



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“EXPRESIÓN DEL GEN SOX9 EN TESTÍCULO DE RATA
PRIVADO DE LA LÍNEA GERMINAL”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
MARÍA DE LA LUZ MOLINA CERÓN**



TUTOR: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

2006

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**



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.

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

División de Estudios Profesionales

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:
"Expresión del gen Sox9 en testículo de rata privado de la línea germinal"

realizado por María de la Luz Molina Cerón

con número de cuenta 09200263-2, quien cubrió los créditos de la licenciatura en
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Tutor (a)
Propietario

Dr. Horacio Merchant Larios

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza

Suplente

Dra. María Irma Villalpando Fierro

Suplente

Biól. José Aquiles Bernal Moreno

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 14 de Noviembre
CONSEJO DEPARTAMENTAL DE BIOLOGÍA

Dr. Zenón Cano Santana

del 2006.



*A la memoria de mi abuelo
Pánfilo Molina Alcocer*

A mis padres...

Las palabras no son suficientes para expresar toda la admiración y el agradecimiento que siento hacia ustedes. El camino hasta aquí no ha sido sencillo y a pesar de eso, siempre han estado a mi lado, brindándome toda la confianza y la comprensión que he necesitado. Gracias por su ejemplo, por su infinito cariño y por traerme hasta aquí.

A mi hermano...

Me has enseñado más cosas de las que puedes imaginar, desde que llegaste has llenado mi vida de alegría con tu compañía. Gracias por estar conmigo, por apoyarme y por ese gran cariño que nos une. Eres un GRAN hermanito.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Horacio Merchant Larios por depositar su confianza en mí y darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutela. Por sus enseñanzas, su paciencia y por mostrarme su visión de la ciencia y la investigación.

A mis sinodales: Dr. Luis Felipe Jiménez, Dra. Norma Moreno, Dra. Irma Villalpando y Biól. Aquiles Bernal, por el tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis y por enriquecer este trabajo con sus valiosas sugerencias.

Al Sr. José Guadalupe Baltazar por su apoyo técnico en la obtención de cortes semifinos y por su incansable labor en el laboratorio.

A la C. a Dr. Verónica Díaz por proporcionarme el anticuerpo para SOX9. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo y por el apoyo brindado en todas las etapas de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio Brenda, Verónica, Alejandro y Ricardo por su paciencia y por la buena disposición que siempre tuvieron para explicarme y ayudarme a esclarecer mis dudas.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez y a sus estudiantes por la accesibilidad y las facilidades otorgadas en el desarrollo de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias por tantas experiencias y anécdotas que me acompañarán el resto de mi vida.

A Rosalva, por enseñarme que el tiempo y la distancia no importan cuando existe una amistad verdadera.

A Ana Lilia, por esa conexión tan especial que nos ha unido desde siempre y que se reafirma constantemente.

A Marisoco, por ser pieza fundamental en la búsqueda de mí misma y por aceptarme tal y como soy. No cambiaría ninguna de las experiencias que hemos compartido.

A Héctor, a quien dedico mis esfuerzos de cada día, gracias por tu comprensión, por tu apoyo incansable y por formar parte de mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	
DESARROLLO DEL TESTÍCULO.....	2
CÉLULAS DE SERTOLI.....	5
ESPERMATOGÉNESIS.....	7
LOS GENES SRY Y SOX9.....	11
BUSULFÁN. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVO.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	26
MICROSCOPIA DE CORTES SEMIFINOS.....	26
INMUNOFLOURESCENCIA.....	26
RT-PCR.....	28
FIGURAS.....	29
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA.....	41

RESUMEN

La proteína SOX9, producto de la expresión del gen SOX9, actúa como factor de transcripción, indispensable para la diferenciación de la gónada en los mamíferos. Se expresa en las células precursoras de Sertoli en la gónada fetal y permanece expresándose en las células de Sertoli durante el resto de la vida del animal. Aunque conocemos el papel del gen SOX9 al inicio de la diferenciación sexual de la gónada de los mamíferos, su función en la etapa postnatal del testículo no se ha descrito. Considerando los bien establecidos niveles hormonales de la rata en las etapas infantil, púber y adulta, así como la íntima asociación anatómica y funcional existente entre las células germinales y las de Sertoli durante la espermatogénesis, consideramos de interés estudiar el patrón y los niveles de expresión de SOX9 en las células de Sertoli en presencia y ausencia de la línea germinal en etapas críticas del desarrollo postnatal. En el presente trabajo estudiamos el patrón de expresión de la proteína SOX9 en ratas esterilizadas con busulfán y lo comparamos con el de animales normales en diferentes etapas de la vida postnatal. Empleando la técnica de inmunofluorescencia con microscopía confocal, no detectamos diferencias cualitativas en la expresión de la proteína SOX9 en los núcleos de las células de Sertoli en las etapas infantil, prepúber, púber y adultas. Además, comparando la expresión de SOX9 en células de Sertoli de tubos seminíferos privados de la línea germinal, tampoco encontramos diferencias con su expresión en los animales no esterilizados en las diferentes etapas del desarrollo de las ratas estériles. No obstante, con la técnica de RT-PCR, sí observamos que los transcritos de SOX9 se expresan en niveles menores en testículos estériles comparados con sus contrapartes normales. Nuestros resultados sugieren que la presencia de las células germinales en los tubos seminíferos influye sobre los niveles de transcripción de SOX9; sin embargo, la permanencia de la proteína SOX9 en los núcleos de Sertoli normales y experimentales, indica la autonomía de su regulación y su importante papel en el mantenimiento del estado diferenciado de las células de Sertoli en los testículos de la rata.

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DEL TESTÍCULO

La diferenciación sexual asegura la perpetuación de las especies con reproducción sexual. Considerada como proceso biológico, la diferenciación sexual implica el desarrollo de dos tipos de individuos: macho o hembra, cuyo fin último es producir dos tipos de células: espermatozoides u óvulos, respectivamente, capaces de fusionarse sumando su genoma para generar un nuevo individuo. Asimismo, los individuos desarrollan el fenotipo y comportamiento correspondiente a cada sexo que garantiza la reproducción sexual.

Durante el desarrollo de los mamíferos, existen tres procesos sucesivos conducentes a la diferenciación sexual del individuo:

1. Etapa cromosómica. Es el establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fecundación (XX ó XY).
2. Etapa gonadal. Se refiere al desarrollo de la gónada indiferenciada hacia ovario o testículo.
3. Etapa fenotípica. Es la diferenciación de los genitales internos y externos, femeninos o masculinos, debido a la secreción y acción de varias hormonas por parte de la gónada fetal masculina.

El periodo indiferenciado de la gónada corresponde a la colonización de la cresta gonadal por parte de las Células Germinales Primordiales (CGP), cuando esto ocurre, las células somáticas inician un proceso de proliferación que dará origen a los elementos histológicos precursores del ovario o testículo, según sea el caso. Una vez que las CGP están en la región urogenital, son rodeadas por células mesenquimatosas y mesoteliales. Estos eventos dan origen al blastema gonadal, también llamado primordio gonadal, situado en la parte ventral del mesonefros.

Durante la diferenciación sexual de la gónada se deben considerar dos aspectos: la histogénesis de las células somáticas y la diferenciación de las células germinales primordiales. A partir del blastema gonadal se diferencian dos tejidos: los cordones sexuales, que son arreglos epiteliales delimitados por una

lámina basal en cuyo interior se alojan células somáticas y CGP; y el tejido estromático que dará origen al tejido conectivo, vasos sanguíneos y tejido intersticial esteroidogénico, este último está representado por las células de Leydig en el caso del testículo; y en el ovario por las células de la teca (Swain & Lovell-Badge, 1999). Las células somáticas se pueden desarrollar en células de soporte que darán origen a las células de Sertoli si se encuentran en testículo o en células de la granulosa, si se encuentran en ovario.

Aunque al inicio del desarrollo de la gónada es imposible diferenciar morfológicamente una gónada masculina de una femenina, a nivel molecular ya existen diferencias en la gónada de los machos genéticos. En mamíferos los primeros cambios morfológicos ocurren en los individuos genéticamente machos. Los eventos iniciales se observan en diferentes edades según la especie considerada; la diferenciación estructural de la gónada en la rata se inicia a los 13.5 días post coito.

Durante el desarrollo de la gónada ocurre una interacción entre dos líneas celulares: las CGP, futuras células sexuales, y las células somáticas, el resto de las células que conforman la gónada. Desde etapas muy tempranas del desarrollo, las CGP establecen relaciones con las células somáticas, las mismas que posteriormente unirán a las células espermatogénicas con las células de Sertoli y a los ovocitos con las células foliculares (Zamboni y Merchant, 1973).

La diferenciación del testículo se caracteriza por tres eventos consecutivos:

1. Comienza por la individualización de los túbulos seminíferos (cordones seminíferos), derivados de los cordones epiteliales del epitelio celómico y del blastema gonadal, en cuyo interior se diferencian y multiplican las células de Sertoli que proceden del epitelio celómico del primordio gonadal, quedando las células germinales englobadas en su interior, éstas a su vez, expresan genes responsables de la diferenciación de otros linajes celulares de la gónada.
2. Diferenciación de las células de Leydig productoras de esteroides en el compartimiento externo, en asociación cercana con los vasos sanguíneos y linfáticos.

3. Los testículos incrementan su tamaño y comienzan a redondearse.

El primer signo morfológico por el cual una gónada en diferenciación puede reconocerse como testículo es el empaquetamiento de las células germinales y somáticas en cordones testiculares. Las células somáticas que forman parte de los cordones son las células de Sertoli, mientras que las células germinales son las futuras espermatogonias. Este empaquetamiento es muy estrecho, con espacios intercelulares muy angostos. Hacia la periferia de los cordones las células de Sertoli comienzan a aplanarse y se forma la lámina basal. A lo largo de la diferenciación los cordones permanecen en conexión con la parte basal de la masa celular mesonéfrica, esta masa se transforma gradualmente en una red de cordones, la *rete testis*. La vascularización de los testículos en desarrollo comienza cuando se forman los cordones testiculares; en la rata fetal, los cordones testiculares están completamente diferenciados antes de que se establezca la vascularización (Merchant, 1976). Tan pronto como las CGP se establecen en la gónada, estas son envueltas en compartimientos específicos en donde su proliferación y diferenciación son reguladas por las células somáticas que las rodean. A la edad de 13.5 dpc hay cerca de 25, 000 células y el crecimiento de las células germinales tanto masculinas como femeninas se detiene, las hembras inmediatamente entran en la profase de la primera división meiótica, mientras que las células masculinas se detienen y entran en la fase G0 del ciclo celular hasta el momento del nacimiento, cuando las espermatogonias reanudan la mitosis (De Felici & McLaren, 1983).

La diferenciación de los cordones testiculares ocurre rápidamente, en la rata toma únicamente 24 horas (Magre, 1980). Se han realizado experimentos en los que se eliminan las células germinales por medio de radiación (Mintz, 1959) o mediante tratamientos con busulfán (Merchant, 1975), y sus resultados muestran que a pesar de la ausencia de células germinales, la formación de cordones testiculares se lleva a cabo, por lo que las células germinales parecen no ser necesarias para su formación.

CÉLULAS DE SERTOLI

En roedores estas células sólo proliferan durante la vida fetal (Walker, 2003) y llegan a ocupar aproximadamente el 18% del volumen total del epitelio seminífero de ratas adultas (Wong *et al.*, 1983). Durante las etapas tempranas de diferenciación la forma de las células es columnar, gradualmente aumentan de tamaño y se vuelven más irregulares. Es por esto que su forma ha sido comparada con la de un árbol cuyo tronco descansa sobre la lámina basal del tubo seminífero, extendiéndose hacia el lumen; de la superficie lateral y apical hay un despliegue de extensiones citoplásmicas delgadas que se extienden entre una y otra envolviendo a las células germinales, simulando las ramas y hojas del árbol (Elftman, 1963). La porción apical de las células bordea la luz tubular mientras que en la zona basal del tubo seminífero las membranas plasmáticas de las células de Sertoli vecinas, que se hallan acomodadas en hilera, forman uniones entre sí que constituyen la base estructural de la barrera hematotesticular en el testículo adulto (Gilula *et al.*, 1976).

