



00551

15

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y FISIOLÓGIA
MOLECULAR**

**“LA FUNCIÓN DEL GEN *Desert hedgehog* EN LA
GONADOGÉNESIS DEL TESTÍCULO DE RATÓN”**

T É S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:

Q.F.B. JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ LADRÓN DE GUEVARA

TUTOR: DRA. HILDA LOMELÍ BUYOLI

CUERNAVACA, MORELOS.

2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

DEDICATORIA:

A ti Nena:

Por ser la mujer más importante en mi vida, y que ahora me impulsa como hombre a ser mejor cada día.

A mis padres:

Por ser unos padres excepcionales, por su amor, amistad, confianza y apoyo, así como por la oportunidad que me dieron.

A ti Lucy:

Por ser mi hermana y por todo tu cariño.

A las personas que con su amistad y apoyo, hicieron más fácil esto.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Hilda Lomeli por su apoyo, amistad y confianza durante la realización de este proyecto.

A los Doctores Luis Covarrubias y Alejandro Garcíarrubio por su asesoría durante y fuera de los exámenes tutorales.

A los Doctores Enrique Reynaud, Dr. José Luis Montiel, Dra. Verónica Narváez y Dra. Carmen Beltrán por sus consejos y sugerencias al revisar mi tesis.

A la Unidad de Síntesis del IBT.

A los laboratorios HL-LC-MZ-YR-AD por su ayuda.

A mis amigos de Cuernavaca Veros, Tona, Chanis, Conde, Lau, Diana, Marito, Rayito, Rox, Tak, Gis, Jolo, Cesar, Chapu's, Lucy, Doc, Tocayo, Conchita, Herbert, Jesús, David, Gustavo P., Hugo, Clea y Lasio; porque con ustedes Cuerna fue más leve.

A mis hermanos Pablo, Beto, Charlie, Pepe, Rilo, Nick, Gally, PepeB y Negro.

A mis padres por su amor y apoyo.

A ti Nena por tu amor y cariño, por la espera y por aguantar mis neuras.

A Dios, por la vida, amor, salud y libertad, ya que sin ello, no hubiese sido posible éste trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

Tablas y figuras	2
Abreviaciones	3
Resumen	4
Introducción	5
Morfogénesis gonadal	5
Las células germinales primordiales	10
Los genes de <i>Hedgehog</i>	12
<i>Desert hedgehog (Dhh)</i>	14
Maduración y procesamiento de <i>Hedgehog</i>	14
Genes involucrados en la vía de señalización de <i>Hedgehog</i>	15
Antecedentes y justificación	21
Objetivos	24
Materiales y métodos	25
Soluciones	32
Resultados	35
Generación de un ratón transgénico con el vector de expresión pDSA	35
Expansión de la línea del ratón transgénico pDSA	37
Análisis de la expresión del transgén mediante RT-PCR	37
Análisis de la expresión del transgén mediante hibridación <i>in situ</i>	38
Expresión transitoria del vector de expresión pDSA en células totipotenciales "ES"	41
Expresión de genes cascada abajo de la vía de <i>Hedgehog</i> en gónadas de ratón	41
Discusión	48
Conclusiones y perspectivas	54
Bibliografía	55

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Posible cascada de expresión génica durante la diferenciación sexual	9
Figura 2. Migración de las CGP durante el desarrollo temprano del ratón hacia las gónadas.	12
Tabla 1. Mutantes reportadas de las proteínas de <i>Gli</i> en ratones.	17
Figura 3. Mecanismo de autoproteólisis de <i>Hedgehog</i>	19
Figura 4. Transducción de señales dependiente de <i>Hh</i> .	20
Figura 5. Mapa del vector de expresión pDSA usado para la generación del ratón transgénico.	23
Figura 6. Curvas de expresión de <i>SRY</i> , <i>Dhh</i> y <i>Dax-1</i> en hembras y machos	23
Tabla 2. Pares de Oligonucleótidos usados y condiciones de reacción RT-PCR.	34
Figura 7. El esquema representa las regiones de la construcción pDSA amplificadas por dos pares de oligonucleótidos Daxsonic-Sonic (A) y DaxN-Sonic (B).	36
Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa con el producto de PCR del ratón transgénico.	36
Figura 9. Cruzas que se llevaron a cabo para la expansión de la línea del ratón transgénico.	37
Figura 10. Análisis de expresión del transgén mediante RT-PCR de embriones de 13.5 dpc	39
Figura 11. Hibridación <i>in situ</i> con <i>Shh</i> .	40
Figura 12. Expresión transitoria en células "ES"	42
Tabla 3. Análisis de expresión reportados antes y después de este trabajo en los diferentes tipos celulares de la gónada	43
Figura 13. Esquema de la expresión de los miembros de la cascada de <i>Hedgehog</i> en el testículo	44
Figura 14. RT-PCR de algunos miembros cascada abajo de la expresión de <i>Dhh</i> .	45
Tabla 3. Representación del número de gónadas que expresan algún miembro de la vía de señalización sobre el número de gónadas analizadas en ese estadio.	45
Figura 15. RT-PCR de <i>Shh</i> en cDNA de testículo y ovario adultos.	46
Figura 16. RT-PCR de los miembros de <i>Dhh</i> en Testículo y Mesonefros de 12.5 dpc.	47

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABREVIACIONES

<i>AMH</i>	Hormona Antimuleriana
<i>AP</i>	Anterior-Posterior
<i>BMP</i>	"Bone Morphogenetic proteins" proteínas morfogenéticas de hueso
<i>cDNA</i>	DNA complementario
<i>CGP</i>	Células germinales primordiales
<i>C-HH</i>	Porción carboxilo terminal de la proteína de <i>Hedgehog</i>
<i>Ci</i>	<i>Cubitus interruptus</i>
<i>Cos2</i>	<i>Costal 2</i>
<i>Cys</i>	Cisteína
<i>Dax-1</i>	"Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome, gene 1" Gen 1 de la región crítica en el cromosoma X, hipoplasia adrenal congénita, reversión sexual dosis dependiente.
<i>DEPC</i>	Dietilpirocarbonato
<i>Dhh</i>	<i>Desert hedgehog</i>
<i>dpc</i>	días post-coito
<i>Dpp</i>	<i>Decapentapléjico</i>
<i>dpp</i>	días post-parto
<i>ES</i>	células totipotenciales
<i>FCS</i>	Suero fetal bovino
<i>Fu</i>	<i>Fused</i>
<i>Gli</i>	Factor transcripcional aislado del glioma humano
<i>Gly</i>	Glicina
<i>Hh</i>	<i>Hedgehog</i>
<i>HMG</i>	Grupo de alta movilidad
<i>IBT</i>	Instituto de Biotecnología
<i>lhh</i>	<i>Indian hedgehog</i>
<i>Kb</i>	Kilo pares de bases
<i>KDa</i>	Kilo Daltones
<i>N-HH</i>	Porción amino terminal de la proteína de <i>Hedgehog</i> madura
<i>O/N</i>	"Over-night"
<i>pDSA</i>	Construcción <i>Dax-1-Sonic hedgehog-pA</i>
<i>PKA</i>	"Protein Kinase A"
<i>Ptc</i>	<i>Patched</i>
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>Sf1</i>	<i>Factor esteroideogénico 1</i>
<i>Shh</i>	<i>Sonic hedgehog</i>
<i>Smo</i>	<i>Smoothened</i>
<i>SRY</i>	"Sex reversal Y factor" Factor de reversión del sexo Y
<i>Sufu</i>	<i>Supresor de Fused</i>
<i>RT-PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa
<i>Wg</i>	<i>Wingless</i>
<i>WT1</i>	Factor del Tumor de Wilm's 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El papel que desempeña la familia de *Hedgehog* ha sido motivo de estudio. *Desert hedgehog (Dhh)* miembro de esta familia, se expresa en el testículo desde etapa embrionaria hasta el ratón adulto. Datos obtenidos a partir de la mutante nula de este gen sugieren que participa en la morfogénesis del testículo desde una etapa temprana del desarrollo embrionario.

En el presente trabajo se abordaron diferentes estrategias experimentales, con la intención de analizar el papel del gen *Dhh* en el desarrollo de las gónadas embrionarias de ratones machos. Para ello se proyectó producir un ratón transgénico que debía expresar *Sonic Hedgehog (Shh)* en el grupo celular análogo de hembras y así poder estudiar su efecto. La hipótesis específica que impulsó este proyecto, es que *Dhh* tiene un papel en la determinación sexual de las células germinales primordiales (CGP) de macho y que por lo tanto, al expresarlo ectópicamente en las células germinales primordiales de una ratóna transgénica, tendría un efecto sobre el destino sexual de éstas. Se logró producir un ratón transgénico con el inserto deseado. Sin embargo se encontró que el transgén quedó ubicado en una región del genoma que no le permitió expresarse. Al mismo tiempo y para conocer los genes que se activan cascada abajo de *Dhh* en las gónadas embrionarias de ratón, se caracterizó la expresión de algunos de ellos por medio de RT-PCR en gónadas. Los miembros de la familia de *Hedgehog* son proteínas de señalización intercelular que median una variedad de procesos fundamentales para el desarrollo embrionario. Esto con el propósito de vislumbrar la vía de transducción de *Dhh* en la gónada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de organismos multicelulares a partir de una sola célula (el huevo fertilizado) es un gran triunfo de la evolución. Durante el desarrollo embrionario, el huevo se divide para dar lugar a millones de células, las cuales formarán estructuras tan complejas como los ojos, los brazos, el corazón, el cerebro, las gónadas, etc. La comprensión del misterio de la diferenciación y la morfogénesis es la finalidad de la Biología del Desarrollo.

La formación de un órgano involucra el control de un número limitado de procesos celulares. Estos son: la proliferación celular; la muerte celular, el crecimiento, la migración y cambio en la morfología celular.

MORFOGÉNESIS GONADAL

En mamíferos, la morfogénesis de la gónada representa una situación única durante el desarrollo embrionario, ya que a diferencia de todos los demás órganos primordiales, la gónada primordial tiene dos posibles destinos: formar un ovario o formar un testículo. El camino de diferenciación que la gónada tome es determinante para el desarrollo sexual de un individuo. Por ello el entendimiento de los mecanismos genéticos que participan en esta decisión y la interpretación de ellos a nivel celular son de gran relevancia.

La gónada se forma dentro del sistema urogenital, que a su vez deriva del mesodermo intermedio. El sistema urogenital se divide de tres regiones: pronefros, mesonefros y metanefros, los cuales constituyen el llamado ducto néfrico o de Wolff. El pronefros es vestigial en mamíferos, pero el mesonefros puede servir como riñón primitivo durante la embriogénesis de algunas especies. El riñón definitivo es el producto de la interacción entre el mesénquima metanéfrico, el límite posterior de sistema urogenital y el primordio del ureter, el cual crece hacia afuera del conducto de Wolff. (Ginsburg, *et al.* 1990).

Un segundo conducto, el paramesonéfrico o ducto de Muller, se origina dentro de cada mesonefros por invaginación del epitelio celómico. La gónada,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inicialmente llamada cresta genital, se produce como un engrosamiento de la superficie ventro-lateral de cada mesonefros y en el ratón es visible a los 10 dpc (días post-coito). La cresta genital está compuesta de células somáticas derivadas del mesonefros y CGP, las cuales migran desde una región extraembrionaria hacia la gónada. (Ginsburg, *et al.* 1990; Bendel-Stenzel, *et al.* 1998; Wylie, 1999).

Además de las CGP hay tres diferentes linajes celulares presentes en la gónada. Cada linaje tiene un destino bipotencial dependiendo del sexo y el órgano en el cual se encuentran. Las células de soporte que provienen del mesonefros darán lugar a células de Sertoli en el testículo y a células foliculares en el ovario (Buehr, *et al.* 1992; Merchant-Larios, *et al.* 1993; Martineau, *et al.* 1997). Estas células rodean las CGP y les proveen un ambiente de crecimiento apropiado (Griswold, *et al.* 1998). Las células esteroideogénicas producen hormonas sexuales que contribuirán al desarrollo de las características sexuales secundarias del embrión; en el macho son las células de Leydig y en la hembra las células de la Teca. El linaje de células de tejido conectivo contribuirá a la formación de la gónada (Brennan, *et al.* 1998).

En el caso del testículo, el desarrollo temprano está caracterizado por la formación de cordones testiculares que contienen células de Sertoli y CGP; las células de Leydig son excluidas en el intersticio. El tejido conectivo es el constituyente mayoritario en la formación del cordón genital. El principal tipo celular de este linaje son las células mioideas (que rodean a las células de Sertoli) y dan lugar a la lámina basal. Además existe cierta contribución celular del mesonefros hacia la gónada (Buehr, *et al.* 1993; Merchant-Larios, *et al.* 1993; Tilmann, *et al.* 2002). Esta contribución está dada por la migración, en el día 11.5 del desarrollo de células peritubulares mioideas, células endoteliales y células asociadas con el endotelio de la gónada (Martineau, *et al.* 1997). También se ha visto que la interacción de las células migratorias y las células precursoras de soporte juegan un papel en el establecimiento del destino de las células de Sertoli (Tilmann, *et al.* 1999). El testículo está caracterizado además por una vascularización rápida y prominente.

Por su parte, la organización del ovario toma lugar más tarde que la del testículo y es aun menos estructurada. En el ovario las células del tejido conectivo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

dan lugar a células del estroma y no hay un equivalente de células mioideas. (Brennan, *et al.* 1998; Swain, *et al.* 1999).

Hasta el día 10 de desarrollo del embrión de ratón, la cresta gonadal es un órgano sin diferenciación sexual, con bipotencialidad para diferenciarse hacia testículo u ovario. Aparentemente, el camino automático de diferenciación gonadal en mamíferos es el destinado a hembras (Jost, 1947), y es el cromosoma "Y" de machos el que establece la masculinidad mediante la expresión del gen *Sry* (el cual se localiza en el brazo corto del cromosoma Y) (Gubbay, *et al.* 1990). *Sry* codifica para un factor transcripcional que muestra homología con un motivo de unión a DNA denominado HMG (High Mobility Group) (Sinclair, *et al.* 1990; Foster, 1996). La expresión de *Sry* ocurre en las células precursoras de Sertoli en el día 10.5 y marca el primer evento que inicia la formación de testículo (Haqq, *et al.* 1994; Hacker, *et al.* 1995). Se cree que la expresión de *Sry* inicia la cascada de expresión genética que conduce a la diferenciación de células somáticas hacia células de Sertoli dentro de los túbulos seminíferos. *SRY* activa entre otros genes a la *AMH* (Hormona Anti-Muleriana, por sus siglas en inglés); *Dhh*; y *Sox9* (Wagner, *et al.* 1994). La expresión de *AMH* que inicia el día 12 causa la masculinización del embrión. Esta hormona induce la regresión de los conductos Mullerianos que de lo contrario formarían el útero, oviductos, y la porción superior de la vagina (Mishina, *et al.* 1996; Josso, *et al.* 1998). Subsecuentemente, la testosterona, que es producida por las células de Leydig estimula la diferenciación de los conductos de Wolff (Mishina, *et al.* 1996). La proteína *Sox9*, se relaciona a *SRY* en cuanto a que también tiene un dominio HMG similar al de *SRY*. Estudios de expresión en ratones, han demostrado que *Sox9* está presente en niveles bajos en hembras, y en machos en los cordones genitales tempranos; sin embargo, a los 11.5 dpc en el macho se incrementa la expresión mientras que en las hembras desaparece. A los 12.5 dpc, es clara su expresión en las células de Sertoli y se mantiene durante toda la vida del ratón (Swain, *et al.* 1999). Este patrón de expresión es consistente con que el incremento en la expresión en los machos sea un efecto de la acción de *SRY* (Parker, *et al.* 1999; Vilain, *et al.* 1998; Marshall, 1998). La función de *Sox9* en la masculinización de la gónada quedó claramente demostrada, ya que de manera similar a la que ocurre con la expresión ectópica de *Sry* en hembras transgénicas, la expresión ectópica de *Sox9* produce la transformación sexual de hembra a macho, actuando como un factor molecular activo de *SRY* (Kent, *et al.* 1996;

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bishop, *et al.* 2000; Vidal, *et al.* 2001). Se han identificado otros genes también involucrados en la diferenciación gonadal. Algunos de ellos se esquematizan en la figura 1.

