalmente con la de otros genes y/o factores de crecimiento, lo cual podría estar regulando la diferenciación gonadal en los mamíferos.

Por otra parte, cuando se cruzan la cepa *Mus musculus domesticus* y la cepa B6 se produce una reversión sexual gonadal, la mitad de la descendencia XY (B6Y^{DOM}) desarrolla ovarios y fenotipo femenino (Taketo-Hosotani y col., 1989). Esto sugiere que existen genes autosomales o regiones dentro del cromosoma X involucrados en la diferenciación sexual gonadal que necesitan interactuar con el Sry para desencadenar la cascada de expresión génica que conduce a la diferenciación testicular completa (Eicher y Washburn, 1986; Eicher y col., 1996). En observaciones recientes del grupo de trabajo de la Dra. Villalpando se registró la expresión del RNA_m para el IGF-II en la gónada del ratón B6Y^{DOM}, el cual se expresa de manera diferencial a lo largo del desarrollo gonadal de esta cepa de 10.5 a 16 d.g, lo cual indica que probablemente este gen participe en la diferenciación gonadal de este ratón (Lizárraga, 1997). Se ha demostrado que la presencia de distintas especies de RNA_m para el IGF-II en la etapa adulta para diferentes tejidos, así como la presencia de sus receptores y sus IGFbps. Además, se ha observado la presencia del IGF-II en distintos órganos como el hígado, riñón y las glándulas adrenales en la fase embrionaria (Brice y col., 1989). Asimismo, este gen se ha involucrado en la síntesis tanto de hormonas gonadales como de las glándulas adrenales en la etapa adulta. Sin embargo, la expresión del mensajero del IGF-II no ha sido estudiada durante el desarrollo gonadal del ratón, ni tampoco se ha establecido su función en esta etapa.

Hipótesis

El IGF-II es un factor de crecimiento que se expresa diferencialmente en hembras y machos durante el desarrollo gonadal del ratón *Mus musculus* cepa B6.

IV. OBJETIVOS

1. Secuenciar el RNA_m del IGF-II que se expresa durante el desarrollo ontogenético de la gónada del ratón B6Y^{DOM} de 10.5 a 16 d.g.
2. Detectar la expresión del RNA_m del IGF-II durante el desarrollo ontogenético de la gónada del ratón *Mus musculus* cepa B6 de 10 a 18 d.g.

V. METODOLOGÍA

1. *Reactivos*

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

2. *Animales*

Se utilizaron animales de la cepa B6 pertenecientes a la colonia de la Dra. Irma Villalpando Fierro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los ratones se mantuvieron en condiciones de luz-obscuridad en periodos de 12 horas y fueron alimentados con Teklad 5-2335 mouse breeder diet 7004.

3. *Determinación de la edad de gestación*

La edad de gestación de los ratones se determinó observando los tapones de cópula, el día cero fue considerado el día en que se visualizó el tapón. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical, se les aplicó una solución de benzal-etanol (1:1) en el abdomen y se les realizó un corte en V con el fin de extraer los embriones. Estos fueron colocados en una caja de Petri estéril con medio mínimo esencial (MEM de GIBCO pH 7.4) y se procedió a la extirpación de los complejos urogenitales (10 d.g) o las gónadas (11-18 d.g). El estadio de desarrollo de los embriones se estableció usando el criterio del desarrollo del miembro posterior descrito por McLaren y Buehr (1990). A cada embrión se le hizo un corte diagonal que abarca la región media caudal para que expusiera el complejo urogenital o las gónadas y se extrajeron. El tejido fue congelado a -70°C hasta la extracción del RNA total.

En la figura 8 se señala el corte diagonal en un embrión de 11 d.g. realizado para exponer la gónada indiferenciada y proceder a su extirpación. Con líneas se indican el pronefros, metanefros y mesonefros, además de la cresta genital donde se encuentra la gónada. (Tomado de Lovell-Badge y Hacker, 1995)

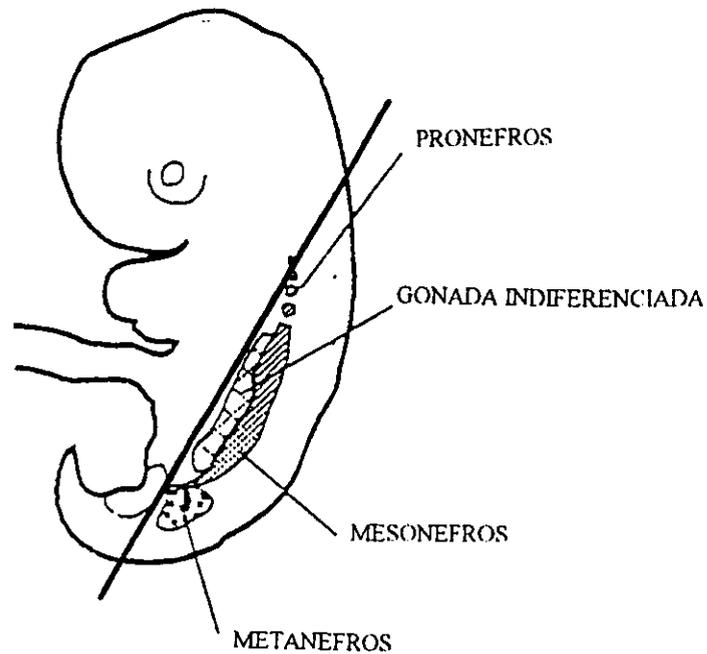


Fig 8. Corte diagonal que se realiza a un embrión de 11 d.g. El corte se lleva a cabo con la finalidad de exponer la gónada indiferenciada para posteriormente extraerla. (Tomado de Lovell-Badge y Hacker, 1995. *Phil Trans R Soc Lond B* 350: 205-214.)

4. Identificación del sexo genético

El sexado de los embriones se llevó a cabo por la técnica de la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR). Este es un método *in vitro* para llevar a cabo la síntesis de secuencias específicas de DNA, usando un par de oligonucleótidos sintéticos (a manera de cebadores) que hibridizan con las secuencias seleccionadas y flanquean la región de interés en el DNA. Una serie repetitiva de ciclos que incluyen la desnaturalización (94°C) del templado, alineación de los oligonucleótidos (65°C) y síntesis (72°C) por la DNA polimerasa resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico, cuyo término está definido por los extremos 5' de los oligonucleótidos. Debido a que los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como moldes en el siguiente, el número de copias de la secuencia deseada aproximadamente se duplica en cada ciclo. En este caso se amplificó un fragmento del gen del Sry presente en los machos (XY) y

ausente en las hembras (XX). Los oligonucleótidos se diseñaron en base a lo descrito por Jeske (1996), cada uno comprende 18 pb y delimitan un fragmento de 266 pb:

Sry K1

5' gagagcatggagggccat 3'

Sry K2

3' ccactcctctgtgacact 5'

La técnica de sexado procede en dos fases:

a). Aislamiento del DNA

Se extrajo tejido somático del embrión (cabeza) y se le adicionaron 500 μ l de amortiguador SET (ver apéndice página 55) y se homogeneizó aproximadamente 2 minutos. Se agregó 25 μ l de SDS al 10% y se agitó en el vórtex durante 10 segundos, posteriormente se le adicionó 2.5 μ l de proteinasa K y se volvió a agitar durante 10 segundos. Se incubó a 60°C 2 horas en un termomixer modelo 5436 de la casa Brinkmann Instruments. Se centrifugó a 12,000 r.p.m (revoluciones por minuto) 15 minutos a 4°C en una centrífuga Eppendorf modelo 5402. Se tomó 100 μ l del sobrenadante y se llevó a un volumen de 1 ml con agua estéril, de esta solución se volvió a tomar 1 μ l y se le adicionaron 4 μ l de agua tratada con DEPC(Di-etilpirocarbonato).

b). Amplificación del Sry

Se preparó una mezcla maestra que contenía 0.4 μ l del oligonucleótido Sry K1, 0.46 μ l del oligonucleótido Sry K2, 1.5 μ l de cada nucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) para tener una concentración final de 1.5 mM, 0.7 μ l de MgCl₂, 0.5 de amortiguador Tris 1M, 0.2 μ l de albúmina, 0.1 μ l de Nonidet 40, 0.06 μ l de agua tratada con DEPC, 0.5 μ l de (NH₄)₂SO₄, 0.04 μ l de Amplitaq polimerasa. Del DNA obtenido en el primer paso se tomó 1 μ l y se desnaturalizó 5 minutos a 94°C en un termociclador marca Perkin Elmer cetus (modelo 9600) después se le agregaron 9 μ l de la mezcla maestra para tener un volumen final de 10 μ l. Se incubó en el termociclador con el programa que comprende las siguientes temperaturas:

94°C 30 seg (Desnaturalización)

60°C 60 seg (Alineamiento de los oligonucleótidos)

72°C 60 seg (Síntesis de DNA)

La amplificación comprende un total de 30 ciclos. Como control se utilizó DNA de testículo (control positivo) y ovario (control negativo) de ratón de 9 semanas de edad .