La barrera hematotesticular se forma a los 15-18 días de edad en la rata y está constituida por uniones estrechas presentes entre las células de Sertoli; esta barrera crea dos compartimientos en el epitelio (Dym *et al.*, 1970), el primero es el llamado compartimiento basal, donde residen las espermatogonias y espermátocitos primarios jóvenes (preleptoteno) éstos, a diferencia de otras células dentro del tubo, tienen libre acceso a los nutrientes de los sistemas linfático y vascular. El otro compartimiento se conoce como adluminal, allí se encuentran espermátocitos más avanzados (leptoteno y zigoteno) y espermátidas en varios estadios de espermatogénesis y espermiogénesis (Russell, 1980).

La barrera hematotesticular realiza diversas funciones:

- A. Se encarga de establecer un ambiente endócrino-metabólico especializado para el desarrollo y movimiento de las células germinales. Es decir, las células de Sertoli sintetizan, secretan y liberan productos esenciales para el crecimiento y diferenciación de las células germinales (Mather *et al.*, 1983). Estos productos incluyen aminoácidos, carbohidratos, lípidos, iones metálicos y vitaminas.

- B. Regula el movimiento de productos como nutrientes, desechos, y otros solutos, tanto dentro como fuera del epitelio seminífero (Madara, 1998).
- C. Crea una barrera inmunológica, asegurando que el sistema inmune del organismo no reconozca antígenos únicos presentes en la superficie de las células germinales haploides, esta función evita que el organismo se inmunice contra sus propios espermatozoides.

La relación entre las células germinales y las células de Sertoli es obligatoria en el desarrollo testicular y durante las espermatogénesis (McLaren, 1988). Las células de Sertoli pueden influenciar la formación de testículos en el embrión y la espermatogénesis en el adulto, regulando el ambiente inmediato de las células germinales en desarrollo; las células de Sertoli se organizan de tal forma que pueden mantener contacto físico con las células germinales, en este contacto se han observado moléculas de cadherina-N sobre ambas superficies celulares (Newton *et al.*, 1993). Estas células, también llamadas “nodrizas”, logran acordonar poblaciones completas de células germinales en compartimientos con ambientes distintos dentro del mismo epitelio seminífero; también pueden regular el entorno bioquímico de las células germinales, aunque hay que notar que la regulación del ambiente dentro de los tubos seminíferos es una responsabilidad compartida por las células de Sertoli y las germinales residentes (Griswold, 1998).

Las células de Sertoli proporcionan apoyo a las células germinales en desarrollo dentro del epitelio seminífero participando directamente en la modificación de componentes de la matriz extracelular que permiten la formación de uniones celulares especializadas. Otra característica interesante de estas células es su citoesqueleto bien desarrollado, el cual es responsable de la organización colectiva del epitelio seminífero (Mruk & Cheng, 2004).

Las células germinales son indirectamente influenciadas por factores producidos por las células de Sertoli. La FSH y los andrógenos son hormonas que actúan a través de estas células. Las células de Sertoli también son receptoras de estímulos endocrinos (FSH) y parácrinos procedentes de las células de Leydig, de las células mioideas peritubulares y de las células germinales.

ESPERMATOGÉNESIS

La espermatogénesis es un proceso eficiente e indispensable para la continuación de las especies con reproducción sexual mediante el cual se producen espermatozoides maduros a partir de células germinales primordiales, tiene lugar en los tubos seminíferos del testículo. Los eventos bioquímicos, moleculares y celulares que ocurren durante la espermatogénesis están bajo el control endocrino del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, es decir que es regulado por medio de mensajeros hormonales y por la comunicación celular que existe entre las células germinales en desarrollo y las células de Sertoli. En testículos inmaduros, la hormona folículo estimulante (FSH) es esencial para el inicio y el mantenimiento de la espermatogénesis mientras que en testículos adultos, apoya la función de las células de Sertoli. La espermatogénesis se caracteriza por ser uno de los sistemas de “auto-renovación” celular más productivos; en la rata, una espermatogonia es teóricamente capaz de producir 4096 espermatozoides, aunque la muerte celular que ocurre durante el proceso reduce substancialmente la producción final (França, 1998).

Durante el ciclo del epitelio seminífero, las células que provienen de una sola espermatogonia del tipo A están unidas por puentes citoplásmicos y constituyen un sincicio, pueden comunicarse entre ellas y sincronizar su desarrollo; esto da lugar a las etapas del ciclo del epitelio seminífero, las cuales se pueden reconocer por la morfología del grado de desarrollo del acrosoma y el núcleo de la espermátida. En la rata existen 14 posibilidades de asociación entre las células en desarrollo, que ocurre en un tiempo y lugar específico (Leblond & Clermont, 1952). El análisis de un corte transversal de un solo túbulo seminífero revela que en el mismo túbulo se encuentra, a distancias regulares, el mismo estadio del tejido germinal. La distancia entre dos estados iguales se conoce como secuencia o ciclo del epitelio seminífero. Junto a las células de Sertoli se desarrollan varias generaciones de células germinales en el túbulo seminífero, una generación se define como un grupo de células en aproximadamente el mismo estado de desarrollo. Las distintas generaciones celulares evolucionan

sincrónicamente, agrupadas en asociaciones celulares de composición más o menos fija que constituyen los estados del ciclo, que son subdivisiones artificiales.

La espermatogénesis se puede subdividir en 3 fases principales: 1. proliferación de espermatogonias o fase mitótica, 2. formación de espermatocitos o fase meiótica y 3. espermiogénesis, un proceso morfológico que convierte las espermatidas haploides en espermatozoides (Leblond & Clermont, 1952).

En el interior de los túbulos seminíferos, los espermatozoides inician el proceso como espermatogonias, éstas residen en el exterior de la barrera hematotesticular y al experimentar mitosis se convierten en espermatogonias tipo A o tipo B. Las espermatogonias tipo A permanecen como espermatogonias y no cambian; actúan como células progenitoras y se dividirán de nuevo para producir más células tipo A y B. Las espermatogonias tipo B (diploide) se diferencian como espermatocitos primarios (espermatozoides en preleptoteno y leptoteno), éstos migran del compartimiento basal hacia el compartimiento adluminal del epitelio seminífero, atravesando la barrera hematotesticular. Los espermatocitos primarios sufren una primera división meiótica para convertirse en espermatocitos secundarios, los cuales, bajo una segunda división meiótica se transforman en espermatidas haploides, es decir que a partir de una espermatogonia tipo B se originan ocho espermatidas, esta fase ocurre en el compartimiento adluminal. Finalmente, ocurre la espermiogénesis donde las espermatidas, que en un inicio son células de forma redondeada, sufren una serie de cambios como la condensación nuclear hasta convertirse en espermatozoides maduros; a continuación son liberados en el lumen del tubo seminífero por donde viajan hasta el epidídimo para continuar allí su proceso de maduración (Clermont, 1972; Rossen, 1962).

Durante todo el proceso de espermatogénesis es esencial la presencia de las células de Sertoli, ya que brindan el ambiente adecuado y el sostén para el desarrollo de las células espermáticas, el movimiento hacia el lumen del tubo seminífero, así como su desarrollo hasta que maduran y son liberadas. En los mamíferos el tiempo que se requiere para completar la espermatogénesis es variable, en cada especie tiene una duración única e inalterable. En la rata el ciclo

dura 12.9 días, de la etapa I a la etapa XIV (Clermont & Harvey, 1965); mientras que en el ratón tiene una duración de 8.6 días, de la etapa I a la etapa XII (Clermont & Trott, 1969). Uno de los ciclos más largos es el que desarrollan los humanos cuya duración es de 16 días. Este lapso representa el tiempo necesario para que una célula ascienda un nivel por encima de la célula original en un mapa del ciclo espermatogénico; en estas representaciones gráficas cada etapa se denota con un número romano y contiene asociaciones celulares con características morfológicas bien definidas (Fig. 1).

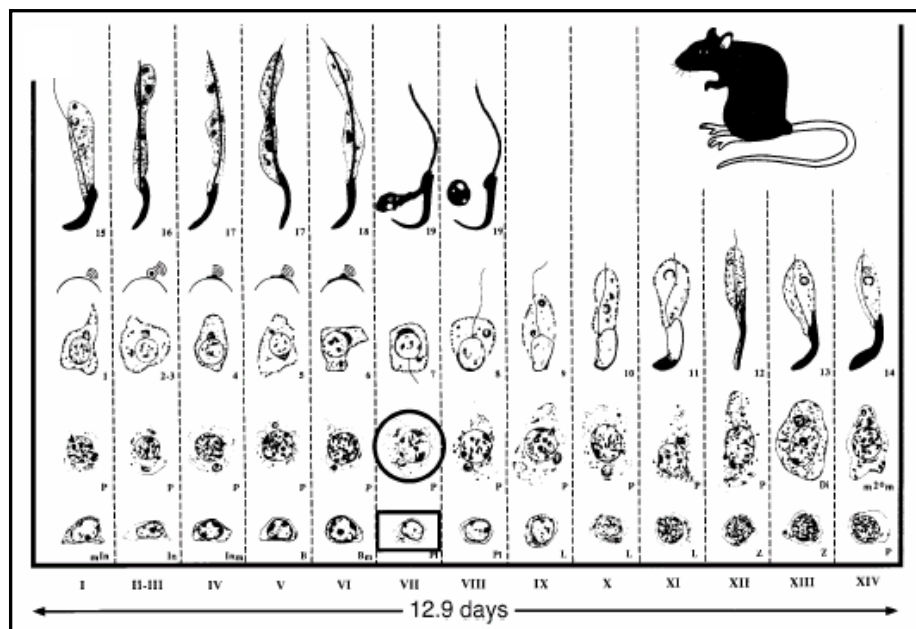


Fig 1. Representación gráfica de las etapas y la duración del ciclo del epitelio seminífero de la rata (França *et al.*, 1998).

En todos los tejidos es posible encontrar uniones celulares, éstas son el medio por el cual las células se comunican entre sí y con su ambiente; considerando sus características morfológicas y funcionales se han clasificado en tres tipos: 1. Uniones de obstrucción u “occluding junctions” (por ejemplo, las uniones estrechas o “tight junctions” que crean la barrera hematotesticular); 2. Uniones de anclaje o de adhesión; y 3. Uniones de comunicación (por ejemplo, las uniones gap).

Como se mencionó anteriormente, a lo largo del proceso de espermatogénesis, la asociación entre células germinales de cada etapa de diferenciación se mantiene. Además existe un contacto con las células que les dan soporte, las células de Sertoli. Este contacto incluye complejas uniones especializadas entre las membranas de ambos tipos celulares; incluso en etapas más avanzadas de diferenciación, las células germinales ocupan una cavidad formada por la invaginación de la célula de Sertoli (Fig. 2). Se sabe que en estas células ocurren cambios morfológicos cíclicos asociados con las diferentes etapas del ciclo espermatogénico (revisado por França, 1998). La célula de Sertoli es la célula somática más cercanamente asociada con el desarrollo de las células germinales. Debido a la asociación tan cercana tanto física como funcional se había pensado que las interacciones entre las células germinales y las células somáticas controlaban la duración de los ciclos y la organización celular. Para comprobar esta idea, França en 1998 realizó trasplantes de células testiculares de rata en túbulos seminíferos de ratón inmunodeficiente; los resultados mostraron que en estas condiciones, la espermatogénesis ocurre con los ciclos celulares característicos de las células germinales de rata, a pesar de recibir el sustento de las células de Sertoli de ratón.