Dax-1 es miembro de la superfamilia de receptores hormonales nucleares y está asociado al cromosoma X. *Dax-1* que actúa sobre hipotálamo y también se ha asociado a la determinación gonadal de hembra (Muscatelli, *et al.* 1994; Zanaria, *et al.* 1994; García-Castro, *et al.* 1996; Zazopoulos, *et al.* 1997). Se encontró que duplicaciones de una región del cromosoma X (que incluye *Dax-1*) causan reversión sexual de machos hacia hembras (Bardoni, *et al.* 1994; Muscatelli, *et al.* 1994, Zanaria, *et al.* 1994). En las gónadas de ambos sexos, *Dax-1* se expresa primero en el componente somático a los 11.5 dpc coincidente con Sry en machos (Swain, *et al.* 1996). A los 12.5 dpc la expresión de *Dax-1* en los testículos decrece drásticamente, mientras que en los ovarios se mantiene activa. En adultos se ha observado la expresión en células de la Teca de los ovarios, en células de Leydig y muy poca en células de Sertoli en los testículos (Narváez, 1996). Esto sugirió que la acción de *Dax-1* estaba encaminada a la diferenciación de ovarios, y que posiblemente podría interferir en el desarrollo de los testículos (Swain, *et al.* 1996). Sin embargo, de manera inesperada, la mutante nula de *Dax-1* en el ratón mostró degeneración del epitelio testicular germinal, y no presentó defectos en el ovario (Yu, *et al.* 1998; Koop, 1999). A pesar de la aparente inconsistencia de algunos de estos datos, recientemente se reportó que *Dax-1* regula la organización de los cordones testiculares durante la diferenciación del testículo (Joshua, *et al.* 2003).

Además de las mutaciones que afectan la determinación sexual, hay mutaciones genéticas en humanos y ratón que han conducido a la identificación de otros genes relevantes para el desarrollo gonadal. Algunos de ellos se ven involucrados en diferentes estadios del desarrollo, desde etapas previas a la determinación sexual hasta la diferenciación de tipos celulares específicos. Uno de ellos es el factor esteroideogénico (*SF-1*, por sus siglas en inglés) (Xunrong, *et al.* 1990; Ikeda, *et al.* 1994) que pertenece a la subfamilia de receptores nucleares, y no se ha encontrado aun su ligando. Este es un factor de transcripción que tiene dominios de unión a DNA. *SF-1* se identificó como un activador de genes involucrados en la biosíntesis de diferentes hormonas esteroidales (Ikeda, *et al.* 1994). Estudios de expresión en ratón demostraron que *SF-1* está presente en el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

desarrollo del embrión en regiones asociadas a la función endócrina, tales como las gónadas, las adrenales, la pituitaria e hipotálamo (Hatano, *et al.* 1994; Ikeda, *et al.* 1994; Masafumi, *et al.* 1997). Ratones mutantes homocigotos para este gen tienen pérdida de gónadas y adrenales (Luo, *et al.* 1994; Sadovsky, *et al.* 1995). Estos ratones detienen su desarrollo entre 11.0 – 11.5 dpc y se degeneran vía apoptosis (Luo, *et al.* 1995). Parece ser que *SF-1* es necesario para la diferenciación y/o el mantenimiento y crecimiento de las células somáticas presentes en la gónada temprana indiferenciada. *SF-1* es usado como un marcador de las células de Leydig (Parker, *et al.* 1999).

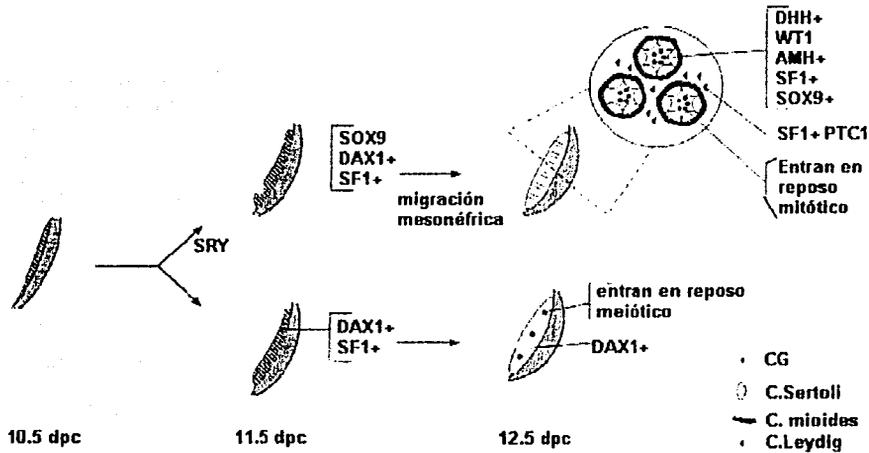


Figura 1. Posible cascada de expresión génica durante la diferenciación sexual (Tomada de Swain, *et al.* 1999)

El gen del tumor de Wilms (*Wt-1*) se ha implicado en el desarrollo temprano de las gónadas y los riñones. Este gen es muy complejo y codifica a una variedad de proteínas con diferentes funciones. Está constituido de 10 exones capaces de generar 4 RNAs obtenidos en dos diferentes eventos de "splicing" alternativo (Sharma, *et al.* 1994; Reddy, *et al.* 1996). Además, tiene dos sitios de inicio de la traducción y la edición postraduccional lleva a dos isoformas que varían en un aminoácido. *WT-1* es un factor transcripcional y presenta 4 dedos de zinc de unión

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

a DNA en el dominio carboxilo terminal. Mutaciones de *WT-1* llevan a varios síndromes en humanos siendo la mayoría asociados a malformaciones de los genitales (Pelletier, *et al.* 1991; Barbaux, *et al.* 1997; Keith, *et al.* 1999). *WT-1* interacciona con *SF-1* y *DAX-1* durante la diferenciación sexual en mamíferos (Nachtigal, *et al.* 1998).

LAS CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

La principal razón de ser de la gónada es el hospedar y promover la diferenciación de la línea germinal que es la que garantiza la continuidad de la vida entre las generaciones. Las CGP son el tipo celular que da origen a los gametos. Estos, en machos son los espermatozoides y en hembras los óvulos. En el ratón, las CGP aparecen inicialmente a los 7.5 dpc en una estructura extraembrionaria llamada alantoides y se reconocen, histoquímicamente, gracias a su actividad de fosfatasa alcalina (McLaren, 1992).

Se ha sugerido que los precursores de estas células, salen del surco primitivo (Anderson, *et al.* 2000). Ying y colaboradores (Ying Ying, 2001) han observado que las CGP del ratón derivan de células del epiblasto proximal, adyacentes al ectodermo extraembrionario durante la gastrulación, y que su generación esta regulada por *BMP4* y *BMP8* (Bone Morphogenetic Proteins) presentes en el ectodermo extraembrionario, así como por *BMP2*, que deriva del endodermo

Las CGP migran más tarde hacia el interior del embrión por el intestino en formación (8.5 dpc), y colonizan las crestas genitales en el 11.5 dpc. (Ver figura 2). La población de CGP prolifera desde 50 células a los 8.5 dpc hasta aproximadamente 26,000 CGP por gónada a los 12.5 dpc; es en este momento cuando se comienzan a notar las diferencias estructurales entre las gónadas (Labosky, *et al.* 1994).

Dos días después de que las CGP han colonizado las crestas genitales (13 dpc), estas inician rutas de diferenciación distintas, marcando así el inicio del dimorfismo sexual en la línea germinal (McLaren, 1992)

La decisión de iniciar uno u otro camino de diferenciación depende únicamente del sexo de la gónada en que residen las CGP, no teniendo ninguna influencia su naturaleza cromosómica (XX o XY). Las CGP en el ovario entran en la profase de la primera división meiótica, y ahí se detienen. Este proceso se reactiva antes de la ovulación. En el testículo, las CGP entran en reposo mitótico como proespermatogonias en la etapa G1 del ciclo celular, reanudándose la mitosis hasta una semana después del nacimiento. Las CGP de macho entran en meiosis sólo después del nacimiento (McLaren, *et al.* 1997). El camino de diferenciación sexo-específico que siguen las CGP en este momento depende totalmente de la interacción con las células somáticas presentes en las gónadas (McLaren, 1992). Una pregunta inmediata con relación a las alternativas de diferenciación es sí el dimorfismo en la entrada a meiosis refleja su inducción en ovarios o la inhibición de ésta en testículos. Una posible respuesta es considerar que cuando las CGP migran ectópicamente y llegan a tejidos adyacentes a la gónada, como la adrenal, independientemente de que sean de macho o hembra, entran en meiosis. Esto sugiere que las CGP están programadas para iniciar la meiosis y que es el testículo embrionario quien produce un factor que inhibe la meiosis y dispara el destino espermatogénico. En experimentos más recientes de cultivo de órganos o reagregados de células gonadales, se ha encontrado más claramente evidencia de una sustancia testicular inhibitoria de meiosis capaz de difundirse a corta distancia, que probablemente actúa alrededor de los 11.5 dpc (McLaren, *et al.* 1984). Por otra parte, en cultivos de reagregados constituidos de células somáticas de pulmón y CGP de hembra de distintas etapas embrionarias, se observó el inicio de meiosis en todos los casos, lo que sugiere que no existe un factor inductor de meiosis en la gónada de hembra (McLaren, *et al.* 1997)

La naturaleza del factor inhibitorio de la meiosis que se produce en testículo aún es desconocida; sin embargo, es probable que sea producida por las células de Sertoli (un tipo celular testicular de soporte). Un candidato que se sugirió inicialmente es el codificado por el gen *Dhh* el cual se expresa en respuesta a *SRY* en las células de Sertoli desde el día 11.5 y está involucrado en interacciones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

célula-célula. R ratones machos deficientes para este gen son estériles debido a la ausencia de espermatozoides (Bitgood, *et al.* 1996). Estudiar el papel de *Dhh* en la formación de la gónada fué parte del objetivo de este trabajo.

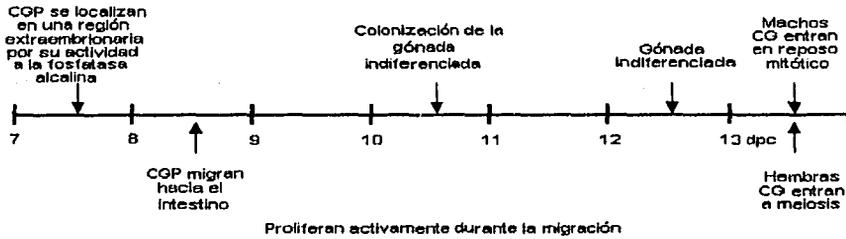


Figura 2. Migración de las CGP durante el desarrollo temprano del ratón hacia las gónadas. (Ohkubo, *et al.* 1996)

LOS GENES HEDGEHOG

El gen *Hedgehog* (*Hh*) se identificó por primera vez en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) como un gen involucrado en la polaridad anterior-posterior de segmentos en las alas, las patas y los ojos, así como en regiones del cerebro del embrión (Nüsslein-Volhard, *et al.* 1980; McMahon, 2000). *Hh* codifica para una proteína secretada que provee información de posición a células vecinas. Se han identificado homólogos de los genes *Hh* tanto en invertebrados como en vertebrados (Kumar, *et al.* 1996) y se les ha asociado con actividad de señalización de largo y corto alcance (Mohler, 1988; Heberlein, 1993). Aunque aún se desconocen las vías de señalización de *Hh*, es claro que puede producir diferentes respuestas celulares dependiendo del contexto en el que opere la señal. Estas respuestas incluyen: la especificación del destino celular, la proliferación y la sobrevivencia.

Se sabe que *Hh* ejerce un efecto de largo alcance, durante la especificación posicional en la formación del ala, en donde regula la expresión del gen *decapentapléjico (Dpp)*, y es capaz de actuar a través de varios diámetros celulares para activar diferentes genes blanco de manera dosis dependiente (Teleman, *et al.* 2000).

En mamíferos, la acción de *Hedgehog* está relacionada con el establecimiento de patrones y en el desarrollo de una gran variedad de sistemas y órganos, incluyendo el sistema nervioso, el sistema esquelético, las estructuras craneofaciales, el tracto gastrointestinal, la angiogénesis, y los folículos del pelo y bigote, (Echerlard, *et al.* 1993; Vortkamp, *et al.* 1996; St-Jacques, *et al.* 1998). La familia de proteínas de *Hedgehog* en el ratón lo constituyen al menos tres diferentes miembros, *Shh*, *Dhh* e *Ihh* (*Indian Hedgehog*). Anormalidades en la señalización inducida por *Hedgehog* son causa de varias patologías y neoplasias en los humanos (Wicking, *et al.* 1999; Oldakr, *et al.* 2001). Existe una alta conservación estructural entre los 3 miembros de la familia de *Hh*, y se sabe que estos actúan de manera similar (Suji-Pathi, *et al.* 2001). Sin embargo, *Ihh* y *Dhh* muestran distintos perfiles de expresión que pueden reflejar sus distintas funciones en el desarrollo (Kumar, *et al.* 1996). En experimentos de órganos en cultivo y la aplicación ectópica de las proteínas de *Hedgehog*, se encontró que las tres proteínas pueden inducir la diferenciación de condrocitos en extremidades embrionarias de ratón ó generar la expresión de *nodal* en el mesodermo lateral de embriones de pollo; así como la duplicación de los dígitos. Estas observaciones indican que las 3 proteínas utilizan una misma vía de transducción (Suji-Pathi, *et al.* 2001).

El más estudiado de los miembros de *Hedgehog* es *Shh*, que presenta actividad polarizante en los miembros y actividades muy diversas durante el desarrollo (Echerlad, *et al.* 1993; Bitgood, *et al.* 1995; Chiang, *et al.* 1996; Hammerschmidt, *et al.* 1997; Jensen, *et al.* 1997; Weed, *et al.* 1997). *Ihh* se expresa durante la formación de hueso y tiene propiedades reguladoras similares a *Shh*, incluyendo la habilidad de regular los mismos genes blanco tales como Patched (Ptc). (Marigo, *et al.* 1996^a, Marigo, *et al.* 1996^b).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DESERT HEDGEHOG (*Dhh*)

Dhh se expresa en las células de Schwann, el endocardio y en las células somáticas de la gónada embrionaria del ratón macho (Bitgood, *et al.* 1996; Parmantier, *et al.* 1999). La expresión de *Dhh* aparece primero en el testículo, a los 11.5 dpc, sin observarse expresión en el ovario en ninguna etapa. Su expresión se confina a las células de Sertoli, dentro de los túbulos seminíferos. Bitgood y McMahon (Bitgood, *et al.* 1996), demostraron que *Dhh* es necesario durante la espermatogénesis; esto se observó en ratones machos mutantes homocigotos para *Dhh*, los cuales son viables pero infértiles, mientras que las hembras no presentan ningún fenotipo desde el periodo embrionario evidente. El análisis de estos mutantes indicó que este gen afecta la espermatogénesis en distintas etapas postnatales. Por ejemplo en el día 18 dpc se observó una importante deficiencia de CGP. Sin embargo a los 10 dpp (días post-parto), en que normalmente se reasume la mitosis produciéndose una gran cantidad de espermatogonias, se demostró que hay una reducción en el número de espermatogonias; y más adelante durante la espermiogénesis se observó que no se produjeron todos los tipos de espermátidas, ya que en cortes de testículos no se observó la presencia de éstas. A partir de todo ello sugirió que *Dhh* era un factor importante para el desarrollo de las CGP de machos. Los resultados relacionados con el papel de *Dhh* en la etapa embrionaria se discuten en detalle más adelante en el contexto de la hipótesis que motivó este trabajo.

MADURACIÓN Y PROCESAMIENTO DE HEDGEHOG

Las proteínas *Hedgehog* consisten de un péptido señal con una región amino terminal muy conservada y un dominio carboxilo terminal. Las proteínas precursoras de *HH* sufren un corte autoproteolítico que depende de regiones conservadas en la porción carboxilo terminal. Este corte genera un péptido amino terminal de 19 KDa (N-HH) y otro péptido carboxilo terminal de 26-28 KDa (C-HH). Análisis bioquímicos han mostrado que el corte proteolítico de *HH* procede a través de un intermediario tioéster interno que se corta posteriormente debido a un ataque nucleofílico. (Lee, *et al.* 1994; Hammerschmidt, *et al.* 1997). También se ha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

demostrado que la parte amino terminal de *Shh* es el péptido activo (Williams, *et al.* 1999). Ver figura 3.