5. Obtención del RNA total

Para la extracción del RNA total se uso la técnica de Chomczynski y Sacchi (1987). Se homogeneizaron un par de gónadas con 100 µl de la solución D (solución de tiocianato de guanidina), después se adicionaron los siguientes reactivos de manera secuencial: 10 µl de acetato de sodio 2M pH 4, 100 µl de fenol saturado con agua y 20 µl de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1). Se mezcló ligeramente en un vórtex 10 segundos y al final se incubó a 4⁰C 15 minutos. Se centrifugó a 14,000 rpm, 20 minutos a 4⁰C. La fase acuosa se transfirió a tubos eppendorf tratados con DEPC y se adicionaron 100 µl de isopropanol (-20⁰C), se agitaron las muestras con la mano suavemente 10 segundos y se precipitó a -70⁰C media hora o a -20⁰C una hora. Se volvió a centrifugar bajo las condiciones ya mencionadas y el botón se resuspendió en 30 µl de la solución D. Se agregó el mismo volumen de isopropanol y se precipitó como lo descrito anteriormente. Los tubos se vuelven a centrifugar y se decantó el sobrenadante, el botón se lavó con 100 µl de etanol al 75% y se centrifugó bajo las mismas condiciones por 10 minutos. El lavado se repite hasta tres veces cuando es necesario. Las muestras se colocan en un desecador media hora a temperatura ambiente o una hora a 4⁰C. El RNA total de cada muestra se resuspendió en 3 µl de agua estéril filtrada y tratada con DEPC y se almacenó a -70⁰C (12-24 horas).

6. Amplificación del transcrito del IGF-II en la cepa B6

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación del transcrito del IGF-II fueron diseñados de acuerdo al DNA de ratón descrito por Stempien y col. (1986) se usaron un par de oligonucleótidos, cada uno comprende 18 pb y delimitan un fragmento de 429 pb correspondiente al precursor de la proteína :

IGF-II

5' atgttggtgcttctcatc 3' (sentido)

3' ctctctgaactctttgag 5' (antisentido)

Como control para la amplificación del transcrito del IGF-II se utilizó un gen que se expresa constitutivamente, la enzima Hprt (Hipoxantina- fosforribosil-transferasa) que participa en la rutas de salvamento de nucleótidos, específicamente en la recuperación de purinas en vertebrados que son reutilizadas en la biosíntesis de nucleótidos. Para esta enzima los oligonucleótidos empleados fueron los descritos por Lee y Taketo (1994) comprenden 25 pb y delimitan un fragmento de 352 pb:

5' cctgctggattacattaaagcactg 3'

3' gtcaagggcatatccaacaacaaac 5'

Para cada edad y sexo se realizaron tres repeticiones, tanto para el IGF-II como para la Hprt.

a). Obtención del DNA complementario con la técnica de transcriptasa reversa (RT-PCR)

La técnica de transcriptasa reversa consiste de dos partes, en la primera se obtiene el cDNA (DNA complementario) del IGF-II y de la enzima Hprt a partir del RNA_m obtenido de los complejos urogenitales/gónadas y posteriormente se amplifica con PCR para observar su expresión.

Se realizó una mezcla maestra que contenía 4 µl de MgCl₂, 2 µl de amortiguador II 10X para PCR, 2 µl de cada nucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1 µl de inhibidor de RNasas, 1 µl de hexámeros, además por separado en nuestra muestra experimental 1 µl de retrotranscriptasa y en nuestra muestra control 1 µl de agua tratada con DEPC y en ambas 3 µl de RNA previamente desnaturalizado en el termociclador 94 C^o5 minutos. El volumen final de la reacción fue de 20 µl. Se incubó utilizando un ciclo que contiene las siguientes temperaturas:

25°C 10 min

42°C 60 min

99°C 5 min

b). PCR

Se realizó una mezcla maestra que contenía 8 µl de MgCl₂, 16 µl de amortiguador II 10X para PCR, 131 µl de agua tratada con DEPC, 1 µl de polimerasa Taq, por separado a cada tubo se le

adicionó 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos según fuera el caso (IGF-II o Hprt). Se incubó en el termociclador con el siguiente programa:

94°C 2 min

55°C 15 seg 1 ciclo

72°C 30 seg

94°C 15 seg

55°C 15 seg 29 ciclos

72°C 10 min

Los productos se almacenaron a una temperatura de -20°C.

Se usaron 31 ciclos de amplificación en total.

c). Visualización del transcrito del IGF-II

Para visualizar los resultados obtenidos se preparó un gel de agarosa al 2% con amortiguador TBE 0.5X pH 8.2. Se empleó el marcador de bajo peso molecular (Low DNA mass ladder GIBCO BRL) para estimar el peso molecular de muestras de DNA teñidas con bromuro de etidio que pueden ir de 100-2000 pb del cual se tomaron 4 μ l y se colocaron en el pozo del gel. De cada tubo de producto amplificado se tomaron 10 μ l y se mezclaron con 4 μ l de amortiguador de carga y se colocó en un pozo del gel. Se realizó la electroforesis usando amortiguador TBE 1X pH 8.2 a 120 voltios durante 50 minutos a temperatura ambiente. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.8% en agua destilada 10 minutos y los productos se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta.

d). Fotografías

Las fotografías de los geles fueron tomadas con una cámara Polaroid Gelcam modelo PHC 34 de la casa Hoefer Scientific Instruments y se usó una película instantánea en blanco y negro Polaroid Polapan 667 ISO 3000/36° (8.5 x 10 cm), el tiempo de revelado fue de un minuto.

7. Secuenciación del producto amplificado

La técnica de secuenciación utilizada es la descrita por Sanger (1977). Esta se basa en el uso de terminadores específicos de la síntesis del DNA durante la elongación, los 2',3'-dideoxynucleósido-5'-trifosfato (ddNTP). Estos terminadores son análogos que pueden ser incorporados por la DNA polimerasa a la cadena que se está sintetizando a través del grupo 5 trifosfato. Los análogos al carecer del grupo hidroxilo en la posición 3' no pueden formar enlaces fosfodiéster con el siguiente nucleótido y en ese momento se detiene la síntesis. El resultado son segmentos de DNA terminados en un nucleótido específico.

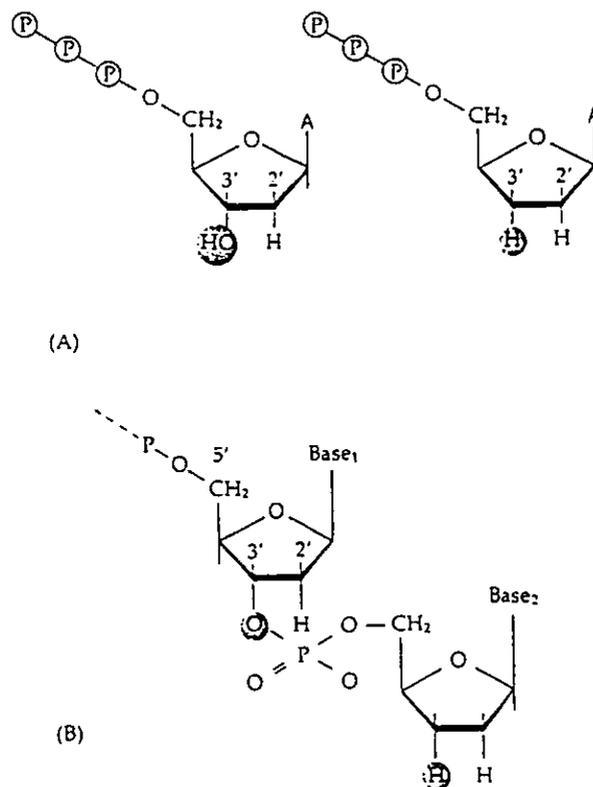


Fig 9. A: Comparación entre los deoxinucleótidos y los dideoxynucleótidos empleados en la técnica descrita por Sanger (1977). La diferencia entre ambos se encuentra en el grupo hidroxilo que poseen los deoxinucleótidos y el hidrógeno de los dideoxynucleótidos. B: Se muestra el extremo 3' de una cadena de DNA cuya síntesis se ha detenido debido a la incorporación del dideoxynucleótido ya que este último no posee el grupo hidroxilo que permite que continúe la síntesis del DNA por la polimerasa (Tomado de : Gilbert, 1988. *Developmental Biology*, 843p).