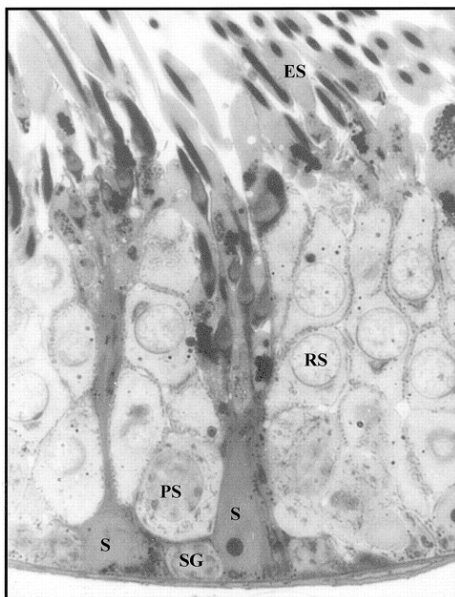


Fig. 2 Sección de un tubo seminífero de rata que ilustra la organización de las células testiculares y la estrecha relación que mantienen las células germinales y las células de Sertoli. S, núcleo de célula de Sertoli; SG, espermatogonia; PS, espermatocito en paquiteno; RS, espermátida redondeada; ES, espermátida alargada (Cheng & Mruk, 2002).

Durante el proceso de espermatogénesis y como resultado de la cercanía morfológica entre células germinales y células de Sertoli, tiene lugar un gran número de interacciones y comunicaciones a nivel bioquímico y molecular entre estos tipos celulares. En análisis morfométricos realizados en testículos de rata adulta, se ha observado que cada célula de Sertoli se encuentra asociada con aproximadamente 30-50 células germinales en cada etapa del ciclo espermatogénico (Wong & Russel, 1983; Weber *et al.*, 1983).

LOS GENES *SRY* Y *SOX9*

El comienzo de la diferenciación sexual gonadal en los mamíferos es atribuida al gen determinante del testículo, *SRY*, localizado en el brazo corto del cromosoma Y (del inglés, *sex-determining region of the Y chromosome*). Este gen se expresa en el testículo durante el periodo crítico de determinación sexual (Koopman *et al.*, 1990). Su identidad se confirmó cuando se transfirió un fragmento genómico de 14 kb del *Sry* a ratones transgénicos XX y se logró inducir el desarrollo masculino (Koopman *et al.*, 1991). Los estudios en ratones y humanos con constitución cromosómica XY y con deleciones o mutaciones puntuales del gen *Sry/SRY*, muestran que estos individuos presentan un fenotipo femenino (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990). El *SRY* codifica para una proteína que contiene un dominio de unión al DNA denominado caja HMG (grupo de alta movilidad; del inglés, *high-mobility group*) (Nasrin *et al.*, 1991). La caja HMG es un dominio de unión al DNA característico de una gran familia de factores de transcripción y de las proteínas no histónicas de la cromatina que induce la curvatura de la región del DNA para que otros dominios del factor se unan (Giese *et al.*, 1992).

Este gen actúa como desencadenante de los eventos necesarios para el desarrollo del testículo a partir de la gónada indiferenciada; es por lo tanto, el único gen ligado al cromosoma Y necesario para el desarrollo de la gónada masculina. La expresión del gen *Sry* en ratón es muy dinámica: se detecta en la cresta genital, específicamente en células somáticas de la gónada indiferenciada, a los 10.5 dpc y a los 11.5 dpc pero a los 12.5 dpc sólo se detecta en niveles muy bajos y desaparece (Koopman *et al.*, 1990). Durante este periodo de

determinación sexual pueden observarse ciertos eventos celulares característicos, incluyendo la proliferación, diferenciación y migración de las células de soporte, desencadenando la diferenciación del linaje de células de Sertoli; una vez que esto ocurre, las células de Sertoli dirigen sucesivamente la diferenciación del resto de los tipos celulares en el testículo. Esta serie de eventos es presuntamente desencadenada por la actividad de *SRY* (Canning & Lovell B, 2002). En ausencia de *SRY*, las células de soporte dan origen a células foliculares o de la granulosa en el ovario. Aun no se han identificado los genes blanco de *SRY*, éste gen debe estar de alguna forma activando otros genes que están involucrados en mantener y definir la identidad de las células de Sertoli; un candidato para llevar a cabo esta regulación es *SOX9* (Swain & Lovell-B, 1999).

Los genes *SOX* son reguladores del desarrollo caracterizados por la presencia de una región altamente conservada entre especies, un dominio de unión a DNA HMG y más del 50% de homología con el gen determinante del sexo *SRY*. La familia de genes *SOX* puede subdividirse en doce subgrupos definidos por homologías adicionales independientes al dominio de unión al DNA (Bowles *et al.*, 2000). El subgrupo E de genes *SOX* consiste en tres miembros: *SOX8*, *SOX9* y *SOX10*. El gen de este subgrupo estudiado con mayor detalle es *SOX9*. Se descubrió que mutaciones heterocigotas causan Displasia Campomélica en humanos, un síndrome caracterizado por un desarrollo anormal de los huesos, letalidad perinatal y otras anomalías; además el 75% de los pacientes que la padecen presentan disgénesis testicular que conduce a una reversión sexual de masculino a femenino. (Chaboissier, *et al.*, 2004). Otras características de esta afección son: paladar agrietado, ausencia de tractos y bulbos olfatorios, malformaciones renales y cardíacas, pulmones hipoplásticos y caja torácica estrecha (Lynch *et al.*, 1993).

La importancia de *SOX9* en el desarrollo óseo fue revelada por la identificación de mutaciones en el gen *SOX9* en pacientes con displasia campomélica. El patrón de expresión de *SOX9* sugiere que juega un papel en la cascada condrogénica así como en el mantenimiento del fenotipo del condrocito. *SOX9* es un factor de transcripción esencial para la diferenciación de condrocitos,

actúa como activador transcripcional y como represor de la expresión de genes en las células condrocíticas (Panda *et al.*, 2001); es el principal regulador de la formación de cartílago, y puede estar actuando en unión con SOX5 y SOX6 en la regulación de la condrogénesis (Lefevre *et al.*, 1998). Se ha demostrado que SOX9 regula la transcripción del gen de la colágena II, la principal proteína del cartílago, expresado diferencialmente por los condrocitos de la zona proliferativa del cartílago de crecimiento.

SOX9 es un gen autosómico involucrado en la formación del testículo en vertebrados. Está situado en el cromosoma 17q24.1 (Tommerup *et al.*, 1993), codifica una proteína de 509 aminoácidos con una masa molecular de 56 kDa (Wagner *et al.*, 1994). Los dominios funcionales incluyen: 1) el motivo de unión a DNA HMG en la posición 104-182 que tiene un 71% de similitud con la caja HMG de SRY. 2) un dominio de transactivación COOH-terminal en la posición 402-509 que es rico en SPQ y 3) el C terminal de la proteína tiene una región rica en prolina y glutamina similar a los dominios de activación presentes en algunos factores de transcripción.

SOX9, a diferencia de SRY, está altamente conservada a lo largo de la evolución de los vertebrados. El SOX9 en humanos es 96% idéntico a la proteína del ratón. Se ha considerado a SOX9 como un factor de transcripción, el dominio HMG de SOX9, al igual que la de SRY, actúa uniéndose a sitios específicos del DNA para activar la transcripción de genes blanco. Durante la embriogénesis SOX9 es esencial en la regulación del gen de MIS (Sustancia Inhibidora de Müller) también llamada AMH (Hormona Antimulleriana), la cual se requiere para la regresión de sistema reproductivo femenino (Shen *et al.*, 2002). Durante el desarrollo embrionario y postnatal de la gónada, la expresión de SOX9 está localizada únicamente en las células de Sertoli, no así en células de otro linaje, esta condición sugiere que SOX9 juega un papel importante en la diferenciación de las células de Sertoli y en el mantenimiento de su función (Morais da Silva *et al.*, 1996).

En el ratón, el SOX9 se expresa a los 10.5 dpc, antes de la evidente diferenciación sexual, la expresión de SOX9 en la cresta urogenital del ratón se

limita a una débil y difusa banda en la parte lateral de la cresta genital de ambos sexos. Sin embargo, en esta etapa temprana, la proteína de SOX9 es expresada células mesenquimáticas vecinas a la incipiente cresta genital (Moreno *et al.*, 2003). A los 11.5 dpc, la expresión de SOX9 difiere notablemente entre hembras y machos; en la cresta genital masculina se observa intensamente pero no así en las hembras. En la cresta gonadal la proteína SOX9 se detecta inicialmente en las células precursoras de Sertoli (pre-Sertoli). A los 12.5-13.5 dpc, la expresión comienza a localizarse en los cordones sexuales del testículo, los cuales, a esta edad, consisten en células de Sertoli y células germinales. La expresión de SOX9 persiste en la porción somática del testículo durante la vida adulta. No se detecta expresión de SOX9 en la cresta genital femenina después de los 10.5 dpc (Morais da Silva *et al.*, 1996; Kent *et al.*, 1996).

Dado que 1) SOX9 es uno de los primeros genes activados en las gónadas masculinas después de la expresión de SRY, 2) que es expresado en las células de Sertoli, 3) que se sobrexprea en los machos y su expresión desaparece en las hembras, y 4) se asocia con la reversión sexual masculina y funcionalmente puede sustituir a SRY en ratones transgénicos (Vidal *et al.*, 2001), se piensa que podría tratarse de uno de los genes importantes para la diferenciación sexual masculina cuya expresión está mediada por SRY. (Cameron *et al.*, 1997; Canning & Lovell-Badge, 2002).

BUSULFÁN. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.

El busulfán o myleran tiene la denominación química de 1,4-butanodiol dimetanosulfonato. Es un agente quelante bifuncional tipo éster que reacciona con el nitrógeno en posición 7 de la guanina e interfiere con la replicación y transcripción del DNA, permitiendo uniones cruzadas de las cadenas de DNA. El busulfán pertenece a la clasificación de los agentes quelantes, llamados así porque tienen la habilidad de adicionar grupos alquilo. Son utilizados en el tratamiento contra el cáncer porque retrasan el crecimiento de las células, deteniendo el crecimiento de los tumores; esto lo logran intercalando guaninas en las cadenas de DNA lo que hace a las hebras incapaces de desenrollarse y

separarse, este proceso es necesario en la replicación del DNA por lo tanto las células no logran dividirse. El busulfán es absorbido por el tracto gastrointestinal, metabolizado exclusivamente en el hígado y excretado en la orina como ácido metanosulfónico. En altas dosis causa una severa supresión de las células de la médula ósea, causando una prolongada mielosupresión y afectando directamente las células con alto índice mitótico (Guzmán *et al.*, 2005).

El busulfán se ha empleado clínicamente desde 1950 como agente quimioterapéutico, principalmente en el tratamiento de la leucemia granulocítica (Galton, 1953); tiene actividad citotóxica debida a su capacidad de reaccionar con el DNA y algunas proteínas (Jackson, 1966). En humanos se le ha relacionado con padecimientos como disfunción gonadal, ginecomastia y azoospermia (Galton *et al.*, 1958). El Busulfán administrado en dosis apropiadas elimina selectivamente a las células germinales en rata, ratón y humano sin causar otras malformaciones (Bollag, 1954; Hemsworth and Jackson, 1963; Heller and Jones, 1964; en Merchant-Larios *et al.*, 1979), provoca esterilidad como consecuencia de la destrucción de las CGP mientras que las células somáticas no son afectadas.