El colesterol juega un papel en la señalización de *Hedgehog* a varios niveles. Las proteínas *Hedgehog* contienen una molécula de colesterol que es adicionada postraducionalmente posterior a la autoproteólisis de *Hedgehog*. La adición del colesterol es crucial para la biogénesis de *Hedgehog*, pero su papel en la transducción de señales aún no está bien definido. Incardona (Incardona, *et al.* 2000) propone que la modificación lipídica a *Hedgehog* parece ser importante para el aumento en la eficiencia de la transducción de señales una vez que *Hedgehog* alcanza una célula blanco. Sin embargo, hay evidencias a favor de que la modificación con colesterol sirve para diseminar su actividad, más que para transducir la señalización de *Hedgehog* o anclarla en algún sitio (Lewis, *et al.* 2001). De esta manera, se explica que la adición del colesterol a N-HH se requiera para la señalización a larga distancia en miembros de vertebrados.

GENES INVOLUCRADOS EN LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE HEDGEHOG

Dentro de la vía de señalización de *Hedgehog*, son varios los genes involucrados que actúan debajo de él. A continuación se describen algunos de ellos.

PATCHED (PTC)

Patched es una proteína receptora transmembranal que cruza 12 veces la membrana celular y se ha demostrado por medio de ensayos bioquímicos que es el receptor de *Hedgehog* con una alta especificidad. En ratón *Ptc1* se une a *Shh*, *Dhh* e *Ihh* con alta afinidad (Marigo, *et al.* 1996^a; Marigo; *et al.* 1996^b; Goodrich, *et al.* 1996; Jensen, *et al.* 1997; Goodrich, *et al.* 1998). Existe otro miembro receptor denominado *Ptc2* que presenta una estructura parecida a *Ptc1* y similar afinidad hacia los tres miembros de *Hedgehog* en mamíferos. (Carpenter, *et al.* 1998). En ausencia del *ligando*, *Ptc* se encuentra reprimiendo la vía de señalización de *Hedgehog*, promoviendo la modificación conformacional de *Smoothened (Smo)* hacia una forma no funcional (Ingham, *et al.* 2000; Ingham, *et al.* 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SMOOTHENED (SMO)

Smoothened es una proteína con 7 dominios transmembranales (Alcedo, et al. 1996; van der Heuvel, et al. 1996). En ausencia de *Hedgehog*, *Smo* se encuentra reprimido por acción de *Ptc*. En presencia de *Hedgehog* se libera la represión de *Ptc* sobre *Smo*, activándose de esta manera la vía de transducción de *Hedgehog*. *Smo* es un transductor positivo de la señal de *Hedgehog* y su ausencia lleva a consecuencias fenotípicas similares a las mostradas por la pérdida de *Hedgehog*. (Tabin, et al. 1997).

CUBITUS INTERRUPTUS (CI) Y GLI:

Ci es un factor transcripcional con dominios de dedos de zinc que al igual que los demás miembros de esta vía se identificaron en *Drosophila*. Los análogos de *Ci* en mamíferos son las proteínas *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. Estas proteínas actúan en conjunto como lo hace *Ci* de manera individual en *Drosophila* (Aza-Blanc, et al. 1999).

En *Drosophila*, *Ci* se encuentra asociada a un complejo a través del cual se une a los microtúbulos (Murone, et al. 1999). Entre las proteínas del complejo que se encuentran está *Costal-2 (Cos2)*, que es una proteína relacionada a cinesina que presenta una alta afinidad de asociación a los microtúbulos (Sisson, 1997); otra es *Fused (fu)*, que tiene características de serina-treonina cinasa; y el supresor de *fused (Sufu)*.

La ausencia de *Hh* permite el procesamiento de la proteína *Ci*, convirtiéndola en una forma represora de 75 KDa que se puede unir a genes blanco e inhibir su transcripción. En contraste, la desrepresión de *Smo*, inhibe el procesamiento y promueve el transporte de la forma activada de *Ci* al núcleo, que corresponde a la proteína completa (155 KDa). Esto conduce a la activación de la transcripción de los blancos de *Hh*. Los genes blanco que se han identificado en *Drosophila* para *Ci* son *Dpp*, *Ptc* y *Wingless (Wg)* entre otros. (Murone, et al. 1999).

Análisis de expresión de genes blanco de *Hh* en etapas embrionarias, larvarias y adultas muestran que *Ci* es requerido absolutamente para la señalización de *Hh*, eliminando por completo la posibilidad de que existan ramificaciones de transducción de señales de *Hh* independientes de *Ci* (Méthot, et al. 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los tres homólogos de *Ci* en mamíferos *Gli1*, *Gli2* y *Gli3* se han identificado en humano y ratón (Hui, *et al.* 1994; Rupert, *et al.* 1990). Las proteínas *Gli* comparten una alta homología en sus 5 dominios con dedos de zinc, pero muy limitada fuera de esta región (Matisse, *et al.* 1999). *Gli1* se identificó como un gen aislado en una línea de glioma humano (Kinzler, 1987).

Los ratones con mutaciones nulas para *Gli1* son viables (Park, *et al.* 2000). En cambio, los ratones nulos para *Gli2*, mueren antes de nacer con anomalías esqueléticas (Mo, *et al.* 1997; Ding, *et al.* 1998) y de pulmones (Motoyama, *et al.* 1998). Mutantes para *Gli3* tiene defectos en pulmones, sistema nervioso central y polidactilia (Grindley, *et al.* 1997; Hui, *et al.* 1993).

Así mismo la sobre-expresión de *Gli1* es capaz de rescatar mutantes homocigotas de *Gli2* (Chunyang, *et al.* 2001). Los análisis de dobles mutantes de las proteínas *Gli* en distintas combinaciones, sugieren que las actividades de las proteínas *Gli*'s se sobrelapan en cierto grado y que *Gli1* es capaz de sustituir en cierto grado las actividades de *Gli2* y *Gli3* (Park, *et al.* 2000) (Ver tabla 1).

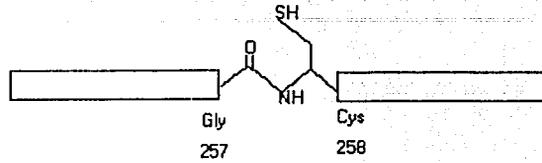
<i>Gli1</i> ^{-/-}	Viables y parecen ser normales (Park, <i>et al.</i> 2000)
<i>Gli2</i> ^{-/-}	Defectos en esqueleto, pulmones anormales (Mo, <i>et al.</i> 1997; Ding, <i>et al.</i> 1998; Motoyama, <i>et al.</i> 1998).
<i>Gli3</i> ^{-/-}	Defectos en pulmones, SNC y polidactilia (Franz, 1994; Grindley, <i>et al.</i> 1997; Grove, <i>et al.</i> 1998; Hui, <i>et al.</i> 1993; Schimmang, <i>et al.</i> 1992).
<i>Gli1</i>^{+/+}/<i>Gli2</i>^{+/+}	Aparentemente normales (Park, <i>et al.</i> 2000)
<i>Gli1</i>^{+/+}/<i>Gli2</i>^{+/+}	La mayoría mueren después de nacer y muestran pulmones muy pequeños (Park, <i>et al.</i> 2000)
<i>Gli1</i>^{+/+}/<i>Gli3</i>^{+/+}	Son viables con polidactilia, como la mutante homocigota de <i>Gli3</i> (Park, <i>et al.</i> 2000)
<i>Gli2</i>^{+/+}/<i>Gli3</i>^{+/+}	Defectos en pulmones y esqueleto (Park, <i>et al.</i> 2000)

Tabla 1. Mutantes reportadas de las proteínas de *Gli* en ratones.

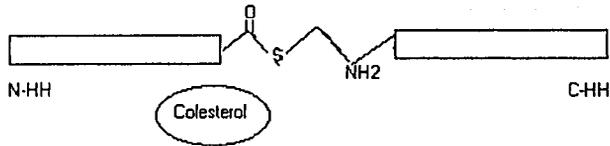
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuando *Gli1* se expresa ectópicamente en mosca, la proteína funciona como un activador de la señalización de *Hedgehog*. También en moscas transgénicas se ha visto que *Gli1* y *Gli3* juntos pueden rescatar mutantes de *Ci* (von Mering; *et al.* 1999, Aza-Blanc, *et al.* 2000); además, las proteínas *Gli1* y *Gli3* pueden transducir señales de *Hh* en *Drosophila* y ambas son reguladas por *Hh*; *Gli1* como un activador inducible y *Gli3* como represor regulado. *Gli2* comparte propiedades funcionales tanto con *Gli1* como con *Gli3*. *Gli2* y *Gli3* pueden proteolizarse de manera similar a *Ci* en *Drosophila* (Aza-Blanc; *et al.* 2000).

La noción general que surge de todas estas observaciones es que cada una de las proteínas *Gli* lleva a cabo funciones específicas de activación o represión, las cuales en *Drosophila* son realizadas por *Ci*. Esta separación de funciones, en principio, haría posible una mayor variedad de respuestas celulares, así como una regulación más fina de ellas, ya que la respuesta a *Hh* estaría determinada no únicamente por los niveles del ligando, si no por la composición de proteínas de *Gli* presentes en una célula en particular. La figura 4 representa un resumen de cómo se lleva a cabo la regulación de *Hh* en *Drosophila*.



**Conversión del enlace
peptídico Gly 257 - Cys 258
a un enlace tioester interno**



**Ataque nucleofílico al enlace
tioester**

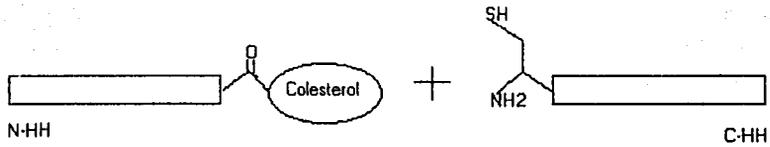


Figura 3. Mecanismo de autoproteólisis de *Hedgehog*. (Hammerschmidt, *et al.* 1997).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

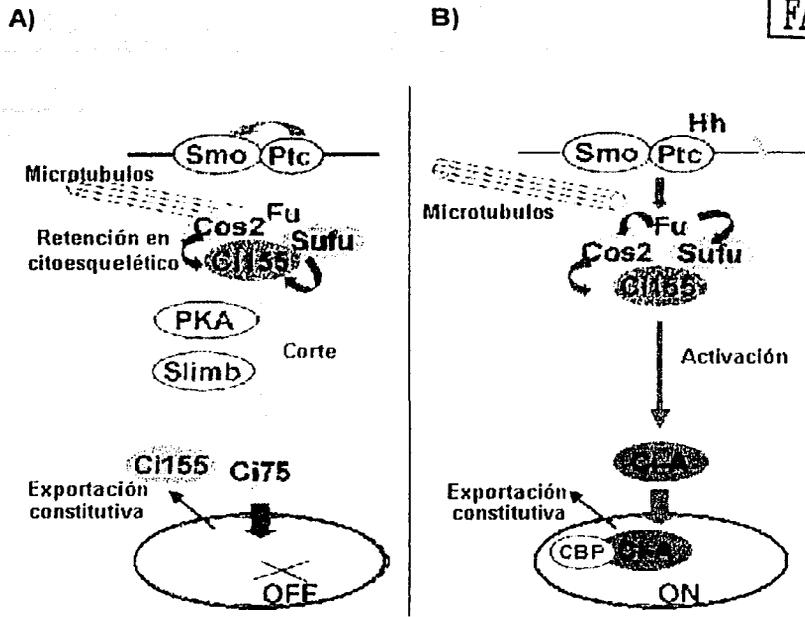


Figura 4. Transducción de señales dependiente de *Hedgehog*. A) En ausencia de *Hh* se genera la inhibición de *Ptc* sobre *Smo*, y permite la formación de un complejo *Ci/Fu/Cos2/Sufu* que se une a microtúbulos. Por efecto de *PKA* y el proteosoma se *Ci* se proteoliza produciéndose una isoforma represora de la transcripción. B) En presencia de *Hh* se libera la represión de *Ptc* sobre *Smo*, activándose la transducción de señales de *Hh*. *Ci* se libera del tetracomplejo y se transloca al núcleo para actuar como activador transcripcional de genes blanco de *Hh* (Monnier, et al. 2002).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Al iniciarse este trabajo diversos datos experimentales condujeron a la hipótesis de que el gen *Dhh* podría tener una participación en el inicio de la diferenciación sexual de las CGP. Estos datos son:

- 1.- *Dhh* es un gen que codifica para una proteína secretable y se expresa en las células de Sertoli. Sabemos que la decisión sexo-específico durante la determinación sexual de las CGP depende de señales enviadas a partir de las células de Sertoli.
- 2.- Este gen inicia su expresión en machos al 11.5 dpc, como consecuencia de la actividad del gen *Sry* y de hecho constituye una de las indicaciones más tempranas de la diferenciación sexual masculina. La determinación sexual de las CGP ocurre en forma irreversible un poco después de este momento, aunque es visible sólo al 13.5 dpc (McLaren, *et al.* 1997).
- 3.- En el ratón nulo para *Dhh* (Bitgood, *et al.* 1996), se observó que la espermatogénesis se afecta desde la etapa más temprana en que se analizó (18.5 dpc). Las alteraciones que se presentaban en esta etapa consistían en una disminución notable en el número de espermatogonias. Este dato es de gran relevancia ya que como se mencionó antes, en el día 13.5 las CGP de macho dejan de proliferar y entran en estado de quiescencia o reposo, en el cual permanecen hasta 10 días después del nacimiento. Por ello, la disminución de espermatogonias en el día 18.5 podría solo explicarse por la muerte de las CGP, que sin duda debía estar ocurriendo posteriormente a su determinación sexual, ya que en hembras no se observa. La muerte de las CGP en el testículo sugería dos hipótesis, o bien que *Dhh* funcionaba como un factor de sobrevivencia en la etapa de quiescencia; o que podría ser el factor inhibidor de la meiosis, puesto que se ha observado que cuando las CGP entran en meiosis en el testículo se induce la apoptosis (Matsui, *et al.* 1998)

Con estos argumentos se propuso estudiar al gen *Dhh* en el contexto de la determinación sexual de las CGP. Una alternativa para estudiar la función de *Dhh* *in vivo* era expresar este gen en gónadas de hembras transgénicas. Dado que la expresión de *Dhh* ocurre en una etapa donde la diferenciación sexual es aún incipiente (11.5 dpc), la gónada de hembra de esta misma etapa, sería un buen

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

modelo para evaluar si *Dhh* influía en la diferenciación sexual. Esto se observaría aún si este gen no actuara directamente sobre la línea germinal, ya que podríamos observar si al estar presente en forma ectópica, se produciría un efecto masculinizante sobre las CGP o sobre cualquier otro tipo celular. Por otra parte, aunque en la gónada de hembra no se expresa el receptor *Ptc*, se había establecido tanto en mosca como en ratón que la señal de *Hedgehog* activa la expresión de *Ptc* (Vortkamp, et al. 1996; Jensen, et al. 1997; Goodrich, et al. 1998), lo que era consistente con la observación de que la mutante nula de *Dhh* se apagaba también la de *Ptc* (Bitgood, et al. 1995). Debido a lo anterior podríamos esperar que en la gónada de hembras transgénicas se induciría la expresión de este gen.