a). Preparación del DNA para secuenciación

Para asegurarnos que el producto de PCR se encontraba limpio se procedió primero a correr un gel de agarosa de bajo punto de fusión de la casa BioRad (Amersham) mismo que se tiñó con bromuro de etidio al 0.8%, posteriormente se procedió a purificarlo de la siguiente manera:

i) Se cortó la banda del gel donde se encuentra el producto, en este caso la banda del IGF-II con un peso molecular de 429 pb. Esto se colocó en un tubo estéril, se le agregaron 500 μ l de agua desionizada y se incubó a 65°C para que se fundiera la agarosa. Se le adicionaron 350 μ l de amortiguador TE 1X y se llevo a cabo una primera extracción de DNA con un volumen doble de fenol saturado con amortiguador Tris, se mezcló con el vórtex durante 30 segundos y se congeló a -70°C dos horas. Se centrifugó a 14,000 rpm 10 minutos y se retiró el sobrenadante. Se volvió a adicionar un doble volumen de fenol saturado con amortiguador Tris y se centrifugó bajo las condiciones anteriores, se tomó el sobrenadante. Se agregó el mismo volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó en las condiciones ya mencionadas, este paso se repitió una vez más. Se precipitó el DNA con 7.5 M de NaCl y el doble de volumen de etanol al 100%, se agitó con la mano y se centrifugó como ya se había establecido. El botón se secó al vacío durante media hora a temperatura ambiente y se resuspendió en 15 μ l de amortiguador TE 1X. Al final se corrió nuevamente otro gel de agarosa para observar si efectivamente teníamos el producto puro para secuenciar. Se usaron de 1-5 μ l de DNA por reacción de secuenciación.

b). Reacción de secuenciación

Se llevó a cabo una mezcla de reacción que contenía 10 μ l de muestra experimental ó 10 μ l de agua estéril como control, a los que se les adicionó una mezcla para secuenciación que contenía 1 μ l de oligonucleótido, 1.5 μ l de dATP marcado con fósforo³³ (α^{33} dATP), 4 μ l de amortiguador 10X para PCR y 13.5 μ l de agua estéril para tener un volumen final de 30 μ l. De esta mezcla se tomaron 6 μ l y se adicionaron a tubos para PCR (4) que contenían 2 μ l de cada análogo de nucleótido (terminador: ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), para tener un volumen por tubo de 8 μ l. La reacción de secuenciación se realizó en un termociclador Perkin Elmer Cetus modelo 9600 utilizando los mismos ciclos de temperaturas que los usados para amplificar el IGF-II. Al finalizar la reacción se le agregó 4 μ l de solución terminadora y se guardaron las muestras a -20°C. En total se realizaron tres reacciones de secuenciación, en la segunda y la tercera se modificó el

programa de temperaturas con la finalidad de dar un mayor número de ciclos de alineamiento de los oligonucleótidos para luego también extender la fase de síntesis como sigue:

Segunda reacción

95°C 2 min
94°C 15 seg
55°C 15 seg 35 ciclos
72°C 30 seg

Tercera reacción

95°C 2 min
94°C 15 seg
55°C 15 seg 35 ciclos
72°C 30 seg

94°C 15 seg
55°C 15 seg 1 ciclo
72° C 10 min

c). Preparación de las placas de secuenciación

Se utilizaron dos placas de vidrio grandes previamente tratadas con una solución de NaOH 2N, se enjuagaron con agua corriente y luego con agua destilada, se secaron perfectamente con papel rolo. Posteriormente se les agregó a una el sigmacote (Sigma) y a la otra el 3-Metilcriloyloxipropiltrimetoxi-xilano, nuevamente se enjuagaron con agua corriente y agua destilada y se secaron cuidadosamente, cuando estuvieron listas se colocaron los separadores entre ambas y se les selló con cinta de teflón perfectamente, al final se aseguraron las orillas con cinta de aislar y se les colocaron unas pinzas en los extremos para ejercer presión de manera homogénea.

d). Elaboración del gel

El gel se preparó con 80 ml de solución de acrilamida al 6%, 9.8 µl de TEMED y 45 mg de persulfato de amonio. Las placas de vidrio se llenaron por la orilla despacio con la acrilamida utilizando una jeringa procurando evitar la formación de burbujas, mientras se llevó a cabo el

vaciado, al final se colocó el peine de tiburón y las dos últimas pinzas, se dejó gelificar en una cámara húmeda aproximadamente 12 horas.

e). Electroforesis

La corrida del gel se realizó en una cámara de electroforesis para secuenciación IBI 80000 modelo STS-45 en la cual se colocaron las placas de vidrio, se les extrajo el peine, se selló con un par de gomas y agarosa al 2% y se llenó con amortiguador TBE 1X en la base de la cámara de electroforesis y amortiguador TBE 0.5X en la parte superior, con la finalidad de crear un gradiente de concentración para que las muestras migraran perfectamente. Se revisó que tanto en la parte superior como inferior no se formen burbujas y se eliminó el gradiente de urea sobretodo en los pozos del gel con una jeringa. Se colocaron 8 μ l de las muestras previamente desnaturalizadas a 94-95°C en un baño María lo más rápido posible en cada uno de los pozos. Se llevó a cabo una precorrida durante una hora y media a 1800 voltios con la finalidad de homogeneizar la temperatura del gel, con esto aseguramos que las muestras se mantienen desnaturalizadas y no existe complementación de las hebras de DNA. Se realizaron la primera y la segunda corrida ambas durante dos horas. Al final se desmontaron las placas y se les quitó la agarosa, los separadores y el peine. Se enjuagó con agua corriente y se despegó con ayuda de una espátula cuidadosamente. La placa que tiene el gel se trató con la solución fijadora 12 horas, posteriormente se dejó secar.

f). Autoradiografía

La placa fue expuesta a una película KODAK (Biomax film MR-1) 35 x 43 cm durante 24 a 48 horas. Se reveló utilizando una solución reveladora y una fijadora de la casa KODAK GBX Cat. 1900943 y 1901859 respectivamente. Se dejó secar aproximadamente 30 minutos. Al final se llevo a cabo la lectura de cada corrida y se obtuvo la secuencia del transcrito comparándola con el ϕ DNA obtenido por Stempien y col. (1986).

VI. RESULTADOS

1. Determinación del sexo de los embriones por PCR

Se determinó el sexo de los embriones de ratón de 10, 11 y 12 d.g utilizando la técnica de PCR, la cual amplifica un fragmento de 266 pb perteneciente al *Sry* presente en los machos (XY) y ausente en las hembras (XX). Como control positivo y negativo se usó testículo de macho adulto y ovario de hembra adulta respectivamente.

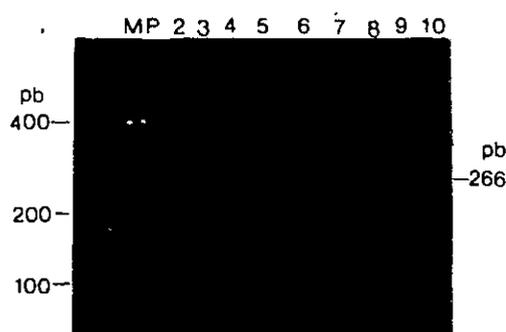


Fig 10. Determinación del sexo genético de hembras y machos de la cepa B6. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (MP). En el carril 3 se muestra la banda del *Sry* en el testículo adulto de 266 pb y en el 4 se muestra el ovario adulto. En los carriles 5 y 9 se ven gónadas de 12 d.g de ratón cuyo sexo genético es XY. En los carriles 6, 7, 8 y 10 se muestran gónadas de ratón de 12 d.g. cuyo sexo genético es XX.

2. Amplificación del IGF-II en la cepa B6

La expresión del RNA_m del IGF-II se detectó inicialmente a los 10 d.g en los complejos urogenitales en los machos y las hembras. A los 11 d.g (gónada indiferenciada) el transcrito no fue detectado en la gónada XY, mientras que su expresión se mantuvo en las gónadas XX. De los 12 a los 18 d.g. (dato no mostrado) la expresión del RNA_m del IGF-II se mantuvo constante. Los transcritos de la *Hprt* se observan constantemente de los 10 a los 18 d.g. en testículo y ovario. Cada uno de los experimentos se realizó tres veces.

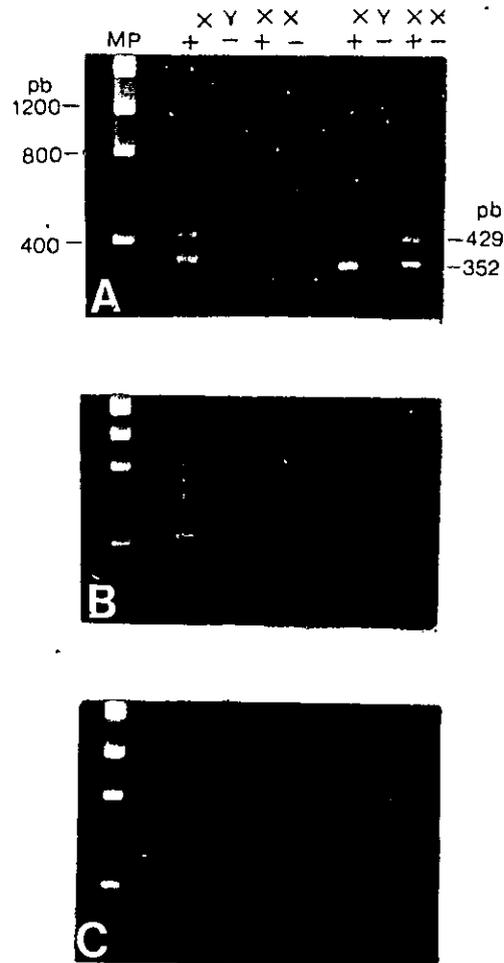
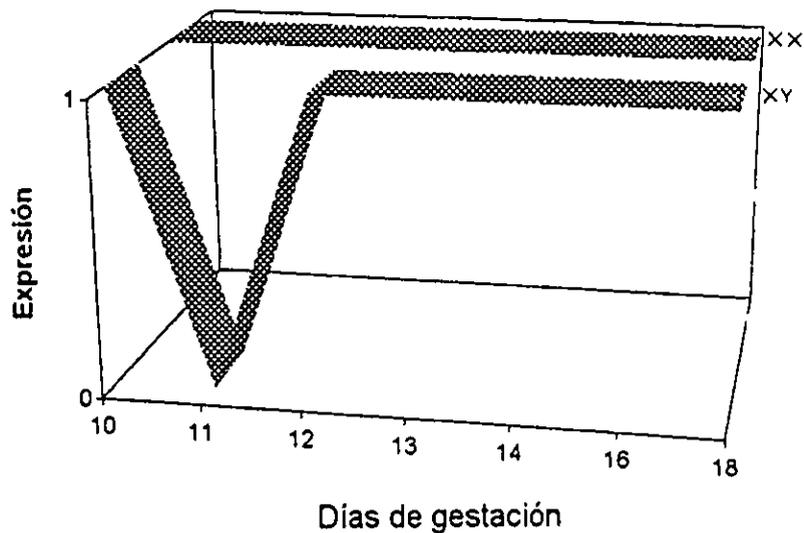


Fig 11. Expresión del RNA_m del IGF-II y de la enzima Hprt durante el desarrollo gonadal del ratón B6. A: El transcrito del IGF-II se detecta inicialmente a los 10 d.g. en los complejos urogenitales de las gónadas XY y XX. Sin embargo, a los 11 d.g. en las gónadas XY la expresión de este mensajero no se detectó. B y C: La expresión del RNA_m del IGF-II es similar de los 12 a los 16 d.g. Asimismo, el Hprt se observa constante en las edades antes mencionadas. El transcrito del IGF-II tiene un peso molecular de 429 pb mientras que el de la enzima Hprt es de 352 pb. El experimento control se muestra como (-) sin transcriptasa reversa y el experimental con signo (+) con transcriptasa reversa.



Gráfica 1. Expresión del RNA_m del IGF-II durante el desarrollo gonadal de la cepa B6. El transcrito se detectó de forma inicial a los 10 d.g en las gónadas XX y XY. Se observa la disminución en la expresión del IGF-II a los 11 d.g en las gónadas XY. Posteriormente, los transcritos de este gen se detectan constantemente en todas las edades estudiadas en ambos sexos.

3. Secuenciación del transcrito del IGF-II

La secuenciación del transcrito del IGF-II se llevó a cabo utilizando el método de Sanger (1977) de los terminadores de la síntesis de DNA (dideoxinucleótidos). El tamaño de este transcrito es de 429 pb y corresponde al precursor de la proteína del IGF-II de acuerdo a lo descrito por Stempien y col (1986). En la figura 12 se muestra la fotografía de un gel de secuenciación con la secuencia parcial del IGF-II. La secuencia completa para el IGF-II se observa en la figura 13.

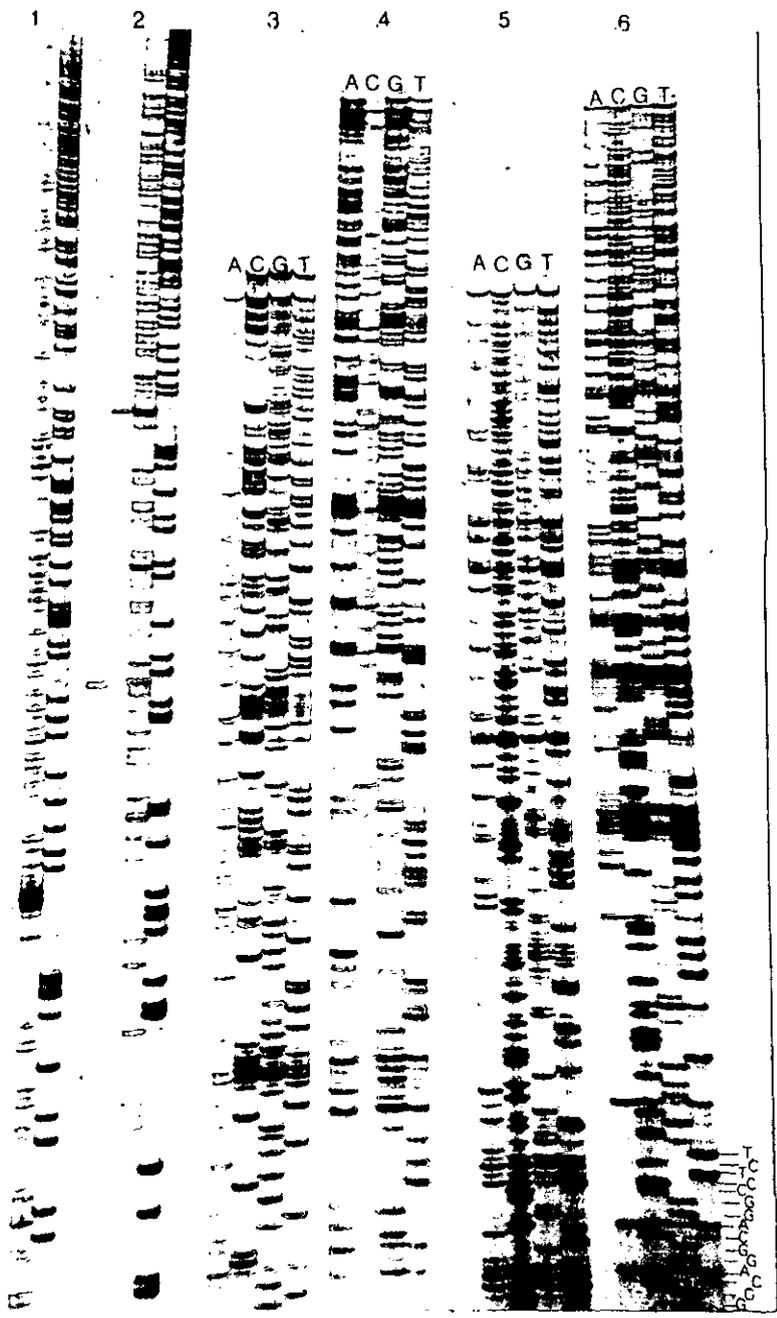


Fig 12. Secuenciación del transcrito perteneciente al IGF-II. Se muestra la secuenciación parcial del transcrito del IGF-II. Las dos primeras columnas (1 y 2) corresponden al fago pBSMB empleado como control. Las cuatro columnas subsecuentes (3 a 6) corresponden a el transcrito para el IGF-II amplificado en la cepa B6Y^{DOM}.

↓

ATGTTGGTGCTTCTCATCTCTTTGGCCTTCGCCTTGTGCTGCATCGCTGCTT
 ACGGCCCGGAGAGACTCTGTGCGGAGGGGAGCTTGTTGACACGCTTCAGTTT
GTCTGTTCCGACCGCGGCTTCTACTTCAGCAGGCCTTCAAGCCGTGCCAACCGT
CGCAGCCGTGGCATCGTGGAAGAGTGCTGCTTCCGCAGCTGCGACCTGGCCCTC
CTGGAGACATACTGTGCCACCCCGCCAAGTCCGAGAGGGACGTGTCTACCTC
 TCAGGCCGTACTTCCGGACGACTTCCCCAGATACCCCGTGGGCAAGTTCTTC
 CAATATGACACCTGCAGACAGTCCGCGGGACGCCTGCGCAGAGGCCTGCCTG
 CCCTCCTGCGTGCCCGCCGGGGTTCGCATGCTTGCCAAAGAGCTCAAAGAGT
 TCAGAGAG

↑

Fig 13. Secuencia obtenida a partir del fragmento amplificado del IGF-II. Se señalan la localización de los oligonucleótidos sintéticos utilizados para amplificar el transcrito. Este fragmento corresponde en un 100% al DNA de placenta descrito por Stempien y col. (1986) para el precursor de la proteína del IGF-II. La secuencia del péptido maduro se encuentra subrayada.

VII. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del presente trabajo se detectó la expresión del transcrito para el RNA_m del IGF-II, correspondiente al precursor de la proteína, durante el desarrollo de la gónada del ratón *Mus musculus* en la cepa B6 de los 10 a los 18 d.g. La expresión del transcrito para el IGF-II durante el desarrollo gonadal se observó de los 10.5 a los 16 d.g. previamente en el ovario del ratón B6Y^{DOM} cepa en la cual los machos sufren una reversión sexual hacia hembras fenotípicas (Lizárraga-Sánchez, 1997). La secuenciación del IGF-II y la comparación con el cDNA placentario descrito por Stempien y col. (1986), mostró una homología del 100% entre el transcrito amplificado y la secuencia descrita, lo que quiere decir que el mensajero maduro que transcribe el IGF-II y que se está expresando en las gónadas fetales, es el mismo que se transcribe en la placenta del ratón. Dado que el ratón B6Y^{DOM} es el resultado de la cruce entre la cepa B6Y^{DOM} y la B6, no sabíamos si en esta última la expresión de este gen era diferente antes y después de que se llevara a cabo la diferenciación sexual gonadal. Por lo tanto, era importante realizar el estudio en una cepa cuya diferenciación sexual siguiera el patrón normal de desarrollo gonadal y que compartiera un mismo fondo genético con la cepa Y^{DOM}, con el fin de tener un punto de comparación con respecto a la expresión del IGF-II e intentar vislumbrar los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la determinación sexual gonadal en estos ratones. En el presente estudio el transcrito del IGF-II se detectó inicialmente a los 10 d.g en las gónadas XX y XY de la cepa B6. Sin embargo, a los 11 d.g no se observó la expresión de este gen en las gónadas XY, mientras que en las XX la expresión del IGF-II se mantiene constante. En la cepa B6Y^{DOM} esta disminución también sucede a los 11 d.g las gónadas XY (Lizárraga-Sánchez, 1997), lo que podría estar mostrando la existencia de una expresión diferencial, tal vez relacionada con el sexo heterogamético de la gónada fetal. Lee y Taketo (1994) demostraron que la mayor expresión del Sry en la cepa B6 es detectada a los 11 d.g en las gónadas de los machos y es en esta etapa cuando el mensajero que codifica para el precursor del IGF-II disminuye considerablemente en las gónadas XY, tanto en la cepa B6 como en la B6Y^{DOM}. La expresión del Sry se prolonga en la cepa B6Y^{DOM} hasta los 14 d.g. (Lee y Taketo, 1994) mientras que en la cepa B6 este gen se detecta hasta los 12.5 d.g. Se ha propuesto que este aumento en los días de expresión del Sry provoca una falla en la regulación posterior

de otros genes que posiblemente estén interviniendo en la diferenciación testicular (Lee y Taketo, 1994). La relación inversa que existe entre la máxima expresión del Sry y la disminución del IGF-II, nos sugiere que probablemente este gen no sea regulado por el Sry. Otra posibilidad es que ambos genes actúen independientemente, pero de manera paralela controlando procesos diferentes cuyo resultado será la formación del testículo embrionario. Brice y col. (1989) propusieron que la disminución en la expresión del IGF-II en la fase embrionaria en el humano está relacionada con la diferenciación de un tipo celular en un tejido específico. Por lo tanto, la disminución de la expresión del IGF-II en la etapa que precede a la diferenciación de las gónadas probablemente conlleva a la aparición de distintos tipos celulares. Puesto que una célula no puede dividirse y diferenciarse al mismo tiempo el hecho de que disminuya la expresión del IGF-II antes de que se lleve a cabo la diferenciación gonadal (12 d.g) posiblemente esté permitiendo que ocurra la diferenciación de algún tipo celular particular.

La diferencia en la expresión del IGF-II se lleva a cabo antes de la etapa crítica de diferenciación gonadal en el ratón, en la cual los cordones sexuales experimentan compactación y existe una gran proliferación de tejido estromático en los machos genéticos. Además, hay invasión de vasos sanguíneos desde la región del mesonefros (Merchant-Larios, 1991; Buehr y col., 1993), lo que produce que la gónada adquiera un mayor volumen característico del testículo en desarrollo. La detección de la expresión de este gen durante el periodo de determinación sexual de la gónada de los 12 a los 18 d.g. correspondientes a las etapas de crecimiento, sugiere que el IGF-II podría estar participando como mitógeno durante el desarrollo gonadal del ratón, puesto que el IGF-II es un factor mitogénico y que promueve la diferenciación (Mercola y Stiles, 1988; Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992). Sin embargo, habría que determinar la cinética de proliferación gonadal para cada tipo celular.

La participación de los IGFs en la esteroidogénesis en etapa adulta se encuentra bien documentada en la literatura puesto que se ha demostrado su expresión en células de la granulosa y teca del ovario adulto en humano, porcino, rata y ratón. El IGF-I y II intervienen en la regulación de la producción de progesterona en el cuerpo luteo, participan en la esteroidogénesis de células adrenales fetales y de adulto, estimulan la producción de testosterona por las células intersticiales de Leydig y participan en el

desarrollo testicular (Mason y col., 1996; Nahum y col., 1995; Willis y col., 1998; Mesiano y Jaffe, 1993; Miller y Obasiolu, 1996). Específicamente el IGF-II, parece participar en la regulación de la expresión de enzimas clave en el proceso de la conversión de colesterol a esteroides sexuales como son la aromatasa P450_{arcc} y la 3- β HSD (3-beta hidroxisteroideshidrogenasa) en etapa adulta (Voutilainen y Miller, 1988; Giudice, 1992). La expresión constante del transcrito del IGF-II a lo largo de la ontogenia del desarrollo gonadal de ratón, tanto en machos como en hembras, indica su posible participación en procesos de diferenciación morfológica pero aún queda por determinar su papel en la esteroidogénesis gonadal.

Se ha demostrado que el IGF-I y II son factores de secreción endócrina, parácrina y autócrina (Hammond y col., 1989; Han y col., 1992). Durante las primeras fases de desarrollo en el ratón los factores que tendrán una mayor intervención dentro de los procesos de diferenciación deben de ser factores de secreción autócrina y parácrina, porque todavía se encontrarán en desarrollo las vías de secreción endócrina. Los factores de crecimiento como los IGFs son sumamente importantes en la etapa fetal ya que posteriormente serán desplazados por otros cuya secreción es principalmente endócrina, como la insulina en este caso (Hammond y col., 1989; Sara y Hall, 1990; Giudice, 1992; Han y col., 1992). Se ha visto que existe una disminución de la expresión del IGF-II en la etapa adulta, en donde la regulación del IGF-II es independiente de GH (Giudice, 1992), en comparación con su expresión en la etapa fetal, en la cual este gen es regulado por el lactógeno placentario (Gray y col., 1987). Estas diferencias en la regulación podrían explicar porque en el caso del humano y el ratón el IGF-II es el factor que se expresa más durante la etapa embrionaria.

Los IGFs son factores que se encuentran desde etapas evolutivas muy tempranas dentro de la historia filogenética de los animales; se han descrito moléculas homólogas a los IGFs a partir de los protocordados y en los insectos se han identificado moléculas pertenecientes a la familia de la insulina (McRory y Sherwood, 1997). Los IGFs son genes parálogos producto de una duplicación génica que dió lugar a la divergencia entre la insulina y una molécula ancestral a los IGFs (LeRoith y col., 1993). El caso de la insulina y los IGFs demuestra como a partir de dos duplicaciones sucesivas tenemos tres factores que llevan a cabo funciones muy distintas dentro del desarrollo ontogénico de

los animales y que la adquisición de nuevas funciones conlleva un incremento en el número de genes (Holland y col., 1994). El papel que estos factores tienen dentro de la evolución de los vertebrados debe guardar una relación con la evolución de los patrones de desarrollo y la regulación de los procesos mitogénicos y de diferenciación.

Debido a la organización de este gen se puede decir que su regulación debe ser complicada y que debe existir una producción de distintos transcritos ya que posee tres sitios posibles de corte y empalme alternativo de los tres primeros exones (Stempien y col., 1986; Rotwein y Hall, 1990). En la gónada fetal del ratón no se han detectado la expresión diferencial de transcritos, que al menos deben de ser tres diferentes y se desconoce cuales promotores están regulando su posible expresión. Se han descrito diferentes especies del mensajero durante el desarrollo de diferentes órganos y etapas de desarrollo en el humano, además, de que se han identificado los promotores participantes (Stempien y col., 1986; de Pagter-Holthuizen y col., 1987; Sara y Hall, 1990; Rotwein y Hall, 1990; Holthuizen y col., 1993). El papel biológico que estos transcritos tienen durante la diferenciación gonadal es desconocido, de manera que el estudiar la expresión de los mensajeros, el uso de los disitintos promotores y otros elementos regulatorios ayudará a comprender la regulación de este gen y el papel que tiene dentro del desarrollo y diferenciación sexual gonadal del ratón.

Asimismo, un estudio posterior deberá incluir la identificación de la expresión del IGF-II durante el desarrollo de los ovotestis. Sería importante el conocer si en el caso de los ovotestis este patrón de expresión tendría relación con la cantidad de tejido testicular que se estaría diferenciando en etapas posteriores en el ratón hermafrodita, y por lo consiguiente en el desarrollo ulterior de sus características fenotípicas sexuales y su fertilidad. Además, es necesario que se registre si la expresión del mensajero coincide con la síntesis de la proteína y en que tipos celulares se realiza, para poder conocer de una forma mucho más localizada que células lo están produciendo ya que se ha propuesto que el IGF-II se encontrará preferencialmente en zonas donde se lleva a cabo la diferenciación (van Kleffens y col., 1998). También se deben identificar el tipo de receptores y las IGFbps que se están expresando en la gónada, ya que a través de ellos ejerce su acción fisiológica el IGF-II.

VIII. CONCLUSIONES

1. El IGF-II es un factor que se expresa de manera diferencial en las gónadas de hembras y machos a los 11 d.g, ya que existe una disminución en su expresión en las gónadas XY, antes de que se lleve a cabo la diferenciación gonadal en el ratón.
2. La disminución en la expresión del RNA mensajero del IGF-II a los 11 d.g. posiblemente esté permitiendo que en la gónada XY comience la diferenciación del tejido testicular.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-Buylla A. y Merchant-Larios H. 1986. Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. **Exp Cell Res** 165: 362-368.
2. 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*. **Dev Biol** 178: 263-275.
3. Amleh A. y Taketo T. 1998. Live-borns from XX but not XY oocytes in the chimeric mouse ovary composed of B6.Y^{TR} and XX cells. **Biol Reprod** 58: 574-582.
4. Apa R., Di Simone N., Ronsisvalle E., Miceli F., de Feo D., Caruso A., Lanzone A. y Mancuso S. 1996. Insulin-like growth factor (IGF) -I and IGF-II stimulate progesterone production by human luteal cells: role of IGF-I as mediator of growth hormone action. **Fertil Steril** 66: 235-239.
5. Berta P., Hawkins J.R., Sinclair A.H., Taylor A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N. y Fellous M. 1990. Genetic evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. **Nature** 348: 448-450.
6. Bondy C.A., Werner H., Roberts C.T. y LeRoith D. 1990. Cellular pattern of Insulin like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: comparison with IGF-II gene expression. **Mol Endocrinol** 4:1386-1398.
7. Brice A.L., Cheetham J.E., Bolton V.N., Hill N.C.W. y Schofield P.N. 1989. Temporal changes in the expression of the IGF-II gene associated with tissue maturation in the human fetus. **Development** 106 :543-554.
8. Buehr M., Gu S. y McLaren A. 1993. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. **Development** 117: 273-281.
9. Capel B., Swain A., Nicolis S., Hacker A., Walter M., Koopman P., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. 1993. Circular transcripts of the testis-determining gene *Sry* in adult mouse testis. **Cell** 73: 1019-1030.
10. Cara F. y Rosenfeld R.L. 1988. Insulin-like growth factor I and Insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. **Endocrinology** 123: 733-739.
11. Caubo B., De Vinna R.S. y Tonetta S.A. 1989. Regulation of steroidogenesis in cultured porcine theca cells by growth factors. **Endocrinology** 125: 321-326.
12. Clemmons D.R. 1993. IGF binding proteins and their functions. **Mol Reprod Dev** 35: 368-375.

13. Cohen P., Fielder P.J., Hasegawa Y., Frisch H., Giudice L. y Rosenfeld R.G. 1991. Clinical aspects of insulin-like growth factor binding proteins. **Acta Endocrinol (Copenh)** 124: 74-85.
14. Czech M.P. 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. **Cell** 59: 235-238.
15. Chomczynski P. y Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem** 162:156-159.
16. Davoren J.B., Kasson B.G., Li Ch. y Hsueh A.J. 1986. Specific insulin-like growth factor (IGF) -I and -II binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. **Endocrinology** 119: 2155-2162.
17. DeChiara T.M., Efstratiadis A. y Robertson E.J. 1990. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an IGF-II gene disrupted by targeting. **Nature** 345: 78-80.
18. DeMellow J.S., Handelsman D.J. y Baxter R.C. 1987. Short-term exposure to insulin-like growth factors stimulates testosterone production by testicular interstitial cells. **Acta Endocrinol (Copenh)** 115: 483-489.
19. De Pagter-Holthuisen P., Jansen M., Van Schaik T.M.A., Van der Kammen R., Osterwijk C., Van der Brande J.L. y Sussenbach J.S. 1987. The human insulin-like growth factor II gene contains two development specific promoters. **FEBS Letters** 214: 259-264.
20. Donahue P.K. 1992. Müllerian inhibiting substance in reproduction and cancer. **Mol Reprod Dev** 32: 148-172.
21. Eggenschwiler J., Ludwig T., Fisher P., Leighton P.A., Tilghman S.M. y Efstratiadis A. 1997. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. **Genes and Dev** 11: 3128-3142.
22. Eicher E.M. y Washburn L.L. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. **Ann Rev Genet** 20: 327-360.
23. Eicher E.M., Washburn L.L., Schork N.J., Lee B.L., Shown E.P., Xu X., Dredge R.D., Pringle M.J. y Page D.C. 1996. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-Y^{POS} sex reversal. **Nat Genet** 14:206-209.
24. Eicher E.M., Washburn L.L., Whithney J.B. y Morrow K.E. 1982. *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. **Science** 217: 535-537.

25. Ellsworth D.L., Hewett-Emmett D. y Li W. 1994. Evolution of base composition in the insulin and insulin-like growth factor genes. **Mol Biol Evol** 11: 875-885.
26. Ffrench-Constant C., Hollingsworth A., Heasman J. y Wylie C.C. 1991. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. **Development** 113: 1365-1373.
27. Foster J.W., Dominguez-Steglich M.A., Guioli S., Kwok C., Weller P.A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D., Goodfellow P.N., Brook J.D. y Schafer A.J. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. **Nature** 372: 525-530.
28. Froesch E.R., Schmid C., Schwaden J. y Zapf J. 1985. Actions of insulin-like growth factors. **Annu Rev Physiol** 47: 443-467.
29. Gangj V., Rydzziel S., Gabbitas B. y Canalis E. 1998. Insulin-like growth factor II promoter expression in cultured rodent osteoblasts and adult rat bone. **Endocrinology** 139: 2287-2292.
30. Gilbert S.F. 1988. **Developmental Biology**. USA, Sinauer Associates, 2^aed., 843p.
31. Ginsburg M., Snow M.H.L. y McLaren A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. **Development** 110: 521-528.
32. Giudice L.C. 1992. Insulin like growth factors and ovarian follicular development. **Endocr Rev.** 13: 641-666.
33. Godin I. y Wylie C.C. 1991. TGF β_1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. **Development** 113: 1451-1457.
34. Godin I., Wylie C. y Heasman J. 1990. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. **Development** 108: 357-363.
35. Gray A., Tam A.W., Dull T.J., Hayflick J., Pintar J., Cavenee W.K., Koufos A. y Ullrich A. 1987. Tissue-specific and developmentally regulated transcription of the IGF-II gene. **DNA** 6: 283-295.
36. Gubbay J., Vivian N., Economou A., Jackson D., Goodfellow P. y Lovell-Badge R. 1992. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 7953-7957.
37. Hammond J. M., Mondschein J. S. y Canning S. F. 1989. Insulin-like growth factors (IGFs) as autocrine/paracrine regulators in the porcine ovarian follicle. En: Hirschfield A. N. (Ed). **Growth factors and the ovary**. Plenum Press. pp 107-120.

38. Han V.K.M., Lu F., Bassett N., Yang K.P., Delhanty P.J.D. y Challis J.R.G. 1992. Insulin-like growth factor (IGF-II) messenger ribonucleic acid is expressed in steroidogenic cells of the developing ovine adrenal gland: evidence of an autocrine/paracrine role for IGF-II. **Endocrinology** 131: 3100-3109.

39. Hawkins J.R. 1995. Genetics of sex reversal. **J Endocrinol** 147: 183-187.

40. Heyner S., Shi C., Garside W.T. y Smith R.M. 1993. Functions of the IGFs in early mammalian development. **Mol Reprod Dev** 35: 421-426.

41. Holland P.W.H., García-Fernández J., Williams N.A. y Sidow A. 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. **Development Suppl**: 125-133.

42. Holthuizen P., VanDijk M.A., Rudenburg R.J.T., Koonen-Reemst A.M.C.B. y Sussenbach J.S. 1993. Transcriptional regulation of the major promoters of the human IGF-II gene. **Mol Reprod Dev** 5: 391-393.

43. Hu J.F., Vu T.H. y Hoffman A.R. 1995. Differential biallelic activation of three insulin-like growth factor II promoters in the mouse central nervous system. **Mol Endo** 9: 628-636.

44. Issa J. P., Vertino P. M., Boehm C.D., Newsham I. F. y Baylin S. B. 1996. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 93: 11757-11762.

45. Jeske Y.W.A., Mishina Y., Cohan D.R., Behringer R.R. y Koopman P. 1996. Analysis of the role of *Amh* and *Fra1* in the *Sry* regulatory pathway. **Mol Reprod Dev** 44: 153-158.

46. Jost A. 1953. Studies on sex differentiation in mammals. **Rec Prog Horm Res** 8: 379-418.

47. Kent J., Wheatley S.C., Andrews J.E., Sinclair A.H. y Koopman P. 1996. A male-specific role for *Sox9* in vertebrate sex determination. **Development** 122: 2813-2822.

48. Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Googfellow P. y Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. **Nature** 351: 117-121.

49. Koopman P., Münsterberg A., Capel B., Vivian N. y Lovell-Badge R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. **Nature** 348: 450-452.

50. Kreidberg J.A., Sariola H., Loring J.M., Maeda M., Pelletier J., Housman D. y Jaerisch R. 1993. WT-1 is required for early kidney development. **Cell** 74: 679-691.

ESTA TESIS
SALIR DE LA
NO DEBE
BIBLIOTECA

51. Lalli E., Melner M.H., Stocco D.M. y Sassone-Corsi P. 1998. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. **Endocrinology** 139: 4237-4243.
52. Lee J.E., Pintar J. y Efstratiadis A. 1990. Pattern of the IGF-II gene expression during early mouse embryogenesis. **Development** 110:151-159.
53. Lee C.H y Taketo T. 1994. Normal onset, but prolonged expression, of *Sry* gene in the B6.Y^{DOM} sex-reversed mouse gonad. **Dev Biol** 165: 442-452.
54. Lee J.E., Tantravani U., Boyle A.L. y Efstratiadis A. 1993. Parental imprinting of an *Igf-2* transgene. **Mol Reprod Dev** 35: 382-390.
55. LeRoith D., Kavsan V.M., Koval A.P. y Roberts C.T. 1993. Phylogeny of the insulin-like growth factors (IGFs) and receptors: A molecular approach. **Mol Reprod Dev** 35: 332-338.
56. Lim H.N., Freestone S.H., Romero D., Kwok C., Hughes I. A. y Hawkins J. R. 1998. Candidate genes in complete and partial XY sex reversal: mutation analysis of SRY, SRY-related genes and FTZ-F1. **Mol Cell Endo** 140: 51-58.
57. Liu X.J., Malkowski M., Erickson G.F., Shimasaki S. y Ling N. 1993. Developmental of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. **Endocrinology** 132: 1176-1183.
58. Lizárraga-Sánchez F. 1997. Expresión del RNAm del factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (IGF-II), antes y después de la diferenciación sexual del ovario del ratón B6Y^{DOM}. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
59. Louvi A., Accili D. y Efstratiadis A. 1997. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. **Dev Biol** 189: 33-48.
60. Lovell-Badge R. y Hacker A. 1995. The molecular genetics of *Sry* and its role on mammalian sex determination. **Phil Trans R Soc Lond B** 350: 205-214.
61. Luo X., Ikeda Y., Parker K. L. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell** 77: 481-490.
62. Luo X., Ikeda Y., Parker K.L. 1995. The cell-specific nuclear receptor steroidogenic factor 1 plays multiple roles in reproductive function. **Phil Trans R Soc lond B** 350: 279-283.
63. MacDonald R.G., Pfeffer S.R., Coussens L., Tepper M.A., Brockleblank C.M., Mole J.E., Anderson J.K., Chen E., Czech M.P y Ullrich A. 1988. A single receptor binds both IGF-II and Mannose-6-phosphate. **Science** 239: 1134-1137.

64. Mason H.D., Willis D.S., Holly J.M. y Franks S. 1994. Insulin preincubation enhances insulin-like growth factor-II (IGF-II) action on steroidogenesis in human granulosa cells. **J Clin Endocrinol Metab** 78: 1265-1267.
65. McLaren A. 1991. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. **Bioessays** 13: 151-156.
66. McLaren A. y Buehr M. 1990. Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. **Cell Diff Dev** 31: 185-195.
67. McRory J. y Sherwood N.M. 1997. Ancient divergence of insulin and insulin-like growth factor. **DNA Cell Biol** 16: 939-949.
68. Merchant-Larios H. 1984. Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Berkum J. y Motta P.M. (eds), **Ultrastructure of reproduction**. Boston, Martinus Nijhoff Publishers, p. 19-30.
69. Merchant-Larios H. 1991. Gametogénesis. En: Domínguez-Casala R. (ed), **Tópicos selectos de biología de la reproducción**. México, Porrúa, p. 11-29.
70. Merchant-Larios H., Clarke H.J. y Taketo T. 1994. Developmental arrest of fertilized eggs from the B6.Y^{DOM} sex-reversed female mouse. **Dev Gen** 15: 435-442.
71. Merchant-Larios H. y Taketo T. 1991. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. **J Electron Microsc Tech** 19: 158-171.
72. Mercola M. y Stiles C.D. 1988. Growth factors superfamilies and mammalian embryogenesis. **Development** 102: 451-460.
73. Mesiano S. y Jaffe R.B. 1993. Interaction of insulin-like growth factor-II and estradiol directs steroidogenesis in the human fetal adrenal toward dehydroepiandrosterone sulfate production. **J Clin Endocrinol Metab** 77: 754-758.
74. Miller J.B. y Obasiolu C. 1996. The effect of insulin and insulin-like growth factors on luteal progesterone secretion in the rabbit. **J Soc Gynecol Invest** 3: 262-266.
75. Morgan D.O., Edman J.C., Standring D.N., Fried V.A., Smith M.C., Roth R.A. y Rutter W.J. 1987. IGF-II receptor as a multifunctional binding protein. **Nature** 329: 301-307.
76. Morrione A., Valentini B., Xu S.Q., Yumet G., Louvi A., Efstratiadis A.J. y Baserga R. 1997. IGF-II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. **Proc Natl Acad Sci USA** 94: 3777-3782.

77. 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.
78. Murphy L.J. y Barron D.J. 1993. The IGFs and their binding proteins in murine development. **Mol Reprod Dev** 35: 376-381.
79. Nagamine C.M. 1994. The testis determining gene, SRY, exists in multiple copies in old world rodents. **Genet Res** 64: 151-158.
80. Nagamine C. M., Capehart J., Carlisle C. y Chang D. 1998. Ovotestes in B6-XXSxr Sex-reversed mice. **Dev Biol** 196: 24-32.
81. Nagamine C.M., Taketo T. y Koo G.C. 1987. Morphological development of the mouse gonad in *tda-1* XY sex reversal. **Differentiation** 33: 214-222.
82. Nahum R., Thong K.J. y Hillier S.G. 1995. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells *in vitro*. **Hum Reprod** 10: 75-81.
83. Nishimoto I. 1993. The IGF-II receptor system: a G protein-linked mechanism. **Mol Reprod Dev** 35: 398-407.
84. Nissley P., Kiess W. y Sklar M. 1993. Developmental expression of the IGF-II/Mannose-6-phosphate receptor. **Mol Reprod Dev** 35: 408-413.
85. Nishioka Y. 1988. Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. **Teratology** 38: 181-185.
86. Palmer S.J. y Burgoyne P.S. 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^{POS} mice. **Development** 113: 709-714.
87. Pamilo P. y O'Neill R.J.W. 1997. Evolution of the *Sry* genes. **Mol Biol Evol** 14: 49-55.
88. Parker K. L. 1998. The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. **Mol Cell Endo** 140: 59-63.
89. Pedone P. V., Cosma M. P., Ungaro P., Colantuoni V., Bruni C. B., Zarrilli R. y Riccio A. Parental imprinting of rat insulin-like growth factor gene promoters is coordinately regulated. **J Biochem Chem** 269: 23970-23975.
90. Pevny L.H. y Lovell-Badge R. 1997. *Sox* genes find their feet. **Curr Opinion Gen Dev** 7: 338-344.

91. Pontiggia A., Rimini R., Harley V.R., Goodfellow P.N., Lovell-Badge R. y Bianchi M.E. 1994. Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. **EMBO J** 13: 6115-6124.
92. Rimini R., Pontiggia A., Spada F., Ferrari S., Harley V.R., Goodfellow P.N. y Bianchi M.E. 1995. Interaction of normal and mutant *SRY* proteins with DNA. **Phil Trans R Soc Lond B** 350: 215-220.
93. Rinderknecht E. y Humbel R.E. 1978. Primary structure of human insulin-like growth factor II. **FEBS Lett** 89: 283-289.
94. Roth R.A. 1988. Structure of the receptor for IGF-II: the puzzle amplified. **Science** 239: 1269-1271.
95. Rotwein P. y Hall L.J. 1990. Evolution of IGF-II: characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. **DNA Cell Biol** 9: 725-735.
96. Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA** 74: 5463-5467.
97. Sara R.V. y Hall K. 1990. Insulin like growth factors and their bindings proteins. **Physiol Rev** 70: 591-614.
98. Schafer A.J., Domínguez-Steglich M.A., Guioli S., Kwok C., Weller P.A., Stevanovic M., Weissenbach J., Mansour S., Young I.D., Goodfellow P.N., Brook J.D. y Foster J.W. 1995. The role of SOX9 in autosomal sex reversal and campomelic dysplasia. **Phil Trans R Soc Lond B** 350: 271-273.
99. Schultz G.A., Hahnel A., Arcellana-Panlilio M., Wang L., Goubau S., Watson A. y Harvey M. 1993. Expression of IGF ligand and receptor genes during preimplantation mammalian development. **Mol Reprod Dev** 35: 414-420.
100. Stempien M.M., Fong N.M., Rall L.B. y Bell G.I. 1986. Sequence of a placental cDNA encoding the mouse IGF-II precursor. **DNA** 5: 357-361.
101. Swain A., Narvaez V., Burgoyne P., Camerino G. y Lovell-Badge R. 1998. DAX1 antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. **Nature** 391: 761-767.
102. Swain A., Zanaria E., Hacker A., Lovell-Badge R. y Camerino G. 1996. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. **Nat Genet** 12: 404-409.
103. Taketo-Hosotani T., Nishioka Y., Nagamine C.M., 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.

104. Taketo T., Saeed J., Nishioka Y. y Donahoe P.K. 1991. Delay of testicular differentiation in the B6Y^{DOM} ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for Müllerian inhibiting substance. **Dev Biol** 146: 386-395.
105. Vanderhyden B.C., Macdonald E.A., Merchant-Larios H., Fernandez A., Amleh A., Nasser R. y Taketo T. 1997. Interactions between the oocyte and cumulus cells in the ovary of the B6.Y^{TR} sex-reversed female mouse. **Biol Reprod** 57: 641-646.
106. Van Kleffens M., Groffen C., Lindenbergh-Kortleve D.J., van Neck T.W., González-Parra S., Dits N., Zwarthoff E.C. y Drop S.L.S. 1998. The IGF system during fetal-placental development of the mouse. **Mol Cell Endo** 140: 129-135.
107. Villalpando I., Nishioka Y. y Taketo T. 1993. Endocrine differentiation of the XY sex reversed mouse ovary during postnatal development. **J Steroid Biochem Mol Biol** 45: 265-273.
108. Voutilainen R. y Miller W.L. 1987. Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and the cholesterol side-chain cleavage enzyme, P450ssc, in human steroidogenic tissues. **Proc Natl Acad Sci USA** 84: 1590-1594.
109. Whitfield S., Lovell-Badge R. y Goodfellow P.N. 1993. Rapid sequence evolution of the sex determining gene Sry. **Nature** 364: 713-715.
110. Willis D.S., Mason H.D., Watson H. y Franks S. 1998. Developmentally regulated responses of human granulosa cells to insulin-like growth factors (IGFs): IGF-I and IGF-II action mediated via the type-I IGF receptor. **J Clin Endocrinol Metab** 83: 1256-1259.
111. Xu Y.P., Chedrese J. y Thacker P.A. 1997. Effects of GH on IGF-II-induced progesterone accumulation by cultured porcine granulosa cells. **Endocrine** 7: 157-163.
112. Yuan W., Lucy M.C. y Smith M.F. 1996. Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and -II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. **Biol Reprod** 55: 1045-1054.
113. Zanaria E., Muscatelli F., Bardoni B., Strom T. M., Guioli S., Guo W., Lalli E., Moser C., Walker A. P., McCabe E. R. B., Meitinger T., Monaco A., Sassone-Corsi P. y Camerino G. 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. **Nature** 372: 635-641.
114. Zapf J. y Froesch E.R. 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. **Horm Res** 24: 121-130.

X. APÉNDICE

Amortiguador SET

El amortiguador se prepara con las siguientes soluciones:

EDTA 0.5M 1 ml
Tris base 0.5M 0.2 ml
Agua estéril 8.8 ml

EDTA 0.5M

Se toman 9.305 g de EDTA y se afora a un volumen de 50 ml. Se ajusta a pH 8.

Tris base 0.5M

Se toman 60.55 g de Tris y se afora a un volumen de 50 ml.

Agua tratada con DEPC (Di-etilpirocarbonato)

Se coloca en un vaso de precipitado 1-2 litros de agua bidestilada y se le añade 1 ml de DEPC (4°C) por cada litro de agua. Se mantiene en agitación constante hasta que el DEPC se incorpora totalmente, se deja aproximadamente 24 horas cubierto en la campana. Se esteriliza por 80 minutos para inactivar el DEPC.

Solución de tiocianato de guanidina

Se ponen 25 g de Tiocianato de guanidina y 29.3 ml de agua tratada con DEPC y se disuelve durante 10-15 minutos a 65°C. De manera independiente se preparan:

Citrato de Sodio pH 7 0.75M

Se pesan 1.103 g de citrato de sodio y se disuelven en 3 ml de agua tratada con DEPC, se ajusta el pH con HCl y se afora a 5 ml.

Sarcosyl

Se disuelven 0.3 g de Sarcosyl en 3 ml de agua tratada con DEPC.

Finalmente se mezclan:

25 g de tiocianato de guanidina en 29.3 ml de agua tratada con DEPC

1.76 ml de la solución de citrato de sodio

2.64 ml de sarcosyl

Se agita la mezcla por 5 minutos y se guarda cubierta con aluminio y a temperatura ambiente, se almacena máximo tres meses.

Solución D

Se toman 5 ml de la solución de tiocianato de guanidina y se le adicionan 36 μ l de β -mercaptoetanol. Se cubre con papel aluminio y se guarda como máximo un mes a temperatura ambiente.

Acetato de sodio 2M pH 4

Se pesan 16.407 g de acetato de sodio y se disuelven en 20 ml de agua tratada con DEPC. Se le agregan 60-70 ml de ácido acético glacial midiendo el pH hasta ajustar a 4. Se afora a 100 ml y se filtra la solución con filtros de 0.2 millipore. Se almacena a 4°C.

Fenol saturado con agua tratada con DEPC

Se deja estabilizar el fenol a temperatura ambiente. Se pone a fundir el fenol en un vaso de precipitado a 45°C en baño María, ya que se fundieron los cristales se colocan 50 ml de fenol se agita y se le adiciona 0.1 g de hidroxiquinolina y 200 ml de β -mercaptoetanol (agentes antioxidante). Se agregan 100 ml de agua tratada con DEPC y se deja agitando por 30 minutos. Se guarda a 4°C toda la noche. Al día siguiente se retira el agua y se vuelven a agregar otros 100 ml agitando 30 minutos. Se dejan separar las fases a 4°C, se hace un último cambio de agua.

Fenol saturado con Tris

Se saca el fenol y se deja estabilizar a temperatura ambiente. Se funde el fenol en baño María a 65-68°C. Se saca el frasco y se le adiciona un volumen en una proporción 1:1 de Tris/HCl 0.5M pH 8 a temperatura ambiente, además se le agrega hidroxiquinidina al 0.1% (100 mg/100 ml de fenol). Se agita por 45 minutos en la campana de flujo laminar y luego se deja que se separen las dos fases. Se aspira la fase acuosa utilizando una trampa al vacío. Se le agrega otro volumen (1:1) de Tris/HCl 0.1M pH 8 al fenol, se agita por 15 minutos y se deja reposar para finalmente volver a remover la fase acuosa. Las extracciones se repiten hasta que el pH del fenol sea menor

de 7.8. Ya equilibrado el fenol y removida la fase acuosa se le agrega 0.1 de volumen (10 ml) de Tris/HCl 0.1M pH 8 conteniendo 0.2% de β -mercaptoetanol. Se almacena en frasco ámbar cubierto con papel aluminio a 4°C.

Amortiguador TBE 10X

Se disuelven 107.8 g de Tris, 55 g de ácido bórico, 3.7 mg de EDTA en 800 ml de agua destilada y estéril. Si es necesario se ajusta el pH a 8.2 con 1N de HCl. Se ajusta a un volumen final de 1lt. Se filtra y se guarda.

Amortiguador TE 1X

Se disuelven 1.2 g de Tris, 37 mg de EDTA en 900 ml de agua destilada y estéril, si es necesario se ajusta el pH a 8.3 con 1N de HCl. Se ajusta a un volumen final de 1 lt. Se filtra y se guarda.

Solución fijadora del gel de acrilamida

A 2400 ml de agua desionizada y estéril se adicionan 300 ml de etanol y 300 ml de ácido acético glacial.

Solución de acrilamida al 6%

A 50 ml de amortiguador TBE 10X se le agregan 28.5 g de acrilamida, 1.5 g de N-N metilenbisacrilamida y 210 g de urea. Se ajusta a un volumen final de 500 ml con agua destilada estéril, se calienta a 55°C para disolver, se filtra con un un filtro de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.45 μ y se guarda en botellas oscuras a 2-8°C.

Amortiguador de carga

El amortiguador de carga se preparó llevando a cabo una solución que contenía 0.024 g de azul de bromofenol, 6 ml de glicerol y 14 ml de amortiguador TE 1X pH 8.