Aun se desconoce la razón de la particular susceptibilidad de las CGP ante la acción del busulfán, pero se cree que está relacionada con la proliferación de las células y que el busulfán actúa en ciertos puntos del ciclo celular. En estudios hechos en vivo en varios sistemas de proliferación celular se ha llegado a la conclusión de que el busulfán posee cierta selectividad en su actividad citotóxica, atacando en particular a aquellas células que atraviesan por una etapa temprana de citodiferenciación (Elson *et al.*, 1958; Partington *et al.*, 1964; Grimes *et al.*, 1966; en Merchant-Larios *et al.*, 1979). Se ha establecido que en el caso de la rata, la destrucción de las CGP tiene lugar durante la etapa de migración, cuando se localizan fuera de la cresta genital, y cuando se han establecido en esta zona (Forsberg *et al.*, 1966). A pesar de la ausencia de células germinales, las células somáticas por sí mismas pueden iniciar la proliferación para formar una gónada indiferenciada que posteriormente se diferenciará en testículo (Merchant, 1975). Lo anterior indica que los fenómenos morfogenéticos que ocurren durante la diferenciación testicular están controlados por los componentes somáticos de la

gónada, no así en el ovario, donde probablemente el desarrollo de las células somáticas esté controlado por la presencia de células germinales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de los numerosos reportes referentes al papel del gen SOX9 al inicio de la diferenciación sexual de la gónada de los mamíferos, poco se sabe sobre su función en las células de Sertoli en etapa postnatal del testículo. En el 2000, Fröjdman *et al.* estudiaron la expresión de la proteína SOX9 en las células de Sertoli de la rata postnatal. Encontraron que a los 2 días, la detección es muy débil pero se incrementa de manera dramática en las células de Sertoli a partir de los 15 días después del nacimiento. En ratas adultas, las células de Sertoli mantuvieron una clara expresión de la proteína SOX9 en la mayoría de las regiones de los túbulos seminíferos. Sin embargo, los autores describieron que en algunas zonas, la proteína SOX9 fue apenas detectable. Los resultados sugieren que la expresión de SOX9 en las células de Sertoli depende de la edad y de la etapa de maduración de las células germinales. De manera que los niveles de expresión de SOX9 pudieran ser regulados por las células germinales y/o por los niveles hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en las diferentes etapas del desarrollo postnatal. Desgraciadamente, Fröjdman *et al.* (2000) no identificaron la etapa del ciclo del tubo seminífero en la que la detección de SOX9 fue débil, ni reportaron sus resultados en términos de las bien establecidas etapas del ciclo del túbulo seminífero.

Considerando los diferentes niveles hormonales en las etapas infantil, púber y adulta de la rata, así como la íntima asociación anatómica y funcional existente entre las células de Sertoli y las células germinales, resulta interesante estudiar los niveles de expresión de SOX9 en las células de Sertoli en presencia y ausencia de la línea germinal en etapas críticas del desarrollo postnatal. La correlación de los resultados entre los animales experimentales y sus controles no tratados, pudiera sugerir estrategias para conocer el papel funcional de SOX9 en las células de Sertoli del testículo postnatal, así como el papel de las células germinales en la regulación de los niveles de expresión tanto del ARN mensajero, como de la proteína de SOX9.

HIPÓTESIS

- A. Las células germinales modulan tanto los niveles de transcritos, como la expresión de la proteína del gen SOX9 en las células de Sertoli de la rata.

- B. El SOX9 continúa expresándose aún en ausencia de la línea germinal y su papel es mantener el estado diferenciado de las células de Sertoli.

OBJETIVO

Comparar los niveles de transcritos de *SOX9* y su producto, la proteína *SOX9* en células de Sertoli de tubos seminíferos normales, con los correspondientes niveles en células de Sertoli de tubos seminíferos depletados de la línea germinal en diferentes etapas del desarrollo postnatal de la rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Para la realización de este proyecto se emplearon ratas de la cepa Wistar provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los animales se mantuvieron en cajas con una cama de aserrín dentro de las salas del bioterio del IIB bajo condiciones controladas de temperatura y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Tuvieron acceso a agua y alimento *ad libitum*. Se utilizaron 12 hembras en edad reproductiva que presentaran características morfométricas similares entre sí. Cada una se cruzó durante la etapa de estro con un macho adulto. La cópula fue confirmada mediante registro visual; el día del apareamiento se considera el día 0 de la gestación.

TRATAMIENTO DE RATAS PREÑADAS

El busulfán (1,4- Butanediol dimmethanesulfonato) [Fluka (Chemika)] con fórmula química $C_6H_{14}O_6S_2$ fue disuelto para su administración en DMSO (dimetilsulfóxido) y agua inyectable estéril (50:50) en baño de flotación a 80°C. Para la inyección se emplearon jeringas desechables con aguja de 23x25 mm. Las ratas gestantes se dividieron al azar en dos grupos, un grupo “experimental” y un grupo “control” (n=6 cada uno). A las ratas del grupo experimental se les administró una dosis (10mg/kg de peso corporal) de busulfán/DMSO por vía intraperitoneal en el día 14 de gestación. A las ratas del grupo control se les administró vía intraperitoneal únicamente el vehículo (DMSO/agua inyectable 50%) a los 14 días de gestación. Las ratas parieron a los 21-23 días de gestación y para continuar con el experimento sólo se conservaron las crías macho las cuales permanecieron con su madre.

MUESTREO

Se utilizaron ratas macho de 2, 16, 21, 30, 40, 50 y 63 día post parto (dpp). Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (dosis: 1 ml/kg de peso corporal). Se realizó una incisión transversal en la

región abdominal de cada macho con el fin de exponer los testículos. Estos se disectaron cuidadosamente y se sumergieron en buffer de fosfatos (PBS pH 7.4 filtrado con un tamaño de poro de 0.45 μ M) en H₂O con DEPC mantenido en frío para retirar la túnica albugínea y el epidídimo. Los testículos se cortaron en fragmentos pequeños los cuales se distribuyeron en tubos para su congelación en nitrógeno líquido y se almacenaron a -75°C para su posterior procesamiento para RT-PCR. Otros fragmentos del mismo testículo se fijaron en paraformaldehído (PFA) 4% en PBS mantenido en frío para su posterior procesamiento para inmunohistoquímica de fluorescencia. Los fragmentos restantes se fijaron en una solución de Karnovsky pH 7.2 (Karnovsky, 1965) para su procesamiento posterior de microscopía de luz.

Los individuos de 40, 50 y 63 días de edad de ambos grupos, se perfundieron vía intracardiaca con solución de NaCl 0.9%, seguida de una solución de PFA 4% en PBS. Después de la perfusión, cada testículo se extrajo con la técnica ya descrita y se mantuvo en la solución fijadora de PFA 4% durante 15 minutos.

INCLUSIÓN EN EPON

Los fragmentos de testículo separados para microscopía de luz se fijaron en buffer de Karnovsky pH 7.2 durante una hora, después se lavaron con buffer de cacodilato de sodio 0.1M por una hora, se post-fijaron una hora en solución de tetróxido de Osmio 1% OsO₄ en buffer de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956) para después deshidratarlos en alcoholes a concentraciones crecientes (70, 80, 90, 95 y 100%) e incluirlos en Epon 812. Se obtuvieron cortes semifinos de 0.5 μ m de espesor con ultramicrotomo (Reichert Ultracuts, Leica) y se tiñeron con azul de toluidina 0.5%.

INMUNOFLUORESCENCIA

Los tejidos testiculares se fijaron en PFA 4% durante 15 minutos y se lavaron con PBS por 5 minutos. A continuación se guardaron en una solución de sacarosa al 30% en PBS a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Posteriormente los

tejidos se incluyeron en medio O.C.T. (Tissue-Tek) en cápsulas Beem evitando la presencia de medio y de burbujas, una vez orientados dentro de la cápsula éstas se congelaron a -70°C . Se realizaron cortes de diferentes zonas de un mismo testículo de $10\mu\text{m}$ de espesor en un criostato (Leica) a una temperatura de -18°C , y se montaron en portaobjetos cubiertos con Poly-L-Lysina (SIGMA). Los cortes se delimitaron con un lápiz hidrofóbico para inmunohistoquímica (DAKO). Las laminillas con los cortes se introdujeron en una campana de vacío durante una hora a temperatura ambiente (T/A). Las laminillas se colocaron dentro de una cámara húmeda, ahí se realizó un lavado con PBS durante 10 minutos para eliminar el Tissue-Tek; se permeabilizó el tejido con Tritón X-100 al 1% en PBS por 10 minutos, seguido de un lavado de 5 minutos con PBS; después se incubaron con una solución de bloqueo elaborada con albúmina bovina (SIGMA) al 1% en PBS durante 2 horas, todo esto se realizó a temperatura ambiente. Se incubó con un anticuerpo primario policlonal contra SOX9 hecho en conejo (diluido 1:250 en la solución de bloqueo) durante toda la noche a 4°C . Al día siguiente se hicieron 5 lavados con PBS de 5 minutos cada uno; posteriormente las laminillas se incubaron con el anticuerpo secundario Anti-conejo hecho en cabra acoplado a rodamina (CHEMICON) (1:100 diluido en la solución de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se hicieron 5 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. Al final del procedimiento las laminillas se montaron con medio para montar fluorescente (DakoCytomation) y se observaron en un microscopio confocal (Pascal, Zeiss).

EXTRACCIÓN DE RNA Y REACCIÓN DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-PCR)

Se determinó la expresión de los transcritos de SOX9 en los testículos de rata de 2, 16, 30, 40, 50 y 63 dpp siguiendo la metodología descrita a continuación: Las muestras de tejido testicular mantenidas en congelación fueron tratadas para la extracción de RNA total usando Trizol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA) con el siguiente protocolo: Se añadieron $50\mu\text{L}$ de trizol al tejido y se homogeneizó vigorosamente con un homogenizador estéril hasta obtener una solución clara. Se completó a 1 mL con trizol pipeteando múltiples veces hasta integrar y se dejó

incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 200 μL de cloroformo a la muestra y se agitó vigorosamente por 15 segundos, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14, 000 rpm por 15 minutos a 4°C. De las fases obtenidas se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo. Se añadieron 500 μL de isopropanol para precipitar el RNA y se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14, 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y se añadió 1mL de etanol al 80% para lavar el pellet de RNA. Se centrifugó a 10, 000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el etanol cuidadosamente y se dejó secando la pastilla de RNA a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.

Para resuspender la pastilla se añadió un volumen adecuado 0.4-2 μg RNA/ μL de RNasecure Resuspensión Solution precalentada a 60°C. Inmediatamente se calentó la muestra a 60°C durante 10 minutos y se pipeteó varias veces hasta disolver la pastilla.

Para remover el DNA genómico contaminante de la muestra de RNA total, ésta fue tratada con DNase treatment and renoval reagents DNA-free™ Kit (Ambion). Para tratar una muestra de RNA en un volumen de 50 μL se agregaron: 5 μL de 10x DNase I Buffer y 1 μL de rDNase I (2U/ μL). Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se añadieron 5 μL de DNase Inactivation Reagent y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente mezclando la muestra de 2 a 3 veces. Se centrifugó a 14, 000 rpm por 2 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

El RNA total fue cuantificado con un espectrofotómetro (Gene Quant Pro, Amersham Pharmacia Biotech). Se hizo una dilución 1:1000 (RNA: agua DEPC) y se obtuvieron las lecturas de 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}). Para conocer la concentración de RNA se utilizó cálculo: $A_{260} \times 40$ (coeficiente de extinción del RNA) \times factor de dilución = $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNA. Para estimar la pureza del RNA se consideró la relación entre los valores de absorbancia de 260 nm y 280 nm; únicamente se utilizaron los RNAs con una pureza = 2.0 ± 0.15 .

Se realizó la técnica de RT-PCR, la cual conjuga la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y la reacción catalizada por la enzima transcriptasa

reversa (RT), para sintetizar cDNA (DNA complementario) a partir del RNA obtenido; se empleó el Kit First-Strand cDNA Síntesis Using SuperScript II RT (Invitrogen) siguiendo el protocolo siguiente para cada muestra. En un tubo para microcentrífuga estéril se añadieron 1 μL de Oligo (dT), el volumen de RNA equivalente a 500 ng/ μL y 1 μL de dNTPs (10 mM cada uno). Se ajustó el volumen a 14 μL con agua estéril y se mezcló bien. La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se colocó rápidamente en hielo. Se centrifugó brevemente y se agregaron: 4 μL de 5X First-Strand Buffer y 2 μL de 0.1 M DTT, se mezcló cuidadosamente y se incubó a 42°C por 2 minutos. Se agregaron 0.5 μL (100 unidades) de SuperScript II RT y se mezcló pipeteando suavemente. Se incubó a 42°C por 60 minutos. Para inactivar la reacción se calentó a 70°C por 15 minutos. El volumen final de la reacción fue de 20.5 μL . El volumen se duplicó con agua estéril, es decir, se añadieron 20 μL a cada una de las muestras antes de almacenarlo.