Para generar un ratón transgénico con la metodología de la microinyección en ovocitos, era necesario generar un vector de expresión (figura 5). Este vector idealmente debía contener el cDNA de *Dhh*, sin embargo, dado que este cDNA no se pudo obtener mediante varias estrategias experimentales, se decidió usar el cDNA de *Shh* (70% de identidad entre las secuencias de cDNA de *Shh* y *Dhh*). No consideramos que este fuera un problema ya que como se mencionó anteriormente, distintos experimentos son indicativos de que en ratón hay una sola vía transduccional para los miembros de *Hedgehog* y que las tres subunidades activan la vía con igual eficiencia a través del mismo receptor. (Goodrich, et al. 1996; Marigo^a, et al. 1996). La región regulatoria que se utilizó fue la del gen *Dax-1*, la cual había sido caracterizada previamente (Narváez, 1996). De esta caracterización se aisló un fragmento de 11 Kb del que se demostró que controlaba la expresión exclusiva en las gónadas. El patrón de expresión de *Dax-1* en las gónadas era muy conveniente para nuestros propósitos ya que se expresa inicialmente a los 11.5 dpc en ambos sexos en el componente somático equivalente a los tipos de soporte (células de presertoli y pregranulosa); y a los 12.5 dpc decrece en los machos pero se mantiene en hembras (figura 6). Esto nos permitiría expresar *Shh* desde los 11.5 dpc en células somáticas análogas a las de Sertoli en hembras.

No obstante, que todos los datos a los que nos referimos en la introducción sugerían que *Dhh* tenía un efecto en la espermatogénesis y no en el desarrollo de los linajes somáticos, un dato quizá contradictorio era que *Ptc1* parecía estar presente en las células de Leydig, lo que podría sugerir que el efecto de *Dhh* sobre

las CGP era indirecto, o que otro receptor para *Dhh* podría estar expresando en las CGP. Por esta razón otro aspecto que era importante explorar en este trabajo era conocer en donde se expresaba un nuevo receptor de *Hedgehog* entonces recién caracterizado, *Ptc2*, así como los efectores de la vía de *Hedgehog*, tales como las proteínas *Gli*. Al respecto, *Gli1* era especialmente importante ya que se ha encontrado que siempre se activa en respuesta a *Hedgehog* (Dahmane, et al. 1997). También era importante saber qué proteínas de *Gli* estaban participando en la respuesta a *Dhh* en la gónada, ya que esta determinación podría contribuir al entendimiento de cómo se asocian las distintas combinaciones de las proteínas *Gli* a respuestas celulares específicas.

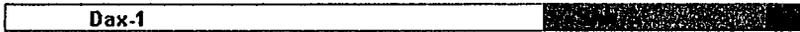


Figura 5. Mapa del vector de expresión pDSA usado para la generación del ratón transgénico. En amarillo se representa la región promotora de *Dax-1*, en verde el cDNA de *Shh* y azul la cola de poliadenilación.

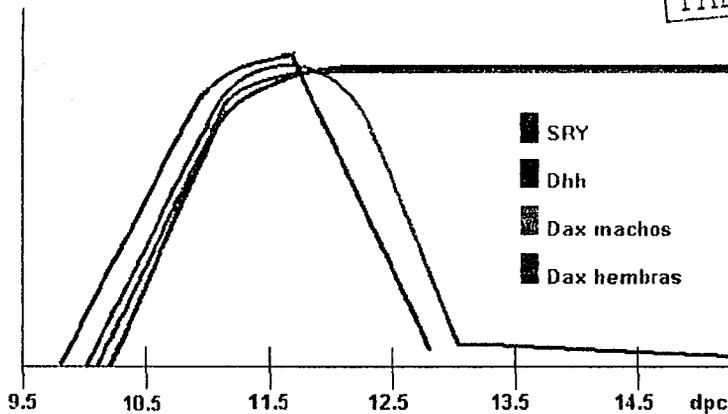


Figura 6. Curvas de expresión de *SRY*, *Dhh* y *Dax-1* en hembras y machos. (Koopman, et al. 1990; Kacker, et al. 1990 ; Narváez, 1996 ; Swain, et al. 1996 ; Bitgood, et al. 1996)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS:

Por todo lo anterior se plantearon los objetivos que a continuación se enumeran:

- Obtener un ratón transgénico con la construcción *Dax-1-Shh* (*pDSA*).
- Genotipificar y expandir una línea de ratones transgénicos que expresara *Shh* en la gónada de hembra durante el período aproximado en el que se expresa *Dhh* en la gónada de macho.
- Verificar si la línea de ratones transgénicos expresa el transgén *Shh* en el patrón de expresión esperado y si afecta la fertilidad en las hembras.
- Caracterizar por medio de RT-PCR la expresión de genes que se expresan cascada abajo de *Hedgehog* en gónadas silvestres de machos y hembras a diferentes etapas de diferenciación embrionaria para comprender mejor como es que se lleva a cabo la acción de *Hedgehog* en éste órgano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

- **NOTA:** En este estudio se usaron ratones CD1 y B6.
- Poner a cruzar un ratón macho y una hembra durante toda la noche.
- Mantenerse en un cuarto controlado (10 hrs de luz y 14 hrs de oscuridad).
- Revisar al día siguiente la presencia de tapón vaginal indicativo de la cópula. Este día se considera como día 0.5 dpc.

OBTENCIÓN DE GÓNADAS EMBRIONARIAS

- Hacer una cruce entre un ratón macho y una hembra.
- Dejar la ratona hasta el día de gestación deseado.
- Sacrificar las hembras gestantes por dislocación cervical.
- Disectar los úteros y sumergirlos en medio L15 (Microlab, México) con 10% de suero fetal bovino (SFB).
- Hacer un corte diagonal a lo largo del embrión, tomando como punto de referencia el hígado.
- Bajo un microscopio estereoscópico, localizar las gónadas y con ayuda de unas tijeras de microcirugía obtener las gónadas y depositarlas en un tubo eppendorf conteniendo Trizol (Trizol Reagent. GibcoBRL. Cat. 15596-026) para extraer el RNA. **NOTA:** Extraer únicamente la gónada libre de mesonefros.

CULTIVO DE CÉLULAS EMBRIONARIAS TOTIPOTENCIALES "ES" Y ENSAYO DE ELECTROPORACIÓN PARA EXPRESIÓN TRANSITORIA

Para todo el procedimiento usar soluciones grado Biología Molecular o probadas para cultivos celulares. Las células "ES" R1 propagadas en platos gelatinizados no pierden su totipotencialidad o habilidad para contribuir a la línea germinal.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Para preparar los platos gelatinizados

- Enjuagar la superficie de un plato de cultivo de 10 cm con 5 ml de gelatina.
- Aspirar el exceso de gelatina.
- Dejar secar por 2-4 minutos.
- Adicionar medio fresco a los platos e incubar a 37°C hasta ser requeridos.

Platos con células "feeder"

Líneas celulares de fibroblastos STO son los más comúnmente usadas como láminas "feeder" o alimentadoras para cultivos de largo término así como para el mantenimiento de células "ES".

- Descongelar el vial con las células "ES".
- Transferir un tubo de 15 ml con 10 ml de medio "DMEM" suplementado con SFB al 10%
- Centrifugar a 1000 rpm por 5 min a temperatura ambiente (T.A.).
- Aspirar el sobrenadante y resuspender el contenido celular en 10 ml de medio.
- Platear la suspensión en 5 platos de 10 cm e incubar. Cuando las células se encuentran confluentes (3 días aprox.), tratar con Tripsina.
- Aspirar el medio de las placas con células confluentes y reemplazar con 5 ml de medio conteniendo 1000 µl de tripsina a 1 mg/ml.
- Centrifugar y aspirar el medio.
- Lavar con M15 para inactivar la tripsina.
- Adicionar 10 ml EDTA por cada plato y resuspender las células por pipeteo. No hacer burbujas.
- Determinar la densidad celular en una cámara de Neubauer (11 X10⁶ células).
- Para la electroporación de las células, mezclar 20 µg de DNA y 0.8 ml de la suspensión de células "ES" en una cubeta (BioRad Cat. 165-2088).
- Las condiciones de electroporación: 250 Voltios, 500 mF para un electroporador "BioRad Gene Pulser".
- Una vez electroporadas las células "ES" dejar en cultivo transitorio de 24 hrs, y verificar la confluencia.
- Lavar con PBS.
- Lavar con 3 ml de Trizol para extraer el RNA (Trizol Reagent. GibcoBRL. Cat. 15596-026).
- Extraer el RNA y tratar exhaustivamente con DNAsa - libre de RNAsa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

El reactivo de Trizol está optimizado para su uso en extracción de RNA de células y tejido en un solo paso. Es una solución de fenol e isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi; 1987).

- Adicionar 300 μ l de Trizol a las gónadas de etapas embrionarias (para etapas adultas usar 1 ml de Trizol).
- Disgregar por completo el tejido ya sea usando homogenizadores plásticos desechables para tubos eppendorf o por Vortex. (Si se usan células basta con hacer vortex durante algunos minutos para romperlas).
- Dejar reposando a T.A. durante 5 minutos para permitir la completa disociación de los complejos nucleoprotéicos.
- Adicionar 0.2 volúmenes por cada 1 ml de Trizol. Agitar y dejar en reposo durante 3 minutos a T.A.
- Centrifugar durante 15 min a 4°C a 12,000 X g.
- Separar la fase acuosa (incolora), teniendo precaución de no tomar solución de la interfase ya que tiene alto contenido de DNA genómico.
- Adicionar 1/10 de acetato de sodio 3M y 0.5 volúmenes de isopropanol para precipitar el RNA incubando las muestras durante 10 minutos a T.A.
- Centrifugar 10 minutos a 4°C y 12,000 X g y lavar con etanol 75%.
- Centrifugar durante 5 minutos a 4°C a 7,500 X g. El precipitado suele lucir a veces incoloro.
- Resuspender el RNA en 10 μ l para gónadas embrionarias y en mayor volumen para muestras más grandes.

TRATAMIENTO CON DNAsa – LIBRE DE RNAsas

Debido a que las muestras de RNA extraídas con Trizol normalmente tienen contaminación con DNA genómico, es necesario tratarlas con DNAsa para degradar el DNA existente y evitar tener resultados falsos positivos.

Volúmen de reacción = 30 μ l.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Adicionar al RNA 1 – 2 μ l de DNAsa libre de RNAsas (DNase I RNase-free. Roche. Cat. 776785), buffer de reacción, inhibidor de RNAsas y agua hasta alcanzar el aforo deseado.
- Incubar por 1.5 – 2.5 horas para garantizar la completa eliminación de DNA.
- Aforar a un volumen de 200 μ l con agua DEPC.
- Extraer con fenol ácido:cloroformo isoamílico (24:1) para inactivar la DNAs.
- Incubar en hielo durante 10 minutos mezclando en intervalos de 3 minutos.
- Centrifugar durante 10 minutos a 4°C a 12,000 X g.
- Recuperar la fase acuosa y adicionar 1/10 acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- Centrifugar durante 10 minutos a 4°C y a 12,000 X g.
- Lavar con etanol 75% y centrifugar.
- Decantar y dejar evaporar el resto del etanol.
- Resuspender en agua DEPC. Para comprobar que el RNA extraído se encuentra libre de DNA genómico, hacer un PCR de THRNA usando 1 μ l del RNA como templado, el resultado debe ser negativo.

SÍNTESIS DE cDNA

- Adicionar 1 ng – 5 μ g de RNA total ó 1 ng – 500 ng de RNAm a un tubo eppendorf de 1.5 – 0.5 ml libre de nucleasas, 1 μ l de Oligo (dT), 1 ng – 5 μ g de RNA, 1 μ l de mezcla de dNTP's 10 mM (10 mM de cada uno; dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro).
- Adicionar H₂O DEPC estéril.
- Calentar la mezcla a 65 – 70°C por 5 minutos.
- Poner en hielo 1 min.
- Centrifugar para bajar la mezcla.
- Adicionar 4 μ l "First Strand Buffer", 2 μ l DTT 0.1 M, 0.5 μ l inhibidor de RNAsa (40 U/ μ l). Incubar a 42°C durante 2 minutos.
- Adicionar 1 μ l de enzima Superscript II mezclando perfectamente.
- Incubar la reacción a 42°C durante 50-80 minutos.
- Inactivar la reacción calentando a 70°C por 15 minutos. Usar el cDNA como templado para amplificación en RT-PCR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

- Colocar los fragmentos de oreja o cola en el buffer "EPB" (EDTA 50mM, Tris 50 mM pH 8.0 y SDS 1%).
- Adicionar 25 μ l de proteinasa K (20 mg/ml).
- Incubar a 55°C O/N.
- Inactivar la proteinasa K por 15 min a 65°C.
- Centrifugar la muestra durante 10 min a 14000 X g y separar la fase acuosa que contiene el DNA genómico.

NOTA: Se puede realizar una extracción con Fenol:cloroformo, precipitar y lavar la muestra para obtener una mejor calidad del DNA genómico.

PCR

- Adicionar dNTP's 10 mM, oligonucleótidos 30 pM (sintetizados en la unidad de síntesis de macromoléculas), Taq DNA Polimerasa (Roche Cat.1146165. 0.1 μ l = 1 U), buffer de polimerasa 10X (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂), H₂O DEPC estéril.
- Aforar a 15 μ l.
- Tomar 1/10 del cDNA sintetizado para las reacciones de RT-PCR.
- Los termocicladores que usados fueron un "Robocycler Gradient-40 Stratagene" (tubos de 0.6 ml), y un HYBAID Omn-E (tubos de 0.2 ml).
- Condiciones de reacción:
 - 95°C / 2 min 1 ciclo
 - 94°C / 1 min.
 - 1 min de temperatura de alineamiento, variable para cada reacción (tabla 2)
 - 72°C / 1 min 30 ciclos y 72°C 10 min de extensión.
- Análizar los productos de RT-PCR en un gel de agarosa al 1.5 %.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIBRIDACIÓN *IN SITU*

1. Fijación y almacenamiento.

- Extraer el tejido u órgano a hibridar.
- Fijar inmediatamente con paraformaldehído al 4 % (PFA) en PBS (el tiempo de fijación será directamente proporcional con el tamaño y edad del órgano o tejido).
- Lavar 2 veces por 5 min a 4°C con PBT.
- Deshidratar el tejido con metanol al 25, 50, 75 y 100% en PBT durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y guardar en metanol 100% a -20°C.

2.- Preparación de sonda.

- Mezclar a temperatura ambiente. 10 µl de agua destilada, 4 µl de solución de transcripción 5X (Boehringer), 2 µl de DTT 0.1 M (Boehringer), 2 µl de mezcla de ribonucleótidos 10X (Biolabs), 1 µg de plásmido lineal, 0.5 µl RNAsin (100 U/µl) y 10u/µl de la RNA polimerasa (T7, T3, o SP6).

3.- Gel desnaturalizante para RNA.

- Preparar un gel de agarosa al 1% en MOPS 1X, con formaldehído a una concentración final de 5%.
- Tomar 4 ml de la sonda y adicionar 12 ml de solución de carga.
- Incubar a 65°C, 5 min.
- Pasar a hielo y adicionar 2 ml de azul de bromofenol y xilencianol.
- Cargar el gel y lo correr a 100 volts.
- Transferir a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente (Hybond N+, Amersham).
- Lavar la membrana en SSC 2X y fijar por entrecruzamiento con luz ultravioleta.
- Lavar con solución DIG1 durante 15 min.
- Bloquear con solución de bloqueo 0.5% (Boehringer) e incubar 3 min en solución DIG2.
- Lavar 2 veces el anticuerpo con DIG1 y colorear con DIG3 (conteniendo NBT y BCIP).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.- Hibridación.