El cDNA que se obtuvo de la reacción de RT se utilizó como templado para la amplificación en la PCR de los genes *SOX9* y *β -actina* usando el siguiente protocolo:

En un tubo para PCR estéril se añadieron:

- 3 μL 10X PCR Buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl]
- 1.5 μL MgCl_2 50 mM
- 1 μL dNTP 10 mM
- 1 μL primer sentido (10 μM)
- 1 μL primer antisentido (10 μM)
- 0.3 μL *Taq* DNA polymerase (5 U/ μL)
- 2 μL cDNA
- 20.2 μL Agua estéril

Se mezcló suavemente. El volumen total fue de 30 μL .

Oligonucleótidos (primers) utilizados para las reacciones:

SOX9	5' TCA TGA AGA TGA CCG ACG A 3'	
	5' GTT CTT CAC CGA CTT CCT 3'	Fragmento de 533 pb
β -actina	5' ATG TGC AAG GCC GGC TTC GC 3'	
	5' GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3'	Fragmento de 332 pb

La reacción se hizo para los genes SOX9 y β -actina, éste último empleado como control, es decir, como indicador de la calidad de pipeteo.

Cada paso de la reacción de PCR requiere de parámetros específicos de tiempo y temperatura, los cuáles se alcanzaron empleando un termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.). Las condiciones fueron las siguientes:

94°C 10 min.	
94°C 1 min.	} Serie de 32 ciclos
56°C 1 min.	
72°C 1 min.	
72°C 10 min.	
4°C	

Los productos de la reacción de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.1 μ g/ml de bromuro de etidio en buffer TAE 1%.

RESULTADOS

MICROSCOPIA DE CORTES SEMIFINOS

El tratamiento con busulfán mostró su efecto esterilizante al examinar la población de células germinales en las diferentes etapas del desarrollo postnatal. Los cortes semifinos de 1 ó 2 μm de espesor permiten distinguir a las células germinales de las células de Sertoli dentro de los tubos seminíferos. En las etapas infantil y prepúber la población de células germinales se limita a los diferentes tipos de espermatogonias y espermátocitos que han iniciado la meiosis. En testículos adultos, se hacen evidentes las espermátidas en el proceso de espermiogénesis que lleva a la formación de los espermatozoides maduros (Figs. 1 y 2). En las ratas provenientes de madres tratadas con busulfán en el día 14 de la gestación, se manifestó una dramática disminución en la población de células germinales en todas las etapas de la espermatogénesis. Aunque en algunos individuos un número pequeño de tubos seminíferos conservó células germinales sobrevivientes, en la gran mayoría los tubos seminíferos estuvieron desprovistos de células germinales y solamente la población de células de Sertoli fue evidente (Figs. 3 y 4).

INMUNOFLUORESCENCIA

La especificidad del anticuerpo generado en nuestro laboratorio se demostró incubando cortes de tejidos congelados sin el anticuerpo contra SOX9 y sometidos a las mismas condiciones de tratamiento, de lavado, bloqueo, permeabilización e incubación con el anticuerpo secundario (anticonejo). Además, se colocaron cortes seriados del mismo tejido en dos portaobjetos, alternando un corte para el portaobjetos incubado con anticuerpo primario y el siguiente corte para el portaobjetos control. Aseguramos así la especificidad del anticuerpo en regiones similares de los tubos seminíferos (Figs. 5 y 6).

Expresión de SOX9 en células de Sertoli en diferentes etapas del desarrollo normal del testículo

El microscopio confocal reveló la expresión de la proteína SOX9 desde la etapa infantil de la rata. Su detección fue evidente en las células de Sertoli desde la etapa infantil [2-16 días post-parto (dpp)] y prepúber (21 dpp). Los cordones seminíferos de testículos fijados a los 2 dpp todavía no muestran un lumen y las espermatogonias aparecen intercaladas entre las células de Sertoli (Fig. 7). Sin embargo, a los 21 dpp, ya ocurre una migración transitoria de las células germinales hacia el centro de los cordones, de manera que las células de Sertoli positivas al SOX9 se distribuyen en la periferia delineando a los cordones seminíferos (Fig. 8). En los testículos de ratas púberes fijados a los 30 dpp, los tubos seminíferos muestran una distribución característica de las células germinales. Las espermatogonias aparecen intercaladas entre las células de Sertoli claramente detectadas por su positividad a SOX9 (Figs. 9 y 10). Como en esta etapa ya se ha iniciado el proceso de la espermatogénesis, los espermátocitos y espermátidas tempranas se localizan en el compartimiento testicular hacia el lumen de los tubos seminíferos.

Finalmente, la expresión de la proteína SOX9 se mantiene en las células de Sertoli en los testículos de ratas adultas fijados a los 40, 50 y 63 dpp (Figs. 11 y 12). La proteína SOX9 se detectó con facilidad en los núcleos de las células de Sertoli en los túbulos seminíferos cortados transversal, tangencial o longitudinalmente. Aunque en el presente estudio no se intentó realizar un estudio densitométrico, el análisis cualitativo indica que las células de Sertoli parecen expresar la proteína SOX9 en todas las etapas del ciclo del tubo seminífero.

Expresión de SOX9 en células de Sertoli en diferentes etapas del desarrollo del testículo privado de la línea germinal

Los tubos seminíferos de las crías de madres tratadas con busulfán mostraron una clara depleción de células germinales en todas las etapas estudiadas (infantil, prepúber, púber y adulta). Los cortes de congelación empleados por la reacción de inmunofluorescencia revelaron que, con algunas excepciones, los tubos

seminíferos estuvieron constituidos por células de Sertoli exclusivamente. El anticuerpo contra SOX9 detectó la presencia de la proteína en el núcleo de todas ellas (Figs. 13-16). Al comparar de manera cualitativa la expresión de la proteína SOX9 en los tubos seminíferos con y sin la línea germinal, fue evidente que no parece haber diferencia entre las dos condiciones.

RT-PCR

Detección de transcritos de SOX9 en células de Sertoli en presencia y ausencia de la línea germinal

La detección de transcritos de SOX9 hecha mediante RT-PCR muestra que el mRNA está presente en los testículos normales de todas las edades consideradas. Sin embargo, al hacer la comparación con los testículos que recibieron tratamiento con busulfán, se observan diferencias en los niveles de transcritos, esto es notable por la variación en la intensidad de las bandas. En el ovario de 2dpp que se empleó como control negativo, no se encontró expresión de SOX9. En el testículo normal o control (C) de 2 dpp se observó que la banda de SOX9 es de mayor intensidad que la correspondiente al testículo tratado con busulfán (B) de la misma edad. En la muestra de 16 dpp se observa que la banda del C ha aumentado su intensidad, aunque la del B presenta una intensidad menor al compararlas. A los 30 dpp el SOX9 del C ha disminuido un poco, mientras que el B de la misma edad presenta una banda de débil intensidad. A los 50 dpp el C muestra una banda apenas visible mientras que en el B de esta edad no se detectan transcritos. Este patrón se repite en las figuras 17, 18 y 19. Se utilizó β -actina como control interno.

FIGURAS

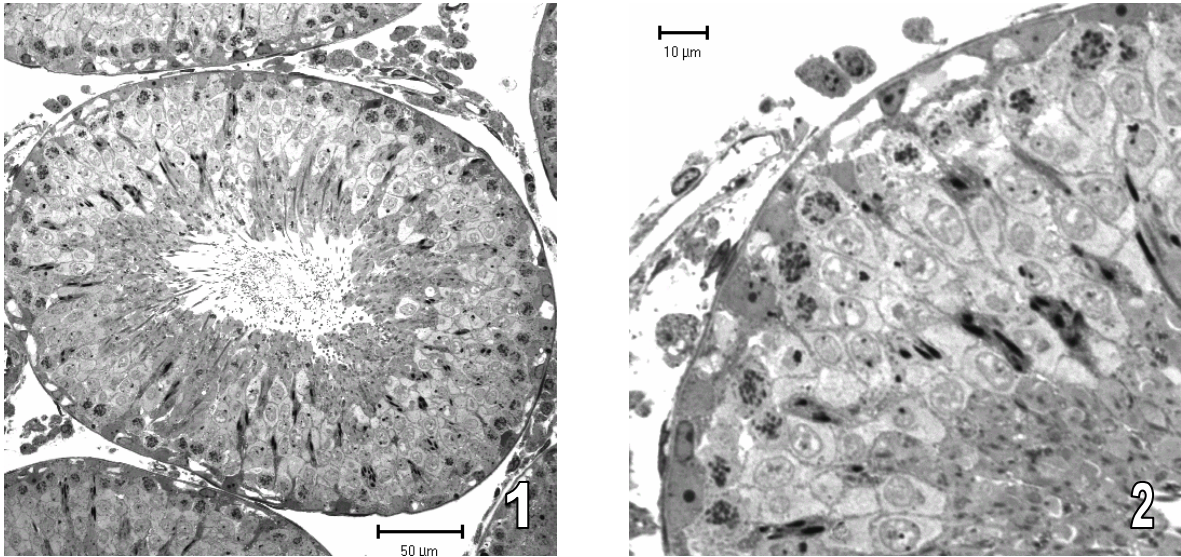


Fig.1 y 2. Corte transversal de un tubo seminífero de testículo de rata en etapa adulta (50 dpp) donde se observa la población de células germinales en las diferentes etapas de espermatogénesis y espermiogénesis.

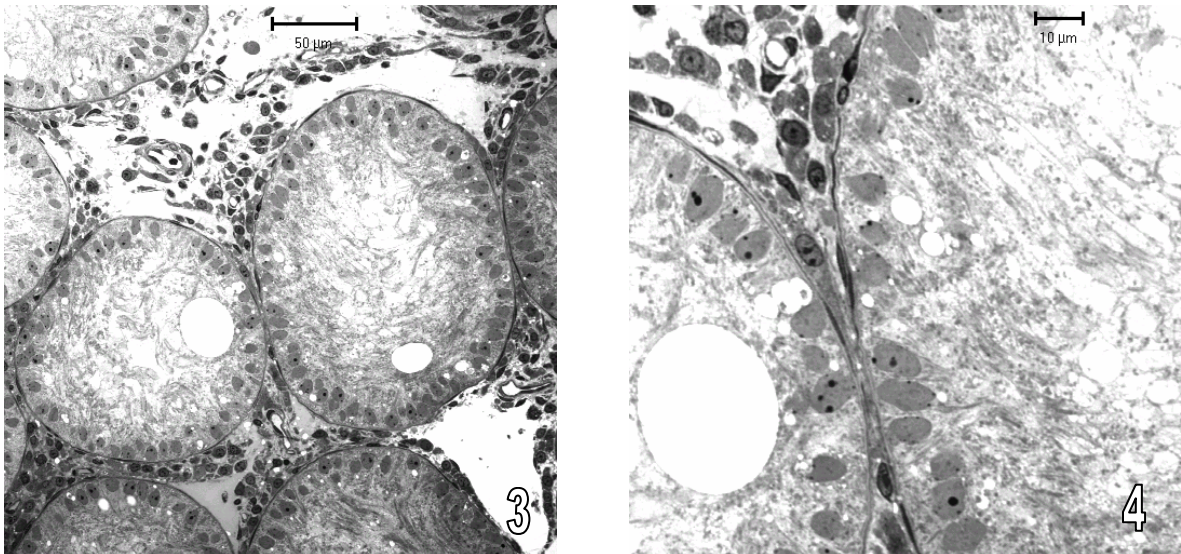


Fig. 3 y 4. Corte transversal de un testículo de rata en etapa adulta (50 dpp) cuya madre fue tratada con busulfán en el día 14 de la gestación. En esta imagen se aprecia la ausencia de la población de células germinales tubos seminíferos formados únicamente por células de Sertoli.

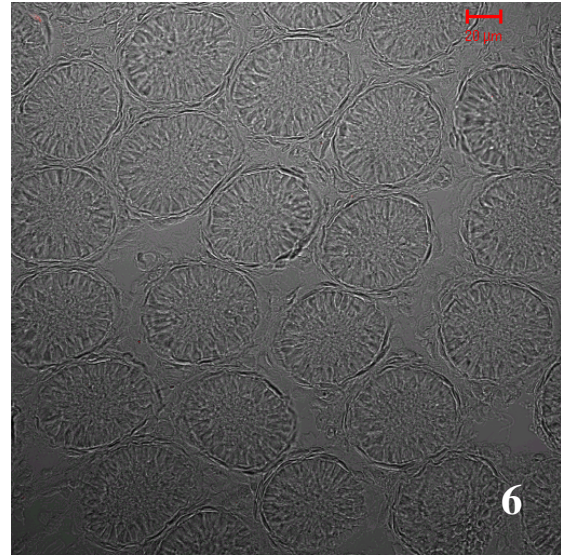
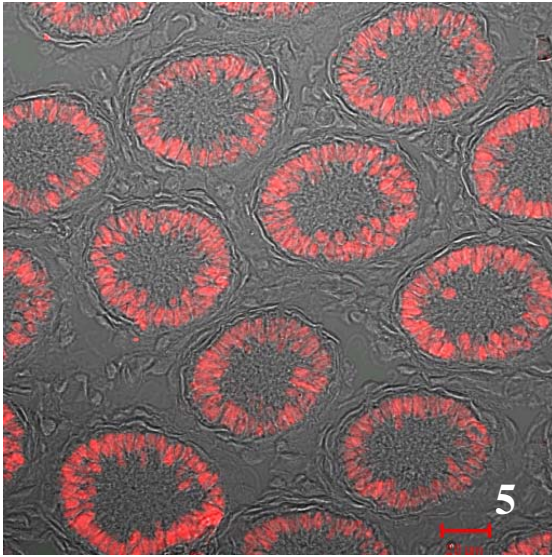


Fig. 5 y 6. Especificidad del anticuerpo. Inmunofluorescencia de SOX9 (rojo) incubada con anticuerpo primario (5) y sin anticuerpo primario (6) respectivamente, donde se confirma la especificidad del anticuerpo primario en diferentes secciones de un testículo de rata de 2 días post parto (dpp).

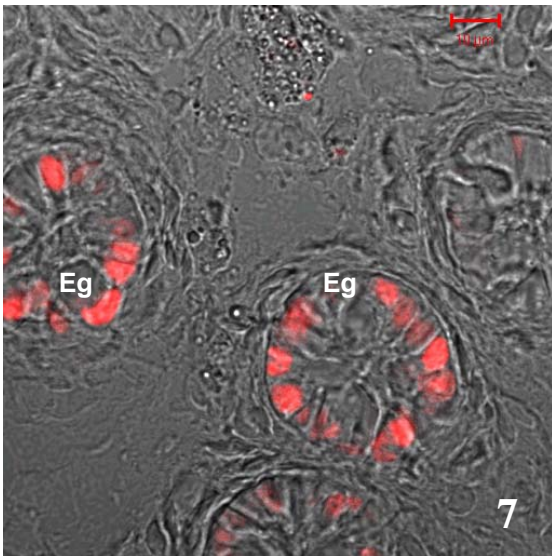


Fig. 7. Testículo de 2 dpp (etapa infantil). En el interior del cordón se observa a las espermatogonias (Eg) acomodadas entre las células de Sertoli cuyos núcleos son positivos a SOX9 (rojo).

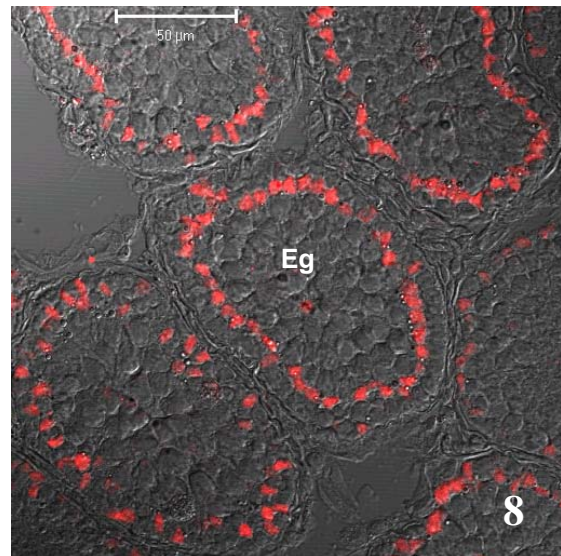


Fig. 8. Testículo de 21 dpp (etapa prepúber). Las células de Sertoli están arregladas en la periferia de los cordones, mientras que en el centro se ubican las espermatogonias (Eg).

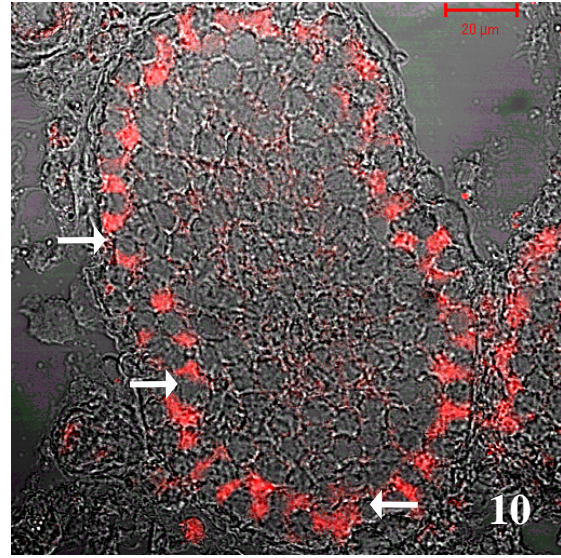
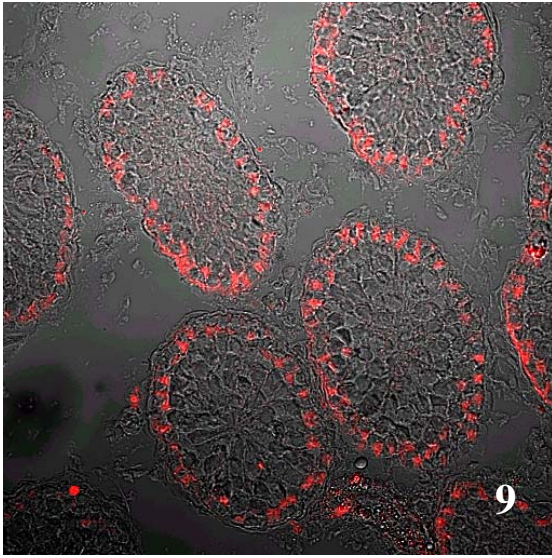


Fig. 9 y 10. Cordones testiculares de 30 dpp (etapa púber). En esta etapa las espermatogonias (flechas) se observan intercaladas entre las células de Sertoli (núcleos rojos).

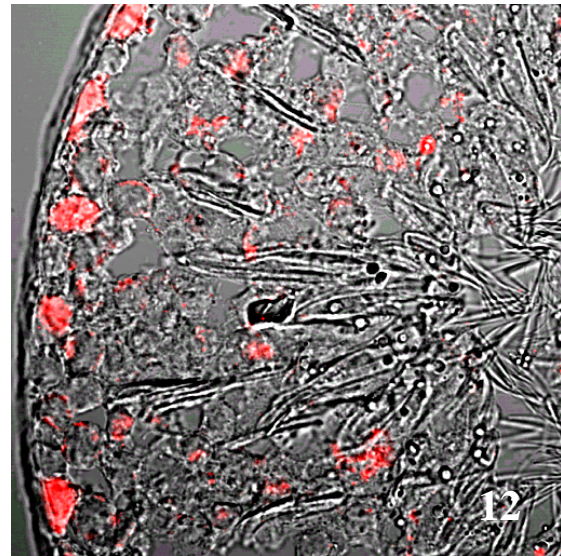
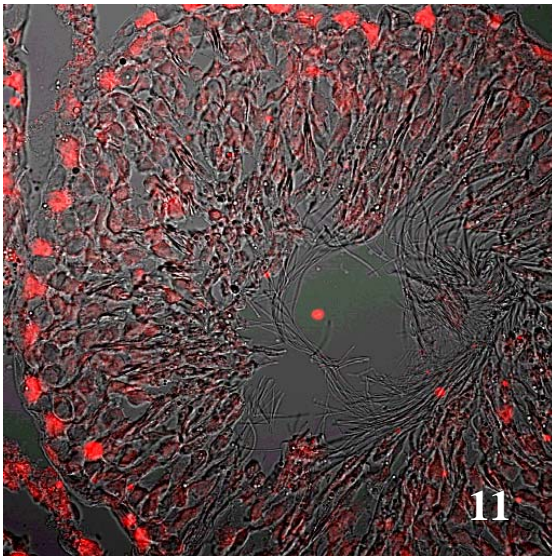


Fig. 11 y 12. Tubo seminífero de 50 dpp (etapa adulta). En este corte transversal del tubo se observan algunas etapas de la espermatogénesis y espermiogénesis así como la clara presencia de la proteína SOX9 (núcleos rojos).

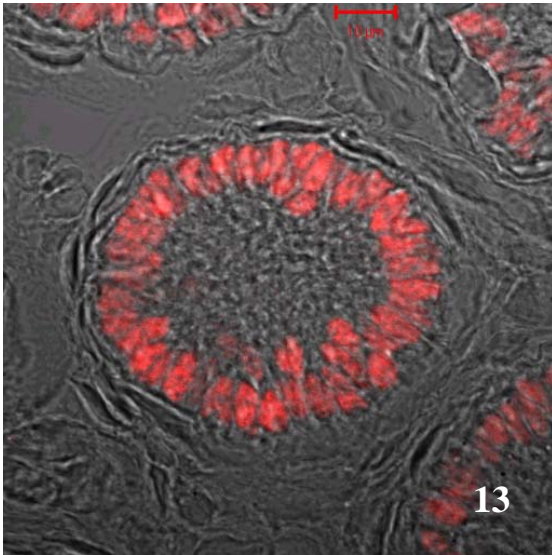


Fig. 13. Cordones testiculares de 16 dpp tratados con busulfán. En esta etapa prepúber se detecta la ausencia de células germinales y la expresión de la proteína SOX9 en los núcleos (rojo) de las células de Sertoli.

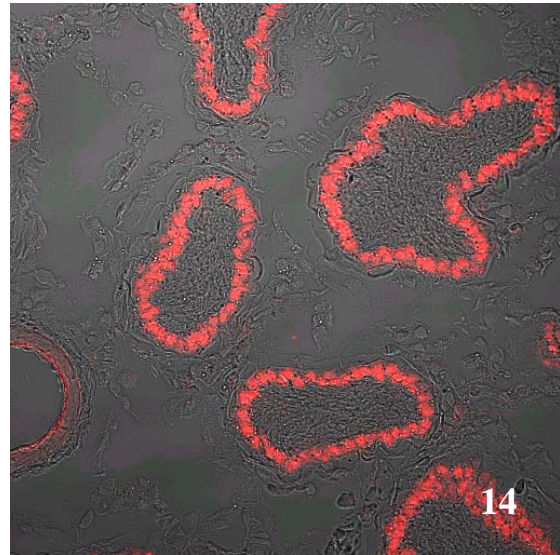


Fig. 14. Tubos de 30 dpp tratados con busulfán. Las células de Sertoli permanecen en la periferia del tubo mostrando una señal de SOX9 positiva (núcleos rojos). No hay células germinales en ninguna etapa de desarrollo.

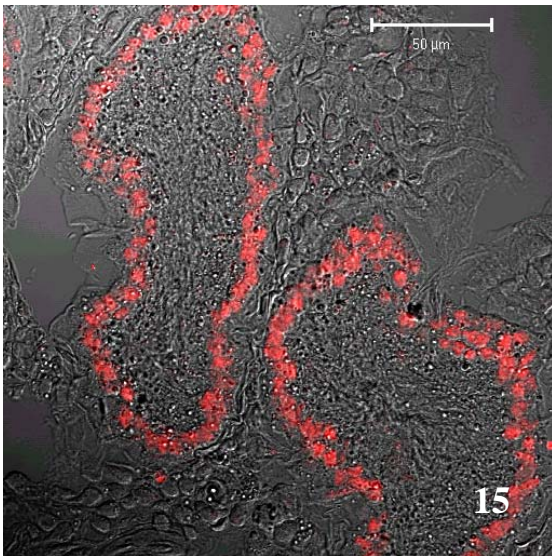


Fig. 15. Tubos seminíferos de 40 dpp tratados con busulfán. En esta etapa adulta el tubo carece de células germinales; se detecta claramente la presencia de la proteína de SOX9.

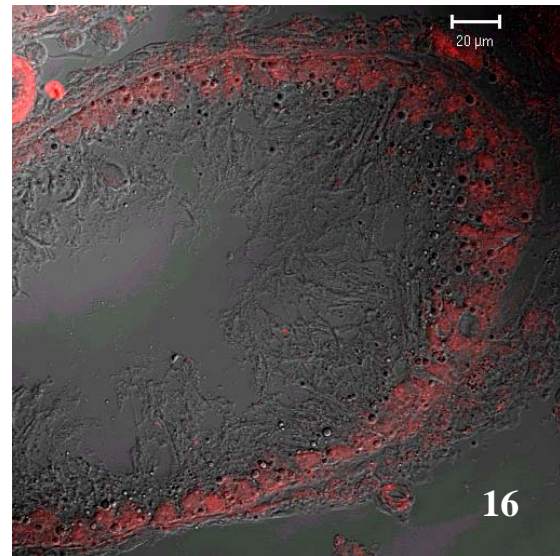


Fig. 16. Tubo seminífero de 50 dpp tratado con busulfán. Las células germinales se eliminaron en su totalidad y en el interior del tubo sólo se observan los núcleos (rojos) de las células de Sertoli mostrando una reacción positiva a SOX9.

Fig. 17 (A).

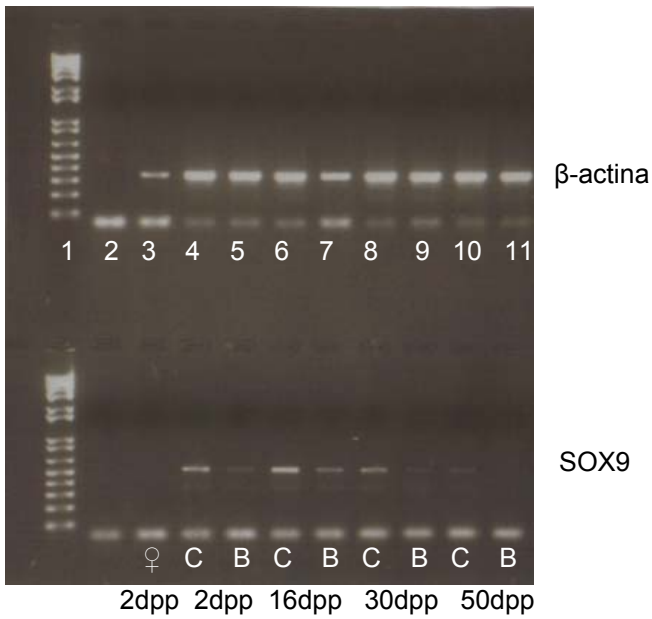


Fig. 17 (A). RT-PCR de SOX9 en ovarios y testículos de rata.

Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 control sin templado; carril 3 ovario de 2 dpp; carril 4-11 muestras de testículo. Carriles 4 y 5 testículo de 2 dpp control y tratado con busulfán respectivamente; carriles 6 y 7 testículo de 16 dpp control y busulfán respectivamente; carriles 8 y 9 testículo de rata de 30 dpp control y busulfán respectivamente; carriles 10 y 11 testículo de 50 dpp control y busulfán respectivamente.

C; Control

B; Tratamiento con Busulfán

dpp; días post parto

Es de notar que en todas las edades la densidad de la banda B es más baja que la de C.

Fig. 17 (B). Detalle de la figura 17(A)

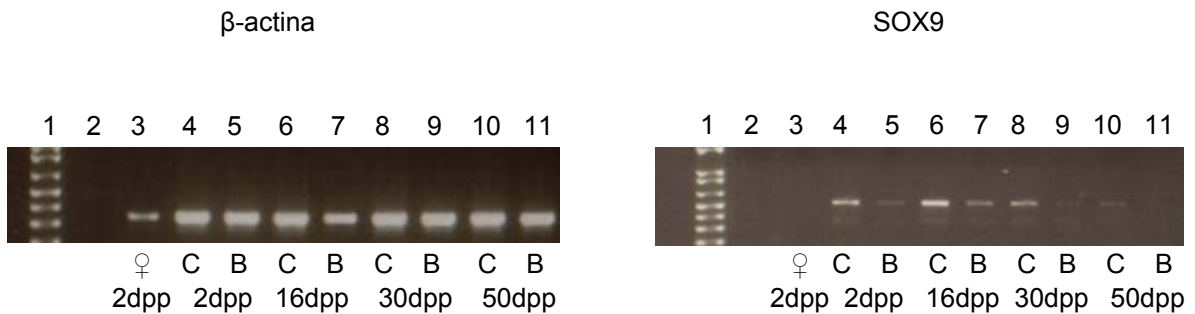


Fig. 18 (A).

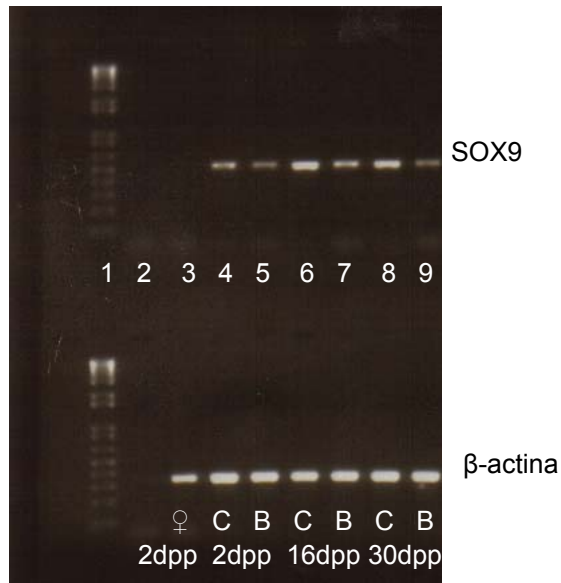


Fig. 18 (A). RT-PCR de SOX9 en ovarios y testículos de rata.

Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 control sin templado; carril 3 ovario de 2 dpp; carril 4-9 muestras de testículo. Carriles 4 y 5 testículo de 2 dpp control y tratado con busulfán respectivamente; carriles 6 y 7 testículo de 16 dpp control y busulfán respectivamente; carriles 8 y 9 testículo de rata de 30 dpp control y busulfán respectivamente.

C; Control
B; Tratamiento con Busulfán
dpp; días post parto

Fig. 18 (B). Detalle de la figura 18 (A)

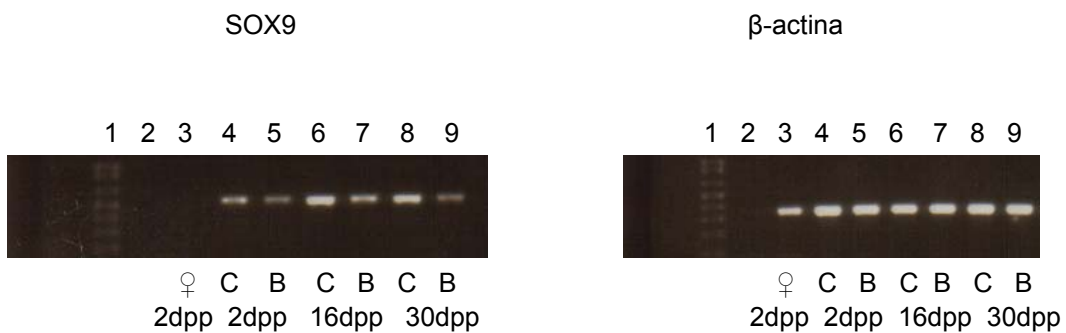


Fig. 19 (A).

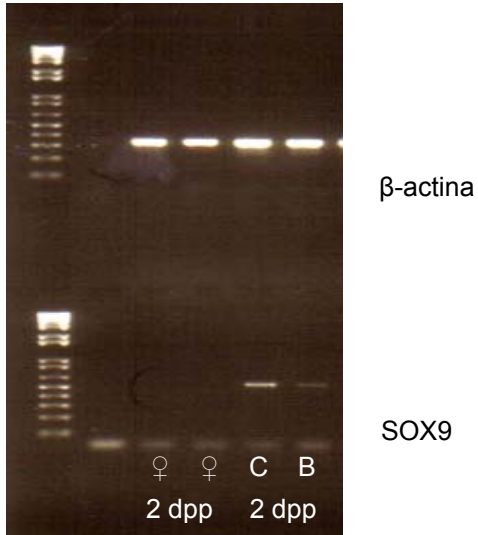
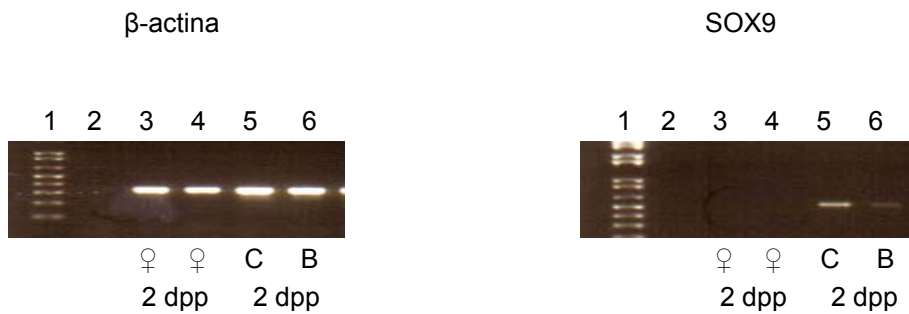


Fig. 19 (A). RT-PCR de SOX9 en ovarios y testículos de rata.

Carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 control sin templado; carril 3 ovario de 2 dpp; carril 4 ovario de 2 dpp; carril 5 testículo de 2 dpp control; carril 6 testículo de 2 dpp tratado con busulfán.

C; Control
B; Tratamiento con Busulfán
dpp; días post parto

Fig. 19 (B). Detalle de la figura 19 (A)



DISCUSIÓN

La realización del presente estudio correspondió al diseño de una estrategia clásica de la embriología experimental; nos planteamos la siguiente pregunta: ¿Cómo se modifica la función de un determinado tipo celular al cambiar el entorno de otros tipos celulares entre los que se desarrolla normalmente? El hecho de que las células germinales y las de Sertoli estén íntimamente asociadas desde que se inicia la formación de los tubos seminíferos en el embrión y permanezcan así en el adulto, permite suponer que la función de ambos tipos celulares es interdependiente. Está bien establecido que las células de Sertoli producen factores parácrinos y brindan un entorno físico a la línea germinal que son indispensables para que lleven a cabo el proceso de espermatogénesis.

Sin embargo, es menos conocido el efecto que la presencia de la línea germinal pudiera ejercer sobre la actividad de las células de Sertoli.

Por otra parte, el conocimiento de las secuencias en el ADN características de genes bien identificados y la posibilidad de generar anticuerpos específicos contra las proteínas que codifican, permiten monitorear la regulación de su expresión en condiciones experimentales. De manera que en el presente estudio nos propusimos conocer si la presencia de las células germinales en los tubos seminíferos de la rata, afecta la expresión de la proteína SOX9, característica de las células de Sertoli.

Aunque el SOX9 a diferencia del SRY es un gen autosómico, su temprana expresión durante el desarrollo y la permanencia de su expresión en las células de Sertoli, lo colocan en una posición de singular interés para intentar conocer cual pudiera ser su papel funcional. En la etapa prenatal sabemos que el SOX9 por sí mismo (sin el SRY) es capaz de iniciar, continuar y mantener el desarrollo del testículo aun en ausencia del SRY (Vidal *et al.*, 2001). La expresión del SOX9 en las células de Sertoli garantiza la diferenciación de este tipo celular donde una de sus funciones mejor conocidas es su actuación como factor de transcripción en la regulación de la expresión del gen MIS (Arango *et al.*, 1999). Como el producto de éste, es indispensable para la regresión de los conductos de Müller, el papel del

SOX9 en la diferenciación sexual quedó bien establecido en las células de Sertoli fetales. De hecho, al generar ratones transgénicos con SOX9 inactivado (“knockout”), los machos genéticos (XY) son incapaces de diferenciar testículos y en su lugar forman ovarios, desarrollándose como hembras fenotípicas (Vidal *et al.*, 2001). Sin embargo, la expresión del SOX9 en las células de Sertoli no se restringe a la vida fetal, sino que se mantiene en forma conspicua después del nacimiento.

En un trabajo previo, Fröjdman *et al.* (2000) estudiaron de manera descriptiva, la expresión de la proteína SOX9 en el testículo de la rata durante el desarrollo normal. Empleando la técnica de inmunofluorescencia, los autores reportan haber detectado diferencias en la expresión de SOX9 dependientes tanto de la etapa del desarrollo testicular, como diferencias regionales, en determinadas zonas de los tubos seminíferos. Así, reportan haber detectado una “mayor expresión” de SOX9 en células de Sertoli en las etapas fetal y púber. Además, en ratas adultas, notaron que la inmunodetección de SOX9 se incrementa en la sub-etapa VII del ciclo del tubo seminífero. Concluyen entonces que la expresión de SOX9 en las células de Sertoli depende tanto de la edad del testículo, como de la etapa de la espermatogénesis en que se encuentra el tubo seminífero.

En contraste con lo reportado por Fröjdman *et al.* (2000), nuestro estudio actual con la técnica de inmunofluorescencia confocal, reveló que no hay diferencias convincentes en la expresión de SOX9 entre las diversas etapas del desarrollo testicular postnatal, ni tampoco en las diferentes etapas del ciclo del tubo seminífero en ratas adultas normales. Asimismo, en los animales esterilizados con busulfán durante la vida intrauterina, fue evidente que la inmunodetección de SOX9 se mantiene constante en los núcleos de las células de Sertoli en testículos infantiles, prepúberes y púberes, además de permanecer en los animales adultos. ¿Cómo explicar las diferencias encontradas por Fröjdman *et al.* (2000) y las nuestras? Es importante notar que en ambos estudios se utilizaron anticuerpos policlonales diferentes que pudieran explicar diferentes sensibilidad y/o especificidad al acoplarse a distintos sitios antigénicos de la proteína SOX9. En el presente trabajo la inmunofluorescencia fue estudiada con un microscopio

confocal que asegura una mayor sensibilidad a la que se obtiene con el microscopio de fluorescencia estándar. De manera que las diferencias reportadas por Fröjdman *et al.* (2000). pudieran también explicarse por diferencias en el espesor de los cortes y/o diferencias en el manejo de las muestras obtenidas en diferentes tiempos. En todo caso, una evidente debilidad de ambos estudios es que en ninguno de ellos se intentó realizar una evaluación cuantitativa que fuera mas allá de la apreciación cualitativa que proporcionan las imágenes fluorescentes.

Por otra parte, en el presente trabajo hicimos un estudio preliminar empleando RT-PCR considerando la potencialidad de esta técnica para revelar los niveles de transcritos del gen *SOX9* durante el desarrollo del testículo. Los resultados obtenidos sugieren que los niveles de transcritos de *SOX9* son menores en las células de Sertoli de tubos seminíferos desprovistos de la línea germinal comparados con las células de Sertoli de los tubos seminíferos normales de edad equivalente. Sin embargo, como en el caso de la inmunodetección de la proteína *SOX9*, la evaluación de los niveles de transcritos del gen correspondiente, deberán ser apoyados por un estudio cuantitativo. Existen programas todavía con cierto nivel de complejidad que permiten un análisis densitométrico de señales capturadas en muestras inmunofluorescentes (Manders *et al.*, 1992). Así también, será necesaria la aplicación del método cuantitativo de RT-PCR en tiempo real para el análisis de los niveles de transcrito del *SOX9*. De manera que los resultados obtenidos en la presente tesis, servirán como base para profundizar en el conocimiento del papel que juega el *SOX9* en las células de Sertoli del testículo postnatal.

Mientras tanto, es posible hacer algunas inferencias todavía especulativas respecto al papel que desempeña el *SOX9* en los tubos seminíferos del testículo adulto. El hecho de que se mantengan activas la transcripción y la traducción del gen *SOX9* en las células de Sertoli en los tubos seminíferos desprovistos de la línea germinal, sugiere que entre sus funciones está la de mantener el estado diferenciado de dichas células. Sabemos que factores de transcripción como el *SOX9* participan en redes reguladoras de expresión génica que dan identidad

estructural y funcional a los diversos linajes celulares del organismo. Aunque en el presente estudio detectamos cierta disminución en el nivel de transcritos de *SOX9*, es evidente que la proteína continuó expresándose en testículos estériles.

Podemos concluir entonces que la interacción entre las células germinales y las de Sertoli no influye de manera directa en la expresión del *SOX9*. Es posible que, considerando la íntima asociación de los dos tipos celulares, la ausencia de células germinales afecte más dramáticamente la expresión de otros genes ubicados río abajo de la cascada del *SOX9*.

CONCLUSIONES

Los resultados apoyan parcialmente la primera hipótesis (hipótesis A), la cual sostiene que las células germinales modulan los niveles de expresión del gen *SOX9* y su producto, la proteína *SOX9* en las células de Sertoli de la rata, debido a que se encontró un menor nivel de *SOX9* en tubos seminíferos estériles.

Por otra parte, nuestros resultados apoyan de manera contundente la segunda hipótesis (hipótesis B), que propone que el *SOX9* continúa expresándose aún en ausencia de la línea germinal y su papel es mantener el estado diferenciado de las células de Sertoli.

LITERATURA CITADA

Arango N., Lovell-Badge R., Behringer R. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99: 409-419.

Bowles J., Schepers G., and Koopman P. 2000. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227: 239-255.

Cameron FJ, Sinclair AH. 1997. Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Hum. Mutat.* 9: 388-395.

Canning CA., Lovell-Badge R. 2002. Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet.* 18(3):111-113.

Chaboissier M., Kobayashi A., Vidal V., Lutzkendorf S., van de Kant H., Wegner M., de Rooij D., Behringer R., Schedl A. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131(9):1891-1901.

Cheng Y. and Mruk D. 2002. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol. Rev.* 82: 825-874

Clermont Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 52: 198-235.

Clermont Y. and Harvey S. 1965. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized hormone treated albino rats. *Endocrinology.* 76: 80-89.

Clermont Y. and Trott M. 1969. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of ³H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril.* 20: 805-817.

De Felici M. and McLaren A. 1983. In vitro culture of mouse primordial germ cells. *Exp. Cell Res.* 144: 417-427.

Dym M, Fawcett DW. 1970. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod.* 3: 308-326.

Elftman H. 1963. Sertoli cells and testis structure. *Am. J. Anat.* 113: 25-32.

Forsberg G. J., Olivecrona H. 1966. The effect of prenatally administered busulphan on rat gonads. *Biol Neonat.*10:180-192.

França L., Ogawa T., Avarbock M., Brinster R. and Russell L. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of reproduction* 59:1371-1377.

Fröjdman K., Harley V. 2000. Sox9 protein in rat Sertoli cells is age and stage dependent. *Histochem. Cell Biol.* 113:31-36.

Galton D.1953. Myleran in chronic myeloid leucemia results of tratment. *Lancet.* i.208-213.

Galton D., Hill M., Wiltshaw E. 1958. Busulfan (1,4-dimethanesulfonyloxybutane, Myleran): Summary of clinical results. *Ann N Y Acad Sci* 68: 967-973.

Giese K., Cox J., Grosschedl R. 1992. The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates the assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:185-195.

Gilula NB., Fawcett DW., Aoki A. 1976. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammal testis. *Dev. Biol.* 50:142-168.

Griswold MD. 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9:411-416.

Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Ecomonou A., Münsterberg 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 new family of embryonically expressed genes. *Nature* 346: 245-250.

Guzmán L., López R., Llerena G., Pino J., Retuerto F. 2005. Recuperación del epitelio germinal masculino de ratones tratados con dosis única de Busulfán. *Rev. Peru Biol.* 12 (1): 141-144.

Jackson H. 1996. Antifertility compounds in the male and female (Charles C. Thomas, Springfield) pp. 37-76.

Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high molality for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27:137.

Kent J., Wheatley S., Andrews J., Sinclair A., Koopman P. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813-2822.

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

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

Leblond C. and Clermont Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.*55(4):548-73.

Lefevre V., Li P., de Crombrughe B. 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively the type II collagen gene. *Embo J* 17(19):5718-5733.

Lynch S., Gaunt M., Minford A. 1993. Campomelic dysplasia: evidence of autosomal dominant inheritance. *J Med Genet.* 30:683-686.

Madara JL. 1998. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol.* 60:143-159.

Magre S. and Jost A., 1980. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study. *Arch. Anat. Microsc. Morphol.* 69: 297-318.

Manders EM., Stap J., Brakenhoff GJ., Van Driel R., Aten JA. 1992. Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labeling of DNA and confocal microscopy. *Journal of Cell Science.* 103:857-862.

Mather JP, Gunsalus GL, Musto NA, Cheng CY, Parvinen M, Wright W, Perez-Infante V, Margioris A, Liotta A, Becker R, Krieger DT, Bardin CW. 1983. The hormonal and cellular control of Sertoli cell secretion. *J Steroid Biochem.* 19:41-51.

McLaren A. 1988. Sex determination in mammals. *Trend. Genet.*4:153-157.

Merchant H. 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Develop. Biol.* 44: 1-21.

Merchant H. 1976. The onset of testicular differentiation in the rat: an ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 145: 319-330.

Merchant H., Coello J. 1979. The effect of busulfán on rat primordial germ cells at the ultrastructural level. *Cell Differentiation* 8: 145-155.

Mintz B. 1959. Continuity of the female germ cell line from embryo to adult. *Arch. Anat. Microsc. Morphol.* 48: 155-172.

Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A., Lovell-Badge R. 1996. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet.* 14, 62-68.

Moreno M., Harley V., Merchant L. 2003. Cell aggregation precedes the onset of Sox9-expressing preSertoli cells in the genital ridge of mouse. *Cytogenet Genome Res.* 101:219-223.

Mruk D and Cheng Y. 2004. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 25(5):747-806.

Nasrin N., Buggs C., Fu Kong X., Carnazza J., Goebel M., Alexander-Bridges M. 1991. DNA-binding properties of the product of the testis determining gene and a related protein. *Nature* 354:317-320.

Newton S., Blaschuk O., Millette C. 1993. N-cadherin mediates Sertoli cell-spermatogenic cell adhesion. *Dev. Dynam.*197:1-13.

Panda D., Miao D., Lefebvre V., Hendy G., Goltzman D. 2001. The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276(44):41229-41236.

Rossen-Runge EC. 1962. The process of spermatogenesis in mammals. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 37:343-377.

Russell L. 1980. Sertoli-Germ Cell Interrelations: A Review. *Gamete Research* 3:179-202.

Shen J. and Ingraham H. 2002. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. *Mol. Endocrinol.* 16(3):529-540.

Sinclair AH., Berta P., Palmer MS., Hawkins JR., Griffiths BL., Smith MJ., Foster JW., Frischauf AM., Lovell-Badge R., Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.

Swain A. and Lovell-Badge R. 1999. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes & Development.* 13: 755-767.

Tommerup N., Schempp W., Meinecke P., Pedersen S., Bolund L., Brandt C., Goodpasture C., Guldborg P., Held K., Reinwein H., Saugstad O., Scherer G., Skjedal O., Toder R., Westvik J., van der Hagen C., Wolf U. 1993. Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nature Genet.* 4:170-174.

Vidal V., Chaboissier M., de Rooij D., Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nature Genetics*, 28:216-217.

Walker W. 2003. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, 144 (9):3719-3721.

Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Dagna Bricarelli F., Keutel J., Huster 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.

Weber J., Russell L., Wong V., Peterson R. 1983. Three dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell II. Morphology of Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ-cell relationships. *Am J Anat.* 167:163-179.

Wong V, Russell LD. 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell. I. Methods, basic configuration, and dimensions. *Am J Anat.*167:143-161.

Zamboni L, Merchant H. 1973. The fine morphology of mouse primordial germ cells in extragonadal locations. *Am J Anat.*, 137: 299-336.

Zetterqvist H. 1956. The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph. D. Thesis, Karolinska Institutet, Stockholm.