- Hidratar el tejido u órgano por medio de lavados con metanol en PBT 75, 50 y 25 % durante 5 min cada uno.
- Lavar 2 veces con PBT por 5 min.
- Tratar con peróxido de hidrógeno al 6% en PBT durante 1 hr.
- Lavar 3 veces con PBT durante 5 min y tratar con proteinasa K durante 5 min.
- Lavar 3 veces con PBT durante 5 min.
- Fijar en glutaraldehído / paraformaldehído (2% / 4%) con Tween 20 al 0.01% por 20 min.
- Incubar a 70°C durante 1 hr en solución de prehibridación.
- Posteriormente incubar con la solución de prehibridación más 1 mg/ml de sonda se incubó a 70°C durante 12 hrs.
- Lavar 2 veces por 3 min a 70°C con la solución 1.
- Lavar con una mezcla de las soluciones 1 y 2 (1:1) por 10 min a temperatura ambiente.
- Lavar 4 veces con la solución 2 cada 5 minutos a temperatura ambiente, 5 min con la solución 3 a temperatura ambiente seguido de 3 lavados más con la solución 3 a 65°C durante 30 min cada uno.
- Hacer 3 lavados con TBST de 5 min cada uno.
- Bloquear el suero de borrego al 10% en TBST, después de 3 hrs cambiar la solución y adicionar el anticuerpo.
- Dejar a 4°C durante toda una noche.
- Al siguiente día, lavar 3 veces con TBST por 5 min y 4 veces más durante una hora.
- Dejar toda la noche con TBST.
- Para el revelado, lavar 3 veces el anticuerpo antidigoxigenina con NTMT por 10 min.
- Incubar en oscuridad con 175 µg/ml de NBT y 300 µg/ml de BCIP hasta observar señal colorida.
- Detener la reacción lavando 2 veces con PBT por 15 min y una vez con glicerol al 50%. Se puede almacenar en glicerol 80% en PBT. (Hogan, *et al.* 1994)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SOLUCIONES

- **Anticuerpo antidigoxigenina** A 500 μ l de TBST 1X se agregó 3 mg de polvo de embrión y se puso durante 30 min a 70°C en agitación. Una vez transcurrido este tiempo se enfrió en hielo y adicionó 5 μ l de suero de borrego y 1 μ l de anticuerpo-antidigoxigenina (Boehringer).
- **DIG1** Tris 100 mM pH 7.5 y NaCl 150 mM.
- **DIG2** 1 ml de anticuerpo anti-DIG en 2 ml de DIG 1.
- **DIG3** Tris 100 mM pH 9.5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM.

- **MOPS.** A 400 ml de agua DEPC 20.93 g MOPS, 0.05 g acetato de sodio y 10 ml EDTA 0.5 M. Ya disuelto ajustar el pH a 7 con NaOH 1N y aforar a 500 ml para obtener una concentración final de 200mM de MOPS; 1mM acetato de sodio y 10 mM de EDTA.
- **NTMT** NaCl 100 mM, Tris-HCl 100 mM pH 9.5, MgCl₂ 50 mM, Tween 20 0.1% y levamisol 2 mM.

- **Solución 1** Preparar la solución a formamida 50%, SSC 5X pH 4.5 y SDS 1%.
- **Solución 2** NaCl 0.5 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.5, Tween 20 10%.
- **Solución 3** Obtener una concentración final de formamida 50% y SSC 2X pH 4.5.
- **Solución de coloración.** Por cada ml de DIG3 adicionar 30 μ l de NBT y 150 μ l de BCIP.
- **Solución de prehibridación.** Concentración final de formamida 50%, SSC 5X pH 5, RNAt de levadura 50 μ l/ml, SDS 1% y heparina 50 μ g/ml.

- **TBST 10X** Para una concentración final de 136 mM de NaCl, 0.25 mM de KCl, 0.25 mM de Tris-HCl pH 7.5 y 10% de Tween 20.
- **Agua dietilpirocarbonato (DEPC):** Agregar 1 ml de DEPC a 1 Lt de agua estéril agitando O/N. Esterilizar y guardar a temperatura ambiente.
- **PBS** (Bufer de fosfatos sódico) Disolver 8 g de fosfatos en 800 ml de agua DEPC y ajustar pH a 7.5 con HCL después aforar a 1 Lt con agua DEPC para obtener una concentración final de 100mM de KCl, 5 mM de Na₂HPO₄, 1 mM de KH₂PO₄.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Solución de cargado para RNA:** Para 1 ml de solución adicionar 50 μ l de formamida, 250 μ l de SSC 20X pH 5.0, 5 μ l de RNA de levadura con una concentración de 10 mg/ml, 100 μ l de SDS 1% y heparina 50 μ g/ml.
- **SSC 20X:** 175.3 g de NaCl (Concentración final de 3M), 88.2 g de citrato de sodio (concentración final 0.3M) a pH 7.0 (ajustado con NaOH 10N) y aforado a 1 Lt.
- **Oligo (dT) (12-18) Primer** 0.5 μ g / μ l (GibcoBRL Cat. 18418-012).
- 500 mM KCl pH 8.3.
- **Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase.** (GibcoBRL Cat 18064-014).
- **Buffer de transcripción 5X (First strand Buffer).** 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂. (GibcoBRL Cat. Y00146)
- DTT 0.1 M (Cat. Y00147)
- **RNase OUT** Inhibidor de Ribonucleasa Recombinante (Cat 10777-019 GibcoBRL).
- **Trizol** Reagent. GibcoBRL. Cat. 15596-026).
- **DNase I RNase-free.** (Roche. Cat. 776785).
- **Taq DNA Polimerasa** (Roche Cat.1146165. 0.1 \square l = 1 U), buffer de polimerasa 10X (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂), H₂O DEPC estéril.
- **Marcador de peso molecular "φX174 RF DNA/Hae III Fragments".** (GibcoBRL. Cat. 15611-015).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Nombre	Secuencia de Oligonucleótidos	Producto Amplificado	Temp. de alineamiento
Ptc1 Upp Ptc1 Low	5' AAC-AAA-AAT-TCA-ACC-AAA-CCT-C 3' 5' TGT-CTT-CAT-TCC-AGT-TGA-TGT-G 3'	244 pb	63°C
Ptc2 Upp Ptc2 Low	5' GCT-TCG-AGC-TTA-CTT-CCA-AG 3' 5' GTC-AAG-CGG-GGT-GAG-GAT-CA 3'	468 pb	63°C*
Gli1 Upp Gli1 Low	5' GCT-GGA-TAT-GAT-GGT-TGG-CAA-GTG 3' 5' GGT-CCG-ATT-CTG-GTG-CTT-GGC-G 3'	520 pb	63°C
Gli2 Upp Gli2 Low	5' TTC-GTG-TGC-CGC-TGG-CAG-GC 3' 5' TTG-AGC-AGT-GGA-GCA-CGG-AC 3'	425 pb	63°C
Gli3 Upp Gli3 Low	5' TTC-GTG-TGC-CGC-TGG-CTT-GA 3' 5' TGA-ATG-GCT-GCC-GGA-ATC-TC 3'	415 pb	63°C
Shh Upp Shh Low	5' CGG-CAG-ATA-TGA-AGG-GAA-GAT-CA 3' 5' CGG-AGT-TCT-CTG-CTT-TCA-CAG-AA 3'	395 pb	64°C
THRNA Up THRNA Lo	5' AGG-TGA-GGA-GGC-ATG-ACG-GAT-GTA 3' 5' TAC-GCC-ACG-CTG-AAG-GGC-CTC-TAT 3'	322 pb gen. 272 pb cDNA	62°C
HPRT Upp HPRT Low	5' CCT-GCT-GGA-TTA-CAT-TAA-AGC-ACT-G 3' 5' GTC-AAG-GGC-ATA-TCC-AAC-AAC-AAA-C 3'	310 pb	58°C
ACT Upp ACT Low	5' GGC-CCA-GAG-CAA-GAG-AGG-TAT-CC 3' 5' ACG-CAC-GAT-TTC-CCT-CTC-AGC 3'	460 pb	58°C
DaxN Sonic	5' GAG-GTC-ATG-GCC-ACA-CAC-ATT 3' 5' GTC-ATC-AGC-CGG-TCT-GCT-CC 3'	450 pb	57°C
Dax-sonic Sonic	5' GAG-CCT-CAG-GCC-ATG-GTG-CT 3' 5' GTC-ATC-AGC-CGG-TCT-GCT-CC 3'	330 pb	57°C
Dhh c5 upp Dhh c3 low	5' AAG-CTG-ATA-ACT-CAC-TGG-CG 3' 5' TGG-CAT-TTC-CCG-GAA-AGC-AG 3'	269 pb	57°C

*35 ciclos.

Tabla 2. Pares de Oligonucleótidos usados y condiciones de reacción RT-PCR

RESULTADOS

Generación de un ratón transgénico con el vector de expresión pDSA

La construcción del vector de expresión pDSA (conteniendo el gen *Shh* bajo el control de la región reguladora del gen *Dax-1*) la llevé a cabo durante mi trabajo de tesis de licenciatura (Martínez, 2000). Dicha construcción fué analizada por patrones de digestión y por secuenciación de las uniones entre el promotor y el cDNA de *Shh*, así como un fragmento de la región 5' de *Shh*, la cual fue generada por PCR. A través de estos procedimientos se demostró que no existían mutaciones ni cambios de fase.

La generación de un ratón transgénico, se intentó varias veces en el IBT con la colaboración de la Dra. Verónica Narváez, pero desafortunadamente no se tuvo éxito ya que en la mayoría de los experimentos realizados ocurrió la reabsorción de los embriones durante la gestación, de manera que no se obtuvieron ratones vivos. Entonces se decidió mandar a hacer la microinyección en la unidad de transgénicos de la Universidad de Georgia. Para ello se envió una preparación apropiada de la construcción pDSA. Ellos nos enviaron 72 muestras con fragmentos de cola de los ratones que obtuvieron en 2 sesiones de microinyección (24 en la primera sesión y 48 en la segunda sesión) y nosotros nos encargamos de la genotipificación

La genotipificación se realizó por medio de PCR usando como templado el DNA genómico y con dos diferentes pares de oligonucleótidos (figura 7). En ambos juegos de oligonucleótidos, los "primers" 5' contenían secuencias complementarias al fragmento proveniente del gen *Dax-1*, mientras que los "primers" 3' eran complementarios a *Shh*. Este diseño garantizaba la amplificación exclusiva de la construcción transgénica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 7. El esquema representa las regiones de la construcción pDSA amplificadas por dos pares de oligonucleótidos Daxsonic-Sonic (A) y DaxN -Sonic (B).

De 72 ratones analizados por medio de PCR, se identificó solamente un ratón macho positivo (figura 8). En los experimentos realizados se incluyó, un control positivo consistente en DNA genómico silvestre más 10 pg de cDNA de pDSA, con el fin de simular la concentración aproximada de cDNA que se puede encontrar en DNA genómico. Cabe mencionar que se continuó con más sesiones de microinyección sin obtenerse otro ratón transgénico.



Figura 8. Fotografía de un gel de agarosa con el producto de PCR del ratón transgénico. La muestra de DNA genómico positiva para el ratón transgénico macho fue la 80/4. Los carriles 1+ y 2+ son los controles positivos. El último carril contiene como control negativo DNA genómico silvestre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Expansión de la línea del ratón transgénico pDSA

La expansión de la línea de ratón transgénico se llevó a cabo cruzando el ratón macho transgénico (fundador) con ratonas silvestres, como se muestra en la figura 9. De la progenie de esta cruce se obtuvieron ratones machos y hembras tanto homocigotos como heterocigotos. Los cuales se utilizaron para experimentos posteriores. En esta etapa no se hizo distinción de si eran homocigotos o heterocigotos.

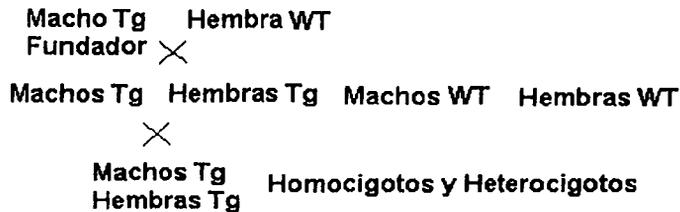
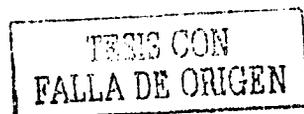


Figura 9. Cruzas que se llevaron a cabo para la expansión de la línea del ratón transgénico.

Análisis de la expresión del transgén mediante RT-PCR

De acuerdo al patrón de expresión antes descrito para el gen *Dax-1*, a los 13.5 dpc se detecta *Dax-1* endógeno en las gónadas de hembras y no en las de machos. Entonces se decidió utilizar gónadas de la progenie de 13.5 dpc (ver materiales y métodos) proveniente de la cruce entre ratones macho y hembra transgénicos para determinar si la construcción *Dax-1-Shh* se estaba transcribiendo de la manera esperada. Primero se genotipificó la progenie utilizando los DNA genómicos extraídos de las colas de estos embriones (figura



10A). De los ratones positivos para este transgén, se procedió a extraer RNA de las gónadas y se atendió con especial cuidado que el RNA no tuviera contaminación con DNA genómico (ver materiales y métodos). Se analizó la presencia del cDNA por medio de un RT-PCR del gen HPRT (figura 10B). Así mismo se hizo una reacción para amplificar el gen *Dax-1* y de esta manera confirmar que este gen se estaba expresando en cantidades detectables mediante nuestro ensayo y se encontró que efectivamente *Dax-1* si se detecta en las gónadas de hembras transgénicas y en menor cantidad que en las gónadas de machos (figura 10C). Finalmente con estas muestras se analizó con los pares de oligonucleótidos descritos en la figura 7 la presencia del transcrito (figura 10D). El resultado de este análisis, indicó que ninguno de los ratones positivos analizados de la línea 80/4 expresaba el transgén.

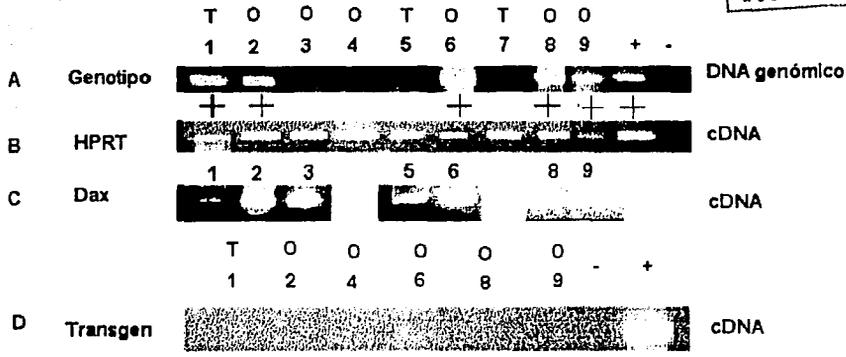
Análisis de la expresión del transgén mediante hibridación *in situ*

Otra forma en la que se analizó si los ratones transgénicos expresaban el transgén fue por medio de una hibridación *in situ* contra *Shh*. Para este experimento nuevamente se utilizaron gónadas de 13.5 dpc de la progenie obtenida de la cruce entre ratones macho y hembra transgénicos. El resultado se muestra en la figura 11. Se presenta la fotografía de la región caudal del embrión en donde resalta la expresión en una porción del intestino, de la médula de la espina dorsal, y la uretra. Dado que que la expresión de *Shh* es muy fuerte, en el embrión, se observa una señal intensa. Se muestra también la fotografía de los folículos del bigote ya que en ésta la expresión es mucho menos y se puede apreciar un patrón discreto, que demuestra la especificidad de la señal (figura 11A). Se muestra la fotografía de la cabeza de un ratón con sonda sentido (figura 11B). La fotografía de las gónadas de embriones hembras y machos con la sonda antisentido no presenta señal de *Shh* en ningún momento (figura 11C). De todo esto se puede concluir que el ratón transgénico que se obtuvo no expresó el transgén.

No se obtuvieron más ratones transgénicos a pesar de haberse realizado más microinyecciones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



T = Gónada macho O = Gónada hembra
+ = Muestras positivas

Figura 10. Análisis de expresión del transgén mediante RT-PCR de embriones de 13.5 dpc. Muestras 1 a 9 de gónadas de embriones más los controles positivo y negativo. La línea "A" representa la imagen del gel de agarosa del genotipo. Línea "B" RT-PCR de HPRT. Línea "C" RT-PCR de *Dax-1* endógeno. Línea "D" RT-PCR del transgén. Línea "+" control positivo incluye DNA genómico del ratón 80/4 para la genotipificación, cDNA de embrión con 10 pg de la construcción para "B, C y D". Línea "-" control negativo del coctel de reacción sin templado.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

(A) Hibridación de la región caudal del embrión y los folículos del bigote con la sonda antisentido



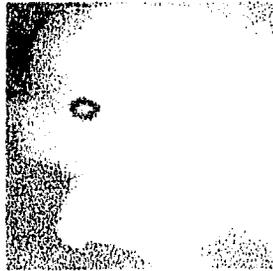
Región Caudal



Folículos de Bigote

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(B) Hibridación del embrión con la sonda sentido



(C) Hibridación de las gónadas con la sonda antisentido



Hembra



Tg



Macho

Tg

Figura 11. Hibridación *in situ* con *Shh*. (A) Se observan los controles de la sonda antisentido mostrando expresión de *Shh* en el embrión y los folículos del bigote. (B) La sonda sentido no da coloración. (C) gónadas de Hembra Tg y Macho Tg que no presentan expresión de *Shh*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Expresión transitoria del vector de expresión pDSA en células totipotenciales "ES"

La ausencia de la expresión de *Shh* en el ratón transgénico hizo necesario demostrar que esto no era debido a un problema intrínseco de la construcción tal que impidiera su transcripción. Para ello se llevó a cabo un experimento de expresión transitoria de la construcción pDSA en células totipotenciales en donde sabíamos que el promotor de *Dax-1* es activo (comunicación directa Dra. Verónica Narváez). Se introdujo pDSA en cultivos de células "ES". De las células transfectadas se obtuvo RNA para experimentos de RT-PCR y se incluyeron varios controles: primero se hizo un PCR utilizando como templado el RNA para ver si había contaminación con el DNA electroporado. Se encontró que no había contaminación (figura 12A). Se hizo un RT-PCR de *Dax-1* donde se demostró tal y como se esperaba que hay presencia endógena de *Dax-1* en las células "ES" (figura 12B). Se amplificó actina como control del cDNA (figura 12C). Finalmente se amplificó el transcrito correspondiente a la construcción pDSA, donde se corroboró que si se transcribió. Como control positivo además se empleó un reportero de β -galactosidasa, y se midió la expresión de LacZ también por RT-PCR (figura 12D, E y F).

Expresión de genes cascada abajo de la vía de *Hedgehog*, en gónadas embrionarias de ratón

Si bien como se describió en la Introducción, se conocen los genes que participan en la vía transduccional de *Hedgehog*, para el caso particular de la gónada embrionaria no se había definido cual o cuales de los receptores *Ptc* o de los mediadores *Gli* tendrían participación en las funciones tempranas de *Dhh*. Al respecto sólo se habían reportado los datos que se presentan en la tabla 3 y figura 13, referentes en la mayoría de los casos a períodos postnatales. Para determinar en forma preliminar que genes se activaban en la gónada en respuesta a *hedgehog*, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR. Si bien es claro que la única información que nos proporciona el RT-PCR de manera general es si se expresa o no un gen en la gónada completa, posterior a un análisis de este tipo se

podrían llevar a cabo inmunolocalizaciones de aquellos genes que resultaran positivos por PCR y así determinar que tipos celulares dentro de la gónada responden a la acción de *Dhh*. Con esta finalidad se extrajo RNA de gónadas de machos y hembras (perfectamente separadas del mesonefros) de los estadios de diferenciación 12.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5 dpc y adultos (se trabajó con gónadas únicas). Con estas muestras se realizaron reacciones de RT-PCR para los receptores *Ptc1* y *Ptc2* y para las proteínas *Gli1*, *Gli2* y *Gli3*. Cabe mencionar que al igual que en los ensayos de RT-PCR anteriores, se hizo un tratamiento muy riguroso con DNAsa libre de RNAsa para eliminar todo el remanente de DNA genómico presente y evitar falsos positivos. Así mismo, en todos los casos, se llevó a cabo el control de contaminación de genómico anteriormente descrito. Los resultados se presentan en la figura 14, y en la tabla 4.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

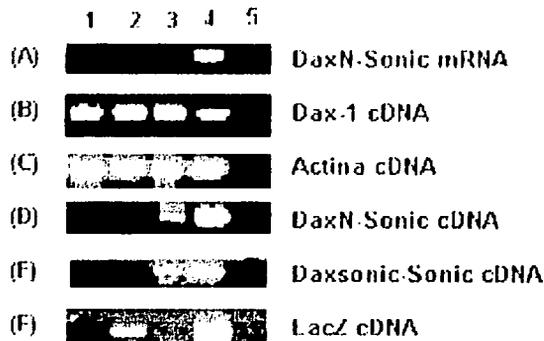


Figura 12. Expresión transitoria en células "ES". La columna 1 células "ES" electroporadas sin plásmido; la columna 2 células "ES" con el vector de LacZ que contiene el promotor de actina; la columna 3 células "ES" con pDSA; la columna 4 los controles positivos de la reacción de PCR correspondiente; La columna 5 el control negativo de la reacción con el coctel de reacción sin templado. La fila (A) corresponde a un PCR para amplificar el transgén y se usó RNA como templado; la fila (B) RT-PCR de *Dax-1*; la fila (C) RT-PCR de actina; las filas (D y E) RT-PCR con los diferentes juegos de oligonucleótidos que amplifican el transgén; la fila (F) RT-PCR de LacZ que fue el control positivo del ensayo.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Etapa	Expresión	Grupo celular	Referencia
11.5 dpc- adulto	<i>Dhh</i>	Células de Sertoli	Bitgood, 1995, Bitgood,
11.5 dpc – Adulto	<i>Ptc1</i>	Células peritubulares	Bitgood, 1995
11.5 dpc	<i>Ptc1</i>	Mesonefros	Hung-Chang, <i>et al</i> 2002
12.5 dpc	<i>Ptc1</i>	Mesonefros – gónada (Células peritubulares)	Hung-Chang, <i>et al.</i> 2002
13.5 dpc	<i>Ptc1</i>	Gónada (Células peritubulares)	Hung-Chang, <i>et al.</i> 2002
18.5 dpc	<i>Ptc2</i>	Espermatocitos 1rios y espermatocitos 2rios	Carpenter, <i>et al.</i> 1998
Adulto	<i>Ptc2</i>	Gónada	Carpenter, <i>et al.</i> 1998
18.5 dpc	<i>Fu</i>	Espermatocitos 1rios y espermatocitos 2rios	Carpenter, <i>et al.</i> 1998
Adulto	<i>Sufu</i>	Espermatocitos 1rios y espermatocitos 2rios	Stone, <i>et al.</i> 1999
Adulto	<i>Sufu</i>	Ovario	Stone, <i>et al.</i> 1999
15.5 dpc	<i>Sufu</i>	Testiculo	Stone, <i>et al.</i> 1999; Pearse II, <i>et al.</i> 1999
	<i>Gli1</i>	Espermatogonia	Persengiev, <i>et al.</i> 1997
	<i>Gli3</i>	Espermatogonia	Persengiev, <i>et al.</i> 1997

Proteína RNAm

Información con la que se contaba al inicio de este trabajo.

Información posterior al inicio de este trabajo.

Tabla 3. Análisis de expresión reportados antes y después de este trabajo en los diferentes tipos celulares de la gónada. Como se puede observar en color azul se representa la presencia de la proteína y el RNAm en negro (ver figura 13).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

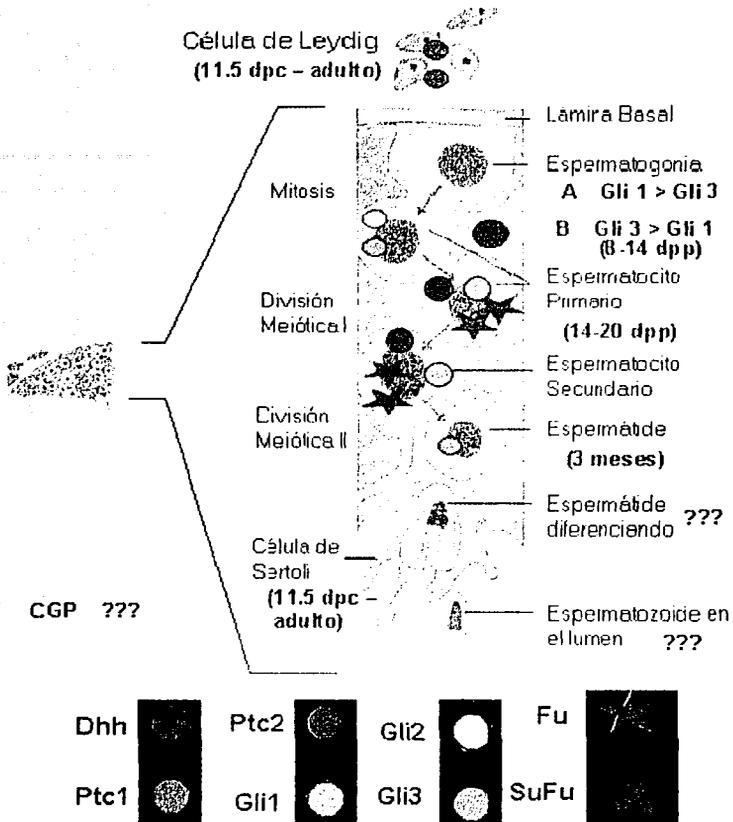
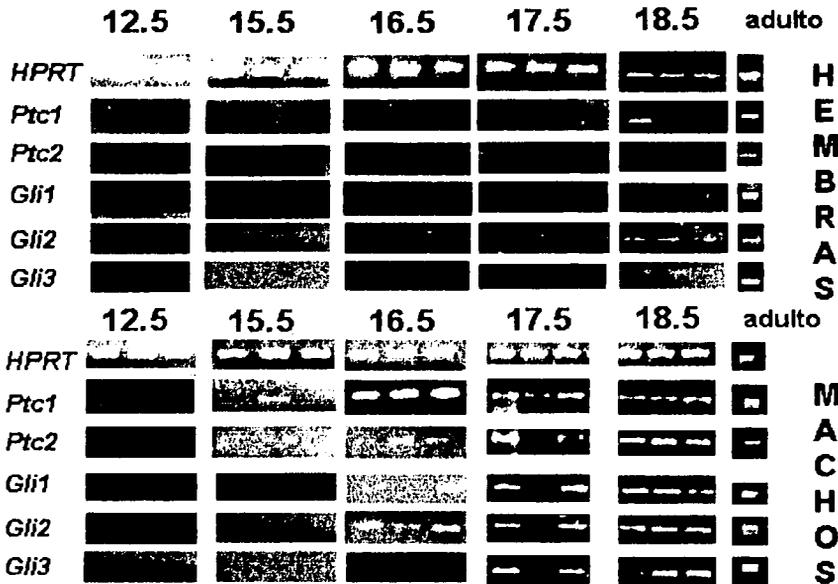


Figura 13. Esquema de la expresión de los miembros de la cascada de *Hedgehog* en el testículo. Apoya a la Tabla 2.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 14. RT-PCR de algunos miembros cascada abajo de la expresión de *Dhh*. Análisis de gónadas de hembras y machos a 12.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5 dpc y adultos. En todas las reacciones se usaron 2 μ l de cDNA como templado.

Idpc	O 12.5	O 15.5	O 16.5	O 17.5	O 18.5	O adulto
Ptc1	0/10	0/9	0/3	0/4	3/6	3/3
Ptc2	0/10	0/9	0/3	0/4	2/6	3/3
Gli1	0/10	0/9	0/3	0/4	4/6	3/3
Gli2	0/10	0/9	0/3	0/4	5/6	3/3
Gli3	0/10	0/9	0/0	0/0	2/6	3/3
	T 12.5	T 15.5	T 16.5	T 17.5	T 18.5	T adulto
Ptc1	0/9	1/6	8/10	9/14	8/9	3/3
Ptc2	0/9	1/6	6/10	4/14	8/9	3/3
Gli1	0/9	0/6	3/10	4/14	9/9	3/3
Gli2	0/9	0/6	7/10	7/14	8/9	3/3
Gli3	0/9	0/6	2/10	5/14	6/9	3/3

Tabla 3. Representación del número de gónadas que expresan algún miembro de la vía de señalización sobre el número de gónadas analizadas en ese estadio.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En forma breve las principales observaciones que se desprendieron de este experimento son, que la expresión de los genes de la cascada de *hedgehog* se inicia en machos a partir del día 15.5. En ese momento se detecta la aparición de los mensajeros de ambos receptores en proporción mayor para *Ptc1* que para *Ptc2*. La expresión de los genes *Gli* se inicia un día después y parece ocurrir de manera constante solo al final de la etapa embrionaria. Los mensajeros de los tres genes *Gli* se detectan mediante este ensayo. Por otra parte, de manera inesperada, se observó una débil amplificación de los genes analizados en varias de las muestras de 18.5 dpc y adulto de gónadas de hembras, a pesar de que está establecido que *Dhh* no se expresa en hembras. Por esta razón, se evaluó la posibilidad de que *Shh* se empezara a expresar en la gónada de hembra al final del período embrionario; sin embargo, no se encontró la presencia de este mensajero en la gónada adulta de ningún sexo (figura 15).

Se ha reportado que existe cierta contribución celular del mesonefros hacia la gónada (Buehr, *et al.* 1993; Merchant-Larios, *et al.* 1993; Tilmann *et al.* 2002) y también se ha visto que la interacción de las células migratorias y las células precursoras de soporte juegan un papel en el establecimiento del destino de Sertoli (Tilmann, *et al.* 1999). Ello nos hizo pensar en la posibilidad de que en respuesta a *Dhh* se expresara algún miembro de esta vía de señalización en el mesonefros. Para ello analizamos mesonefros de machos de 12.5 dpc donde se encontró que se expresaba *Ptc1*, *Ptc2*, *Gli1* y *Gli3* (figura 16).

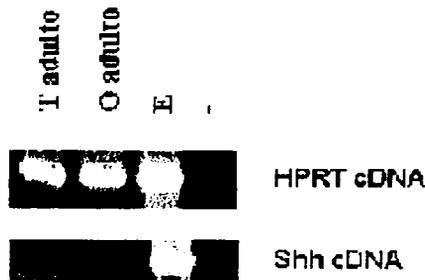


Figura 15. RT-PCR de *Shh* en cDNA de testículo y ovario adultos. T = testículo, O = ovario. Control positivo se amplificó *Shh* en cDNA de embrión (E) de 16.5dpc, control negativo (-) coctel de reacción sin templado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

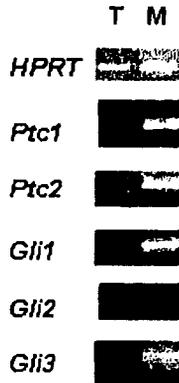


Figura 16. RT-PCR de los miembros de *Dhh* en Testículo y Mesonefros de 12.5 dpc. T = testículo y M = mesonefros. Se usaron 6 pares de gónadas y mesonefros.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue generar un ratón transgénico que expresara el gen *Shh* -mimetizando a *Dhh* - en ovarios de ratones. Para ello se planeó utilizar la región regulatoria del gen *Dax1* la cual era capaz de dirigir la expresión de este gen en el ovario (Narváez, 1996). El motivo de la generación del ratón transgénico mencionado era el poder estudiar el efecto de la acción de *hedgehog* en la gónada indiferenciada. Nuestro interés se justificaba esencialmente por tres observaciones: la primera era que *Dhh* inicia su expresión en la gónada embrionaria indiferenciada a partir del día 11.5 del desarrollo; la segunda era que el ratón nulo para *Dhh* presenta defectos en la espermatogénesis desde etapas tempranas; y la tercera era que el dimorfismo sexual de las células germinales en la gónada embrionaria de ratón ocurre a los 13.5 dpc. Dicho dimorfismo se manifiesta en el ratón macho por la entrada en reposo mitótico de las CGP; y en gónadas de hembras, por la entrada a meiosis. Por todo lo anterior pensamos en la posibilidad de que *Dhh* era el gen encargado de la entrada en reposo mitótico o de la inhibición de la meiosis en las CGP de machos. Si este era el caso, el ratón transgénico proyectado nos daría una respuesta inequívoca.

Obtuvimos un ratón transgénico, del cual se confirmó también la presencia del transgén deseado. Sin embargo, en este ratón, se demostró que el transgén no era transcripcionalmente activo; por lo cual, la línea transgénica no nos fue de utilidad. Para descartar la posibilidad de que la construcción que se introdujo en el ratón tuviera algún defecto intrínseco (como una mutación o delección) tal que no fuera funcional, se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR en células embrionarias cultivadas y de esta manera, se pudo constatar que la construcción si se transcribía en éstas células. Por lo tanto, el silenciamiento observado en la línea transgénica obtenida, muy probablemente se debió al sitio de inserción del transgén en el genoma; es decir, se sabe que en eucariotes, algunas regiones del genoma presentan una estructura compactada de la cromatina en ciertos estadios del desarrollo o en órganos específicos, la cual es incompatible con la actividad transcripcional (Kioussis, *et al.* 1997). Suponemos que, lamentablemente, el pDSA se insertó en una de estas regiones. A pesar de los numerosos intentos posteriores para producir otra línea transgénica con las características deseadas, no nos fue posible encontrar otro ratón positivo.

Si bien es común que un inserto transgénico quede ubicado en regiones genómicas silenciadas, resulta extraño que sólo se haya podido producir un ratón positivo con estas características. Al respecto, debe mencionarse que aunque inicialmente la región regulatoria de *Dax1* que se utilizó, se consideraba específica y exclusiva de la gónada; en experimentos posteriores del laboratorio del Dr. Robin Lovell-Badge, se encontró que esta región regulatoria era también activa en el blastocisto (Comunicación personal Dra Verónica Narváez). Por lo tanto, una explicación es que la expresión de *Shh* en el blastocisto transgénico fuera letal para el embrión. Esto explicaría la baja eficiencia de la microinyección, así cómo es que se hubiera seleccionado un ratón sin actividad transcripcional. Sin embargo, esta hipótesis no se comprobó y sigue siendo factible que un problema de carácter técnico explique la incapacidad de obtener el ratón deseado.

Independientemente de este resultado, consideramos que aún sería importante obtener el ratón transgénico originalmente proyectado. Ciertamente en el transcurso de este proyecto mucho han aportado otros grupos en relación al conocimiento del papel de *Dhh* en el desarrollo de la gónada masculina. Los descubrimientos relacionados con su función en la gónada, han procedido de manera errática, debido a que los defectos observados en la mutante de *Dhh* han sido variables dependiendo del fondo genético. Por ejemplo, ya antes describimos, que el "knockout" obtenido originalmente por el grupo de Bitgood y colaboradores (1996) -que fue el trabajo con el que fundamentamos nuestra hipótesis- reveló que el papel de *Dhh* era estrictamente sobre las células espermatogénicas y no tenía ningún efecto sobre las células somáticas tales como las células de Leydig u otros tipos peritubulares. Sin embargo, en un trabajo posterior (Pierucci-Alves, *et al.* 2001), en el que se analizaron las mutantes de *Dhh* después de haberlas transferido del fondo genético correspondiente a la cepa 129/*sv*, al fondo C57BL/6 y al *Swiss Webster*, se observó que había defectos importantes en el desarrollo del linaje miode peritubular que conducían a una formación anormal de los cordones y a la pérdida consecuente de las células de Leydig. Dado que las células peritubulares contribuyen a la formación de la lámina basal durante la organogénesis del testículo, se concluyó de manera imprecisa, que el papel central de *Dhh* era modular la formación de la lámina basal, quizá regulando la producción de fibronectina y colágena en las células peritubulares (Pierucci-Alves, *et al.* 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Más recientemente (Hung-Chang, *et al.* 2002), quedó finalmente demostrado que *Dhh* especifica el destino de las células de Leydig. Esto se definió al observar, por un lado, que las gónadas de macho provenientes del ratón nulo *Dhh*^{-/-} no tienen expresión de la enzima "P450 side chain cleavage" que es un marcador típico de las células de Leydig; y por otro lado, al demostrarse que las células somáticas en la gónada no tenían alteraciones en sus propiedades de proliferación y sobrevivencia, ni en sus propiedades migratorias (ya que se sabe que parte de las células de Leydig podrían ser aportadas desde el mesonefros), por lo que se concluyó que el efecto de *Dhh* era sobre la diferenciación de los precursores y la determinación de la identidad del linaje de Leydig (Hung-Chang, *et al.* 2002).

De todo lo anterior queda claro que la hipótesis original de este trabajo se había basado en datos incorrectos. Ahora sabemos que en el periodo embrionario, *Dhh* no actúa sobre las células germinales, sino sobre los tipos somáticos. No obstante a pesar de esta diferencia, tenemos ahora información suficiente para especular respecto a lo que hubiéramos observado al expresar *Dhh* transgénicamente en la gónada indiferenciada XX. En relación a ello es interesante señalar que dado que *Dhh* es uno de los primeros genes que se expresan en respuesta a *Sry* es probable que su expresión temprana en la gónada de hembra hubiera conducido a la formación de células de Leydig en hembra y por lo tanto a la producción del *Sf-1*, cuya actividad hubiera conducido a una masculinización de la gónada. El determinar si esto sucedía hubiera sido muy interesante, ya que actualmente se desconoce el origen de las células de Leydig y se especula al respecto (Clark, *et al.* 2000; Pierucci-Alves, *et al.* 2001; Hung-Chang, *et al.* 2002), que sus precursores podrían estar presentes en forma de células pluripotentes derivadas del epitelio celómico, con capacidad para producir distintos tipos somáticos dependiendo de la influencia que reciban. En oposición a esta idea también se ha sugerido que los precursores de Leydig, tienen un origen común con las células esteroideas de la adrenal y que migran desde una región anterior del mesonefros, hacia la gónada. Por lo tanto, si *Dhh* hubiera sido capaz de producir células de Leydig en hembras, se hubiera determinado que en la gónada indiferenciada existen células pluripotentes capaces de responder a la señal de *hedgehog*, y que estas señales son suficientes para determinar el destino de Leydig. En razón de estos argumentos, pensamos que de haberse obtenido un

ratón transgénico con las características deseadas se hubiera podido contribuir al conocimiento de la organogénesis del testículo embrionario.

Otro aspecto importante de este trabajo, es el que se refiere a la determinación de la expresión de genes que se activan en respuesta a *hedgehog*. Nuestra expectativa era que a través de experimentos de RT-PCR pudiéramos determinar cual de los 2 receptores *Patched* descritos en ratón era el iniciador de la respuesta, e igualmente pudiéramos identificar cual de los genes *Gli* era mediador de los efectos de *hedgehog* en la gónada. Esta última pregunta era en particular interesante ya que como se mencionó en la Introducción, sabemos que las proteínas *Gli* actúan en forma contexto-específica y de manera combinatoria. Sin embargo, aún no ha sido posible establecer asociaciones entre la combinación de genes y sus actividades celulares específicas (repressoras o activadoras). Como se describió anteriormente, el ratón nulo de *Dhh* presenta anomalías indicativas de la heterogeneidad de acciones de *Dhh* a lo largo de las diferentes etapas del desarrollo del testículo. Primero, en la gónada embrionaria, como ya se discutió, participa en la diferenciación de las células de Leydig; y posteriormente, en periodos postnatales, tiene un papel en la sobrevivencia de las espermatogonias y, finalmente, en la diferenciación de las espermátidas. Por ello es importante caracterizar las combinaciones de *Gli* que están operando a lo largo de cada una de las funciones que tiene *Dhh* en el testículo, y asociarlas a respuestas celulares específicas. Se habían hecho estudios de la expresión de los genes *Ptc* y *Gli* en el testículo postnatal, pero no en el período embrionario.

Los experimentos de RT-PCR nos permitieron detectar transcritos correspondientes a los genes *Ptc1*, *Ptc2* solo a partir de 15.5 dpc en la gónada XY y de los tres genes *Gli* a partir de 16.5 dpc. Sin embargo, pudimos detectar los mensajeros de todos estos genes a excepción del de *Gli3* desde 12.5 dpc, en el mesonefros. En principio resulta paradójico el no haber logrado amplificar estos transcritos de la gónada en 12.5 dpc ya que sabemos que *Dhh* empieza a expresarse desde 11.5 dpc; además sabemos que las células de Leydig empiezan a producirse desde 12.5 dpc, lo cual implica que la actividad de *Dhh* se inicia antes de este momento. Una posible explicación que se le podría dar este resultado es que, en la gónada se producen los mensajeros mencionados en muy poca cantidad y, dado que nosotros utilizamos gónadas únicas en nuestro ensayo, nuestra

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sensibilidad podría estar por debajo de los límites de detección. Sin embargo, si fuimos capaces de detectar la presencia de los mensajeros en el mesonefros de la misma etapa, así como otros mensajeros control, lo que indica que nuestro ensayo tubo una eficiencia razonable.

La presencia de los mensajeros de la vía de *Dhh* en el mesonefros es significativa, ya que ningún miembro de *hedgehog* se expresa en el mesonefros en este momento, y por lo tanto se sugiere que *Dhh* induce la expresión de estos mensajeros tanto en la gónada como en el mesonefros, y que la respuesta inicial es mayor en este último. Esto sería consistente con la idea de que las células de Leydig, en buena proporción, derivan de células que migran desde el mesonefros y que previo a esta migración, se inicia la traducción de los miembros de la cascada. Por otro lado, también explicaría que pueda iniciarse la diferenciación de las células de Leydig sin que haya mensajeros detectables por RT-PCR en la gónada. Nuestros resultados coinciden totalmente con los que se presentan en el reporte de Hung-Chang, *et al* (2002), en el sentido de que también en este artículo se detecta primero la expresión de *Patched1* en el mesonefros y sólo un día después en la gónada, y la señal en mesonefros es en todo momento mucho mas intensa que en la gónada. A diferencia de nuestro trabajo, en ese reporte, la expresión de *Ptc1* se detecta como actividad de β -galactosidasa, pues se utiliza una gónada transgénica XY en la que se insertó el gen *LacZ* dentro del locus del gen *Ptc1*; esto es, sus mediciones corresponden a la presencia de la proteína. Otra diferencia es que ellos hacen detección *in situ* por lo que su ensayo tiene mayor sensibilidad.

Respecto al interés que originalmente motivaron nuestras determinaciones de RT-PCR, debemos decir que lamentablemente el resultado obtenido no resultó tan informativo como se esperaba. Esto es debido a que nuestra expectativa era encontrar un perfil discreto de expresión de los miembros de la cascada, el cual podría haber sido distinto al que se ha determinado en periodos postnatales. Un resultado así, hubiera permitido una asociación muy simple de una proteína *Gli* a una función. Sin embargo, como se mencionó, todos los mensajeros de *Ptc* y *Gli* aparecen al mismo tiempo. Las interpretaciones que pueden hacerse de estos datos son diversas, probablemente se esté induciendo la expresión de todos ellos y sería una regulación a otro nivel quién determine la participación de cada una de las proteínas. También podría ser que en efecto todos los genes estudiados estén

PROCES CON
FALLA DE ORIGEN

involucrados en los efectos iniciales de *Dhh* en la gónada embrionaria. De acuerdo a nuestros resultados, la expresión de *Ptc1* y *Ptc2* no va a la par, mientras *Ptc1* llega a un máximo al día 16.5, el máximo de *Ptc2* sería en el día 17.5. Así mismo, la proporción de los 2 mensajeros parece diferente. Por otro lado, aunque las proteínas *Gli* se expresaran desde el día 16.5, es la forma de *Gli2* quien se presenta en mayor proporción. Todo esto parece sugerir una fina regulación a nivel de inducción de la transcripción en respuesta a *Dhh*. Probablemente, eventos a nivel traduccional o postraduccional tengan una participación importante en la producción de las formas activadoras o represoras, en un momento en particular. También se ha observado que *Gli1* puede encontrarse en el citoplasma o translocarse al núcleo por lo que este nivel de regulación también es factible (Kroft, et al. 2001). Para lograr un mayor entendimiento de qué proteínas *Gli*, y en que forma participan en la diferenciación de las células de Leydig sería necesario poder determinar su estado funcional *in vivo*, así como determinar si se encuentran procesadas como receptores o activadores. Este tipo de determinaciones no son posibles por el momento ya que no se conocen anticuerpos que puedan distinguir isoformas o estados de fosforilación para estas proteínas. Un enfoque que seguramente será de gran utilidad es el análisis mutacional de las proteínas *Gli* en gónadas en cultivo. Muchas mutantes nulas de *Gli* en ratón ya existen, por lo tanto muy pronto podrán realizarse este tipo de experimentos.

Finalmente otra de las observaciones interesantes de nuestro análisis de RT-PCR es el inicio de la expresión de todos los mensajeros *Gli* y *Ptc* en la gónada de hembra a partir del nacimiento, o en el final del periodo de gestación. Creemos que esta expresión es inducida por *Shh* a larga distancia, a partir de órganos vecinos, o a través del tejido vascular. En concordancia con nuestros datos, se reportó la presencia de RNAm de *Sufu* en ovarios adultos (Stone, et al. 1999). Este resultado nuevamente parece sugerir que la simple presencia de cualquiera de los genes *hedgehog* puede inducir la expresión de todos los mensajeros de la vía, y que la selección de aquellos que participan en respuestas específicas, ocurre por mecanismos postraduccionales.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:

- Se logró obtener una línea de ratones transgénicos, que sin embargo no expresó el transgén deseado.
- Los experimentos de expresión transitoria de la construcción pDSA en células totipotenciales "ES" demostraron que el transgen es funcional.
- En el transcurso de este trabajo, otro grupo determinó la importancia de *Dhh* en la diferenciación de las células de Leydig. Sus resultados validan la utilidad del ratón transgénico con expresión de *Dhh* en gónadas de hembras como un modelo que sería de utilidad en el entendimiento de la diferenciación de los tipos somáticos de la gónada indiferenciada
- Los análisis de expresión por RT-PCR de algunos de los miembros de la vía de señalización de *Hedgehog* mostraron que en machos, la expresión de *Ptc1* y *Ptc2* desde los 15.5 dpc, y de *Gli1*, *Gli2* y *Gli3* desde los 16.5 dpc. La presencia de los mensajeros de todas las subunidades de *Ptc* y *Gli* en la gónada sugiere que un procesamiento postraduccional determina la participación de los miembros específicos de la vía.
- En estudios futuros sería interesante hacer un análisis inmunohistoquímico de los miembros de la vía de transducción de *Dhh* en la gónada así como estudiar los efectos sobre la testiculogénesis, de mutaciones de pérdida y ganancia de función para las proteínas *Gli*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- **Alcedo J, Noll M, Von Ohlen T, Hooper JE.** (1996). The *Drosophila* smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for Hedgehog signal. *Cell* 86; 221-232.
- **Anderson R, Copeland TK, Schoëler H, Heasman J, Wylie C.** (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development.* 91, 61 – 68.
- **Aza-Blanc P, Kornberg TB.** (1999). Ci a complex transducer of the Hedgehog signal. *Trends in Genetics.* 15, 458 – 462.
- **Aza-Blanc P, He-Ying Lin, Ruiz i Altaba A, Kornberg TB.** (2000) Expression of the vertebrate Gli proteins in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* 127, 4293-4301.
- **Barboux SP, Niaudet MC, Gubler JP, Grunfeld F, Jaubert F, Kuttenn CN, Fekete N., Souleyreau-Therville E, Thibaud M, Fellous M., McElreavey K.** (1997). Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet.* 17, 467–470.
- **Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M.** (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.* 7, 497–501.
- **Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J, Wylie C.** (1998). The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 9, 393-400.
- **Bishop C, Whitworth D, Qin Y, Agoulnik A, Agoulnik I, Harrison W, Behringer R, Overbeek P.** (2002). A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Gen.* 26, 490-494.
- **Bitgood MJ, McMahon AP.** (1995). *Hedgehog* and *Bmp* Gene Are Coexpressed at Many diverse Sites of Cell-Cell Interaction in the Mouse Embryo. *Development Biology.* 172, 126-138.
- **Bitgood, MJ, Shen L, McMahon AP.** (1996). Sertoli cell signaling by Dhh regulates the male germ line. *Current Biology.* 6, 298-304.
- **Brennan J, Karl J, Martineau J, Nordqvist K, Schmahl J, Tilmann C, Ung K, Capel B.** (1998). Sry and the Testis: Molecular Pathways of Organogenesis. *The Journal of Experimental Zoology.* 281, 494-500.
- **Buehr M, Gu S, McLaren A.** (1993). Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development.* 117, 273-281.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, De Sauvage FJ.** (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 13630-13634
- **Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA.** (1996). *Nature.* 383, 407 – 413.
- **Chunyang BB, Joyner AL.** (2001) Gli1 can rescue the in vivo function of Gli2. *Development* 128, 5161-5172.
- **Chomczynski and Sacchi** (1987). *Anal. Biochem.* 162, 156.
- **Clark AM, Garland KK, Russell LD.** (2000). Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of Reproduction.* 63; 1825-1838.
- **Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz I Altaba A.** (1997). Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signaling pathway in skin tumours. *Nature.* 389, 876-881.
- **Ding Q, Fukam S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H. A. Dlugosz, M. Nakafuku, Hui C.** (1999). Mouse Suppressor of fused is a negative regulator of Sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Current Biology.* 9,1119–1122.
- **Echerlard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon AP.** (1993) Sonic Hedgehog, a Member of a Family of Putative Signaling Molecules, Is Implicated in the Regulation of CNS Polarity. *Cell.* 75, 1417 - 1430.
- **Foster J.** (1996). The Genetics of Gonadal Differentiation. *Topical of Endocrinology.* 3, 7-10.
- **Franz T.** (1994). Extra-Toes (Xt) homozygous mutant mice demonstrate a role for the Gli-3 gene in the development of the forebrain. *Acta Anat.* 150, 38-44.
- **García-Castro M, Narváez V.** (1996). Embryology and sexual differentiation of the genital system. *Endocrinology.* 3, 3-7.
- **Ginsburg M, Snow M, McLaren A.** (1990). Primordial Germ cell in the mouse embryo during gastrulation. *Development.* 110, 521-528.
- **Grindley JC, Bellusci S, Perkins D, Hogan BL.** (1997). Evidence for the involvement of the Gli gene family in embryonic mouse lung development. *Dev. Biol.* 188, 337-348.
- **Griswold MD.** (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 9, 411-416.
- **Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP.** (1996). Conservation of the *hedgehog/patched* signaling pathway from flies to mice:

induction of a mouse *patched* gene by Hedgehog. *Genes and Development* 10, 301 – 312.

- **Goodrich LV, Scott MP.** (1998). Hedgehog and Patched in Neural Development and Disease. *Neuron*. 21, 1243-1257.
- **Grove EA, Tole S, Limon J, Yip L, Ragsdale CW.** (1998). The hem of the embryonic cerebral cortex is defined by the expression of multiple Wnt genes and is compromised in Gli3-deficient mice. *Development* 125, 2315-2325.
- **Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R.** (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically Expressed genes. *Nature*. 346, 245-250.
- **Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R.** (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*. 121, 1603-1614.
- **Hammerschmidt M, Brook A, McMahon AP.** (1997). The world according to hedgehog. *Trends in Genetics*. 13, 14-21.
- **Haqq CM, King C, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA.** (1994). Molecular Basis of Mammalian Sexual Determination: Activation of Mullerian Inhibiting Substance Gene Expression by SRY. *Science*. 266, 1494-1500.
- **Hatano, Takakusu T, Amura T, Morohashi K.** (1994). Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120, 2787–2797.
- **Heberlein U, Wolff T, Rubbin GM.** (1993). The TGF beta homolog *Dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell*. 75, 913-926.
- **Hoyle C, Narvaez V, Alldus G, Lovell-Badge R, Swain A.** (2002). Dax1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. *Mol. Endocrinol.* 4, 747-756.
- **Hung-Chang HY, Whoriskey W, Capel B.** (2002) Desert Hedgehog / Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes & Development*. 16, 1433 –1440.
- **Hui CC, Joyner AL.** (1993). A mouse model of greig cephalopolysyndactyly syndrome: the extra-toes mutation contains an intragenic deletion of the Gli3 gene. *Nature Genetics*. 3, 241-246.
- **Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL.** (1994). Expression of Three Mouse Homologs of the *Drosophila* Segment Polarity Gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in Ectoderm and Mesoderm-Derived Tissues Suggests Multiple Roles during Postimplantation Development. *Dev. Biol.* 162, 402-413.

- **Incardona JP, Eaton S.** (2000). Cholesterol in signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology.* 12, 193 – 203.
- **Ingham PW, Nystedt S, Nakano Y, Brown W, Stark D, van den Heuvel M, Taylor AM.** (2000). Patched represses the Hedgehog signaling pathway by promoting modification of the Smoothed protein. *Current Biology.* 10. 1325-1318.
- **Ingham PW, McMahon AP.** (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes and Development.* 15, 3059-3087.
- **Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL.** (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8, 654–62.
- **Jensen AM, Wallace VA.** (1997). Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development.* 124, 363-371.
- **Joshua J, Meeks J, Crawford SE, Russell TA, Morohashi KI, Weiss J, Jameson JL.** (2003). Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development.* 130, 1029-1036.
- **Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, Xavier F.** (1998) Molecular and Cellular Endocrinology. 145, 3-7.
- **Jost A.** (1947). Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Archs Anat Microse Morph. Exp.* 36, 271-315.
- **Keith L. P, Schedl A, Schimmer B P.**(1999). Gene Interactions in Gonadal Development. *Annu. Rev. Physiol.* 61,417–33.
- **Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P.** (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development.* 122, 2813-2822.
- **Kinzler KW.** (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science.* 236, 70-73.
- **Kopp P.** (1999). Targeted disruption of the *Ahch (Dax-1)* gene: Knockout of old concepts. *European Journal of Endocrinology.* 140, 291-292.
- **Koopman P, Munsterberg a, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R.** (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature.* 338, 450-452.
- **Kroft TL, Patterson J, Yoon JW, Doglio L, Walterhouse DO, Iannaccone PM, Goldberg R.** (2001) GLI1 Localization in the Germinal Epithelial Cells Alternates Between Cytoplasm and Nucleus: Upregulation in Transgenic Mice Blocks spermatogenesis in Pachytene. *Biology of Reproduction.* 65, 1663-1671.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Kioussis D, Festenstein R.** (1997). Locus control regions: overcoming heterochromatin induced gene inactivation in mammals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 614-619.
- **Kumar S, Balczarek KA, Lai ZC.** (1996). Evolution of the hedgehog Gene Family. *Genetics.* 142, 965-972.
- **Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL.** (1994). Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Germline Development. Ciba Foundation Symposium.* 182, 157-178.
- **Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA.** (1994). Autoproteolysis in *hedgehog* Protein Biogenesis. *Science.* 266, 1528-1537.
- **Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP.** (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell.* 105, 599-612.
- **Luo X, Ikeda Y, Parker KL.** (1995). The cell-specific nuclear receptor steroidogenic factor 1 plays multiple roles in reproductive function. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 350, 279-283.
- **Luo X, Ikeda Y, Parker KL.** (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and for male sexual differentiation. *Cell* 77:481-90.
- **Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ.** (1996-a). Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature.* 384, 176 - 179.
- **Marigo V, Tabin CJ.** (1996-b) Regulation of Patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9346-51.
- **Marshall GJA.** (1998). Integrations between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *BioEssays* 20.3, 264-269.
- **Masafumi I, Yu R, Jameson JL.** (1997). DAX-1 Inhibits SF-1 Mediated Transactivation via a Carboxy-Terminal Domain That Is Deleted in Adrenal Hypoplasia Congenita. *Molecular and Cellular Biology.* 17, 1476-1483.
- **Martineau J, Nordqvist K, Tilamnn C, Lovell-Badge R, Capel B.** (1997). Male specific cell migration into the developing gonad. *Current Biology.* 7, 958-968.
- **Martínez JA.** (2000). Construcción de un vector para la expresión de Sonic hedgehog en el ovario de animales transgénicos. Universidad Veracruzana-IBT UNAM. Tesis de Licenciatura.
- **Matsui Y.** (1998) Regulation of germ cell death in mammalian gonads. *APMIS.* 106, 142-148.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Matise MP, Joyner AL.** (1999). Gli genes in development and cancer. *Oncogene*. 18, 7852-7859.
- **McLaren A.** (1984). Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 38, 7-23.
- **McLaren A.** (1992). Development of primordial germ cells in the mouse. *Andrologia*, 24, 243-247.
- **McLaren A, Southee D.** (1997). Entry of Mouse Embryonic Germ Cells into Meiosis. *Developmental Biology*. 187, 107-113.
- **McMahon AP.** (2000). More Surprises in the Hedgehog Signaling Pathway. *Cell*. 100, 185 - 188.
- **Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M.** (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *International Journal of Developmental Biology*. 37, 407-415.
- **Méthot N, Basler K.** (2001). An Absolute requirement for Cubitus interruptus in Hedgehog signaling. *Development*. 128, 733-742.
- **Mishina Y, Rey R, Finegold MJ, Matzuk MM, Josso N, Cate RL, Behringer RR.** (1996). Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes & Development*. 10, 2577-2587.
- **Mo R, Freer AM, Zinyk DL, Crackower MA, Michaud J, Heng HH, Chik KW, Shi XM, Tsui LC, Cheng SH, Joyner AL, Hui C.** (1997). Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development*. 124, 113-123.
- **Monnier V, Sokh, Saniel M, Scott MP, Plessis A.** (2002). Hedgehog signal transduction proteins: contacts of the Fused kinase and Ci transcription factor with the Kinesin-related protein Costal2. *BMC Developmental Biology*. 2:4 1-9.
- **Mohler J.** (1988). Requirements for *hedgehog*, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics*. 120, 1061-1072.
- **Motoyama, J; Llu, J; Mo, R; Ding, Q; Post, M; and Hui, C.C.** (1998). Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nature Genet*. 20, 54-57
- **Murone M, Rosenthal A. de Sauvage F.J.** (1999). Hedgehog Signal Transduction: From Flies to Vertebrates. *Experimental Cell Research*. 253, 25 - 33.
- **Muscатели F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Récan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, Schcarz HP, Kaplan JC, Camerino G, Meitinger T, Monaco AP.** (1994). Mutations in the *DAX-1* gene give rise to both

TRIPS CON
FALLA DE ORIGEN

X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature*. 372, 672-676.

- **Narvaez V.** (1996). Expression and regulation of sex determining genes in the mouse. Thesis, Univ. London.
- **Nachtigal M, Hirokawa W, Enyeart-VanHouten Y, Flanagan DL, Hammer JN, Ingraham HA.** (1998). Wilm's Tumor and Dax-1 Modulate the Orphan Nuclear Receptor SF-1 in Sex-Specific gene Expression. *Cell*. 93, 445-454.
- **Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 287; 795-801.
- **Ohkubo Y, Shirayoshi Y, Nakatsuji N.** (1996). Autonomous regulation of proliferation and growth arrest in mouse primordial germ cells studied by mixed and clonal cultures. *Experimental Cell Research*. 22, 291-297.
- **Oldakr M, Grzela T, Lazarczyk M, Malejczyk J, Skopinski P.** (2001). Clinical aspects of disrupted Hedgehog signaling. *International Journal of Molecular Medicine* 8, 445-452.
- **Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL.** (2000). Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 127, 1593-1605.
- **Parker KL, Schedl A, Schimmer BP.** (1999). Gene Interactions In Gonadal Development. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 417-433.
- **Parmantier E, Lynn B, Lawson D, Turmaine M, Namini S, Chakrabarti L, McMahon AP, Jessen K, Mirsky R.** (1999). Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths. *Neuron* 23, 713 - 724.
- **Pearse II RV, Collier LS, Scott MP, Tabin CJ.** (1999). Vertebrate Homologs of *Drosophila* Suppressor of Fused Interact with the Gli Family of Transcriptional Regulators. *Developmental Biology*. 212, 323-336.
- **Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D.** (1991). Expression of the Wilms' tumor gene *WT1* in the murine urogenital system. *Genes & Dev.* 5, 1345-1356.
- **Persengiev SP, Kondova II, Millete CF, Kilpatrick DL.** (1997). *Gli1* family members are differentially expressed during the mitotic phase of spermatogenesis. *Oncogene*. 14, 2259-2264.
- **Pierucci-Alves F, Clark AM, Russell LD.** (2001). A Developmental Study of the Desert Hedgehog-Null Mouse Testis. *Biology of Reproduction*. 65, 1392-1402.
- **Reddy JC, Licht JD.** (1996). The *WT1* Wilms' tumor suppressor gene: How much do we really know? *Biochim. Bio-phys. Acta*. 1287, 1-28.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Ruppert JM, Vogelstein B, Arheden K, Kinzler KW.** (1990). GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Mol. Cell Biol.* 10, 5408-5415.
- **Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA.** (1995). Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92,10939-43.
- **Schimmang T, Lemaistre M, Vortkamp A, Ruther U.** (1992). Expression of the zinc finger gene Gli3 is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development* 116, 799-804.
- **Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R.** (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 346, 240-244.
- **Sisson JC.** (1997). Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog/Patched signaling pathway. *Cell.* 90, 235-245
- **Sharma PM, Bowman M, Madden S, Rauscher III FJ, Sukumar S.** (1994). RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, *WT1*. *Genes & Dev.* 8: 720-731.
- **St Jacques B, Dassule H, Karavanova I, Botchkarev V, Li J, Danielian P, McMahon J, Lewis P, Paus R, McMahon A.** (1998). Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr.Biol.* 8,1058 -1068.
- **Stone DM, Murone M, Luoh SM, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A.** (1999). Characterization of the human Suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *Journal of Science.* 112, 4437-4448.
- **Suji-Pathi, Pagan-Westphal S, Baker D, Garber E, Rayhorn P, Bumcrot D, Tabin C, Pepinsky PB, Williams KP.** (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Sonic hedgehog. *Mechanisms of Development.* 106, 107-117.
- **Swain A, Zanaria E, Hacker A, Lovell-Badge R, Camerino G.** (1996). Mouse *Dax1* expression is consistent with a role in sex determination as in adrenal and hypothalamus function. *Nature Genetics*, Vol 12, april 1996, 404-409.
- **Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R.** (1998). *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature.* 391, 761-767.
- **Swain A, Lovell-Badge R.** (1999). Mammalian sex determination: a molecular drama. *Gen. Dev.* 7, 755-767.
- **Tabin CJ, McMahon AP.** (1997). Recent advances in Hedgehog signalling. *Trends in Cell Biology.* Vol 7. 442-446.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Teleman A, Cohen S.** (2000) .Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell*, 103 , 971-980.
- **Tilmann C, Capel B.** (2002). Cellular and Molecular Pathways Regulating Mammalian Sex Determination. *Recent. Prog. Hum. Res.* 57, 1-18.
- **Tilmann C, Capel B.** (1999). Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development.* 126, 2883-2890.
- **Van der Heuvel M, Ingham RN.** (1996) Smoothed encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signaling. *Nature* 382; 547-551.
- **Vidal V, Chaboissier MC, Rooij DG, Schedl A.** (2001). Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Gen.* 28, 216-217.
- **Vilain E, Edward R, McCabe B.** (1998). Mammalian sex determination, from gonads to brain. *Molecular Genetics and Metabolism.* 65, 74-84.
- **Von Mering C, Basler K.** (1999). Distinct and regulated activities of human Gli proteins in *Drosophila*. *Current Biol.* 9, 1319-1322.
- **Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ.** (1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein *Science.* 2;273(5275):613-622.
- **Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Hled M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustern E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G.** (1994). Autosomal, Sex Reversal and Campomelic Dysplasia Are Caused by Mutations in and around the SRY - Related Gene SOX9. *Cell.* 79, 1111-1120 .
- **Weed M, Mundlos S, Olsen B.R.** (1997) The role of sonic hedgehog in vertebrate development. *Matrix. Biol.* 16(2), 53-58.
- **Wicking C, Smyth I, Bale A.** (1999). The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene.* 55, 7844-51.
- **Williams KP, Rayhorn P, Chi-Rosso G, Garber EA, Strauch KL, Horan GSB, Reilly JO, Baker DP, Taylor FR, Koteliensky V, Pepinsky B.** (1999). Functional antagonists of sonic hedgehog reveal the importance of the N terminus for activity. *Journal of Cell Science.* 112, 4405-4414.
- **Wylie C.** (1999). Germ Cells. *Cell.* 96, 165-174.
- **Xunrong L, Yayoi I.** (1990). The cell-specific nuclear receptor steroidogenic factor 1 plays multiple roles in reproductive function; *Phil. Trans. R. Soc. London. B.* 350, 279-283.



- **Ying Ying, Guang-Quan Z.** (2001). Cooperation of Endoderm-Derived BMP2 and Extraembryonic Ectoderm-Derived BMP4 in Primordial Germ Cell Generation in the Mouse. *Developmental Biology*. 232, 484-492.
- **Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson L.** (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nature*, 20; 353-357.
- **Yu RN, Achermann JC, Ito M, Jameson L.** (1998). The role of DAX-1 in Reproduction. *TEM*, 9; 169-174.
- **Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ERB, Meltinger T, Monaco AP, Sassone-Corsi P, Camerino G.** (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*. 372, 635-641.
- **Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P.** (1997). DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*. 390, 311-315.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN