



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA  
HORMONA ANTI-MULLERIANA (AMH), DEL GENE GATA-4  
Y SU COFACTOR FOG-2 EN EL OVARIO POSTNATAL DEL  
RATÓN B6.Y<sup>TIR</sup>.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A  
BIOL. CAROLINA GONZÁLEZ TORRES

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo se desarrollo en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

### **A los miembros del Comité Tutotal:**

Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza  
Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal  
Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

### **A los miembros del Jurado:**

Dr. Horacio Merchant Larios  
Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz  
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza  
Dra. María del Carmen Uribe Aranzábal  
Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

El presente trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) otorgando una beca (No. 203408) para la realización del presente estudio.

Al programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT No. IN218908-3) por la beca otorgada para concluir el estudio.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Norma Moreno Mendoza por su aceptación, dirección e invaluable apoyo y por las facilidades otorgadas para la realización del presente estudio y por el cariño brindado.

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios por su valiosa revisión al trabajo de tesis.

A la Dra. Maria del Carmen Uribe Aranzábal por revisar el trabajo y por los valiosos comentarios.

Dra. Rosa María Vigueras Villaseñor por la revisión del presente trabajo y sus comentarios.

A la Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz por sus acertados comentarios en la revisión de este trabajo.

Agradezco a la bióloga Irma Rivera y al biólogo Alejandro Parrales por su orientación en el área de biología molecular.

Al biólogo Alejandro Frías por su apoyo en la parte estadística.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y la Facultad de Ciencias.

A mis maestros.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

## DEDICATORIAS

A mis padres Andrés González y María Elena Torres por darme la vida, el amor y el apoyo incondicional en todo momento, ya que sin ellos la realización de este proyecto de vida no sería posible.

A mis hermanos Julio Andrés, Jorge y Eduardo por su cariño, por los momentos felices que me han brindado y por la confianza brindada.

A mis abuelos Felipe y Rosa, a mis tíos Yolanda y Enrique por permitirme ser parte de su familia y continuar apoyándome.

A mis amigos entrañables Alejandro Parrales, Ivonne Santiago y Cesar Guerrero, que formaran siempre parte de mi vida.

A mis compañeros del laboratorio Gilberto, Sandra, Simone, Valeria, Rocio, Alejandro y Mayeli los cuales me brindaron su amistad y apoyo, así como momentos muy agradables.

A mis amigos Rodrigo y Marta, Emmanuel, Selene y Toño, Juan Carlos, Alejandro Frías, a los cuales mantengo siempre presentes.

Y a todos aquellos que hicieron posible realizar este trabajo.

# ÍNDICE

## RESUMEN

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	Determinación sexual en mamíferos.....	1
1.2	Establecimiento de la gónada indiferenciada.....	2
1.3	Origen, proliferación y migración de las células germinales primordiales.....	3
1.3.1	Diferenciación de las células germinales primordiales en la gónada.....	5
1.4	Morfogénesis de la gónada.....	6
1.4.1	Diferenciación del testículo.....	6
1.4.2	Diferenciación del ovario.....	9
1.4.3	Genes candidatos implicados en la diferenciación del ovario.....	11
1.4.3.1	<i>Wnt4 (wingless-type MMTV integration site family, member 4)</i> .....	11
1.4.3.2	<i>Foxl2 (Forkhead box L2)</i> .....	13
1.4.3.3	<i>R-spondin 1</i> .....	15
1.5	Ovario postnatal.....	16
1.5.1	Formación de folículos primordiales.....	16
1.5.2	Crecimiento folicular.....	19
1.5.3	Genes asociados con el crecimiento folicular: Amh (anti-Müllerian hormone), GATA4 (GATA binding protein 4) y FOG2 (friend of gata 2).....	21
1.6	Reversión sexual en mamíferos.....	24
1.6.1	Ratón B6.Y <sup>tir</sup> como modelo de reversión sexual.....	24
1.6.2	Fenotipo del ratón B6.Y <sup>tir</sup> .....	24
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>28</b>
4.1	Objetivos particulares.....	28
<b>5.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>

5.1	Mantenimiento de la cepa de ratones B6.Y <sup>tir</sup> con reversión sexual.....	29
5.2	Identificación del cromosoma Y <sup>tir</sup> por PCR del gen Zfy.....	29
5.3	Monitoreo de ciclo estral.....	30
5.4	Inmunohistoquímica para la detección de la proteína de los genes Amh, Gata4 y su cofactor Fog2.....	30
5.5	Cuantificación de folículos de ovarios B6 y B6.Y <sup>tir</sup> .....	31
5.6	Diseño de oligonucleótidos.....	32
5.7	Extracción de ARN.....	32
5.8	Secuenciación.....	34
5.9	Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR).....	34
5.10	Análisis estadístico.....	36
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>63</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>
<b>9.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>79</b>

## RESUMEN

La cepa de ratón B6.Y<sup>tir</sup> representa un modelo de reversión sexual que asemeja algunas anomalías del sexo descritas en humanos. Una de las características principales de este modelo es que los machos genotípicos, a pesar de expresar genes que conducen a una vía de masculinización, sufren una reversión sexual severa, es decir, llevan a cabo un desarrollo ovárico y por consiguiente una diferenciación fenotípica femenina aunque son estériles. Estos ratones denominados hembras B6.Y<sup>tir</sup> presentan una función endocrina anormal y alteración en el ciclo estral. Sin embargo, el proceso de foliculogénesis se lleva a cabo normalmente hasta el momento de la pubertad, donde posteriormente existe una depleción masiva y precoz de folículos. A pesar de esta atrofia folicular, es posible detectar los diferentes estadios del crecimiento folicular. En estudios anteriores se ha tratado de dilucidar algunos eventos que llevan a la esterilidad prematura de las hembras B6.Y<sup>tir</sup>. Se ha encontrado que la expresión de factores como los receptores a estrógenos (Re  $\alpha$  y  $\beta$ ) se encuentran disminuidos debido a que no todas las células de la granulosa los expresan. También se ha detectado la expresión de transcritos de ARNm de Sox9, característico de las células de Sertoli en el macho, en algunos grupos de células de la granulosa. Con base en estos antecedentes, en este trabajo nos propusimos analizar la expresión de otros factores relacionados con el crecimiento folicular normal. Analizamos por RT-PCR en tiempo real los niveles de expresión del ARNm y por inmunofluorescencia el patrón de expresión de la proteína de los genes Amh, el factor de transcripción GATA4 y su cofactor FOG2 en el ovario del ratón B6.Y<sup>tir</sup>, con el fin de determinar si alguna alteración en estos factores podría estar afectando la maduración o función de los ovocitos XY<sup>tir</sup>. También se corroboró la longitud y regularidad de los ciclos estrales que presentan las hembras de la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, así como el número de folículos en diferentes etapas postnatales. Mediante el monitoreo del ciclo estral se observó que las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, al igual que las hembras normales, presentan ciclos estrales a partir de los 30 dpp, inicio de la pubertad en el ratón. Sin embargo, conforme aumentó la edad el número de ciclos disminuyó con respecto a las hembras control B6 y CD1. El monitoreo

llevado a cabo hasta los 100 dpp, indicó que no han perdido la capacidad de mantener patrones cíclicos estrales, y que la disminución de los ciclos se debe a que la etapa de diestro se prolonga. Conforme avanza la edad cronológica el número de folículos disminuye tanto en las hembras normales, como en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, debido al proceso normal de ovulación. Sin embargo, en los ovarios XY<sup>tir</sup> esta pérdida de folículos es mas evidente entre los 80 y 100 dpp, lo que sugiere, que el número de folículos que permanece en los ovarios de 100 dpp es suficiente para sostener la continuidad del ciclo estral. La expresión de las proteínas AMH, GATA4 y FOG2 es similar tanto en ovarios XX como XY<sup>tir</sup>, AMH se observó en el citoplasma de las células de la granulosa y en los ovocitos. GATA4 se localizó en el núcleo de células de la granulosa, y FOG2 en el citoplasma de los ovocitos en todas las edades analizadas de 30 a 100 dpp. Estos resultados sugieren que la localización celular de estas proteínas no está alterada en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, pero no descarta la posibilidad de que los niveles de expresión sean diferentes. El análisis por RT-PCR, mostró que los transcritos de los genes Amh, Gata4 y Fog2 se presentan tanto en ovarios XX como XY<sup>tir</sup> en todas la edades de 30 a 100 dpp. Se detectó que los niveles disminuyen conforme aumenta la edad de los ovarios encontrándose diferencias estadísticas solo en las edades de 80 a 100 dpp entre ovarios XY<sup>tir</sup> y XX. La integración de nuestros resultados nos llevan a sugerir que la disminución en los niveles de expresión puede deberse más a una pérdida precoz de folículos en los ovarios B6.Y<sup>tir</sup> que a una alteración en la función de los genes Amh, Gata4 y Fog2.

## ABSTRACT

The strain mice B6.Y<sup>tir</sup> is a model of sexual reversion, similar to some sexual anomalies described in humans. One of its features is that the genotypic males, despite expressing genes involved in the masculinization pathway, undergo severe sexual reversion, i.e, they form ovaries and develop as phenotypic females, although sterile. These mice called B6.Y<sup>tir</sup> females, present abnormal endocrine function and alterations of estrous cyclic. Nevertheless, folliculogenesis occurs normally until they reach puberty, and later, a massive and precocious depletion of follicles takes place. In spite of this follicular atrophy, the different stages of follicular growth can be observed in B6.Y<sup>tir</sup> females. Previous studies have explored the events that lead to premature sterility of these mice. Expression of factors such as oestrogen receptors (Re  $\alpha$  and  $\beta$ ) are decreased since not all granulosa cells express them. In addition, Sox9 mRNA transcripts, characteristic of male Sertoli cells, are expressed. In this study, we analyzed the expression of other factors related to normal follicular growth. We examined mRNA expression level using real-time RT-PCR, and, by immunostaining, the protein expression patterns of the genes Amh, the transcription factor Gata4 and the cofactor Fog2 in the mouse B6.Y<sup>tir</sup> ovary, to determine if alterations in these protein expression patterns affect the maturity or function of XY<sup>tir</sup> oocytes. Also, the length and regularity of the estrous cycle of B6.Y<sup>tir</sup> females and the number of follicles present at different postnatal states were corroborated. By monitoring the estrous cycle, we observed that B6.Y<sup>tir</sup> females, as normal females, start the estrous cycle at 30 dpp, which is the beginning of puberty in the mouse. However, as time passed, the number of cycles decreased compared with control B6 and CD1 females. Until 100 dpp, B6.Y<sup>tir</sup> females had not lost the estrous cyclic patterns; the observed reduction of cycles being due to a prolongation of the diestrous stage. As chronological age progressed, the numbers of follicles decreased, just as in normal females, due to a normal process of ovulation. Nevertheless, in XY<sup>tir</sup> ovaries, follicles loss was more evident between 80 and 100 dpp, suggesting that the number of follicles that remain in the ovaries of 100 dpp mice is enough to support continuity of the estrous cycle. Expression of proteins AMH, GATA4

and FOG2 was similar in XX and XY<sup>tir</sup> ovaries. We also observed AMH in the cytoplasm of granulosa cells and oocytes. GATA4 was detected in the nuclei of granulosa cells and FOG2 in the cytoplasm of oocytes at all the ages analyzed between 30 and 100 dpp. These results suggest that the cellular location of proteins is not altered in B6.Y<sup>tir</sup> females, but do not eliminate the possibility that expression levels are different.

The RT-PCR analysis showed that the transcripts of the Amh, Gata4 and Fog2 genes are present in XX and in XY<sup>tir</sup> ovaries at all ages from 30 to 100 dpp. A significant difference in levels was registered until ages 80 and 100 dpp. Our results suggest that the drop in expressed protein levels may be due to a precocious loss of follicles in B6.Y<sup>tir</sup> ovaries more than to alterations in the function of the Amh, Gata4 and Fog2 genes.

## 1. INTRODUCCIÓN

Una característica de muchas especies de animales es la existencia de individuos sexualmente dimórficos, distinción con una finalidad reproductora. En el caso de los mamíferos, el dimorfismo sexual se establece en el momento de la fertilización y se determina en etapas tempranas del desarrollo. En la determinación sexual se establecen eventos que permiten a una gónada indiferenciada desarrollarse como testículo o como ovario, mientras que en la diferenciación sexual se llevan a cabo los mecanismos que establecen los fenotipos de macho o hembra (Parker *et al.*, 1999).

El desarrollo sexual, en el caso de los mamíferos, se caracteriza por tres eventos secuenciales:

**Determinación cromosómica:** el sexo genético se establece en la fecundación dado por la complementación cromosómica proporcionada por los progenitores.

**Diferenciación gonadal:** es el establecimiento de la gónada indiferenciada, y su desarrollo en un ovario o testículo, dependiendo del sexo genético del individuo.

**Diferenciación del sexo fenotípico:** comienza en la vida fetal y continúa hasta la pubertad. En esta etapa, los productos endocrinos de la gónada dirigen la diferenciación de los genitales internos y externos.

### 1.1 Determinación sexual en mamíferos

En los mamíferos el establecimiento del sexo genético ocurre durante la fecundación y depende estrictamente de la dotación cromosómica de los progenitores. Las hembras poseen dos cromosomas XX, aportando a cada uno de sus gametos un cromosoma X; y el macho al poseer una constitución XY puede generar gametos que contengan un cromosoma X ó Y. Por lo tanto los machos determinan el sexo genético de la descendencia.

El desarrollo masculino está relacionado con la presencia del cromosoma Y debido a que contiene un gen que codifica para un factor determinante del

testículo (FDT); este factor organiza el desarrollo testicular, y en su ausencia todos los eventos de diferenciación son dirigidos hacia el desarrollo de ovarios. Este gen se denomina SRY en humanos (Berta *et al.*, 1990) y Sry en ratón (Koopman *et al.*, 1991). La expresión del gen Sry en mamíferos, parece ser suficiente para iniciar la cascada de eventos que llevan a la diferenciación testicular a partir de una gónada indiferenciada bipotencial.

Por lo tanto la determinación sexual depende de una compleja expresión y regulación de genes (o factores) presentes tanto en cromosomas sexuales como autosómicos de la gónada indiferenciada (Parker *et al.*, 1999).

## **1.2 Establecimiento de la gónada indiferenciada**

El desarrollo gonadal en los mamíferos puede dividirse en dos etapas; la primera comprende el establecimiento de una gónada indiferenciada, en ambos sexos. El establecimiento de la gónada indiferenciada en el ratón se da aproximadamente entre los 9.5 a 11.5 días postcoito (dpc) e implica eventos de proliferación y migración de células somáticas, así como el depósito de una matriz extracelular y el arribo de las células germinales primordiales (CGP) de origen extraembrionario. La segunda fase, comprende la diferenciación de la gónada en un testículo o en un ovario, siendo el mecanismo responsable de este evento la expresión de genes específicos como Sry en la gónada masculina, que derivan en cambios morfológicos y fisiológicos en las gónadas (Merchant y Moreno, 1996; Wilhelm *et al.*, 2007).

La gónada indiferenciada, denominada en un inicio cresta genital, surge como una estructura pareada dentro del mesodermo intermedio, ocupando parte de la cavidad celómica, entre los 8 y 9 dpc. El mesodermo intermedio comprende tres segmentos, que se distinguen desde la región anterior a la posterior: 1) pronefros, el cual incluye el primordio adrenal; 2) mesonefros, que es la región central del cual surge la cresta genital y 3) metanefros, que es la región posterior de la cual se formaran los riñones. La cresta genital se forma por la proliferación activa de las células del epitelio celómico en la superficie ventromedial del mesonefros y la

condensación de células mesenquimatosas que llevan a la organización de los túbulos mesonéfricos (Loffler y Koopman, 2002; Wilhelm *et al.*, 2007). Posteriormente se da la invasión de vasos sanguíneos desde la región mesonéfrica y la migración de las CGPs hacia la cresta genital. Este evento ocurre en el ratón entre los 10 y 11 dpc (Merchant y Moreno 1996; Parker *et al.*, 1999; Moreno *et al.*, 2003).

Este primordio gonadal sufre una diferenciación tisular, evento que antecede a la diferenciación sexual de la gónada, el cual está constituido de células somáticas de tipo mesenquimático (laxamente distribuidas), mesoteliales (del epitelio celómico) y endoteliales (de vasos sanguíneos). Tanto las células mesenquimáticas como las mesoteliales presentan una gran actividad mitótica cuando arriban a la gónada las CGPs, llegando a condensarse de manera que forman un agregado compacto el cual se denomina “blastema gonadal”. A partir de esta estructura se diferencian dos tejidos gonadales: los cordones sexuales y el estroma. Los cordones sexuales están formados por arreglos epiteliales delimitados por una lámina basal y rodean a las CGP. El compartimento estromático esta constituido por las células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos los cuales irrigan a la gónada indiferenciada (Merchant y Taketo, 1991). Los tejidos ya formados en la gónada indiferenciada constituyen los elementos histológicos que conducirán a la diferenciación de células específicas del testículo y del ovario.

### **1.3 Origen, proliferación y migración de células germinales primordiales**

En el caso de los mamíferos las células germinales primordiales (CGPs) no se originan dentro de la cresta genital (Wilhelm *et al.*, 2007), es decir tienen un origen extraembrionario. Chiquoine en 1954 determinó el origen extragonadal de las células germinales primordiales (CGPs) por su actividad a la fosfatasa alcalina. Este y otros estudios han sugerido diferentes sitios de origen para las CGP, los cuales incluyen la cresta primitiva posterior (Chiquoine 1954; Snow 1981; Coop *et al.*, 1986), el endodermo del saco vitelino (Chiquoine, 1954) y el mesodermo del

alantoides. Mas tarde, Ginsburg y colaboradores (1990) identificaron en el ratón un pequeño grupo de células cerca de la base del alantoides a los 7.5 días post coito que reportaron como la población inicial de CGPs. Sin embargo, estudios realizados por Lawson y Hage (1994 a y b) muestran a los precursores de las CGPs en el ratón como una población de células pluripotenciales en el epiblasto proximal cerca del ectodermo extraembrionario entre los 6.5 y 7.5 dpc, formando parte del mesodermo extraembrionario presuntivo. En este grupo de células se requiere que un factor denominado BMP4 induzca a las células del epiblasto a convertirse en precursoras de CGP y en mesodermo extraembrionario. Los primeros indicios que permitieron establecer el papel de BMP4 en el origen de las células germinales primordiales, se deriva de las observaciones hechas en embriones de ratón homocigotos nulos para este gen, estos individuos pierden sus células germinales, alantoides y tejidos derivados del mesodermo extraembrionario. En el caso de embriones heterocigotos para este gen poseen un número menor de CGPs en comparación con individuos normales (Lawson *et al.*, 1999). Otros genes fueron identificados en el proceso de formación de la línea germinal, la población de células capaces de generar las CGPs expresan el gen *fragilis* a los 7.25 dpc, el cual codifica para una proteína transmembranal. Sin embargo, también se determinó que en el centro de esta población de células que están expresando *fragilis* se encuentra un pequeño grupo celular que también expresa el gen *stella* y son estas células las que están restringidas al destino celular germinal (Saitou *et al.*, 2002).

Una vez formadas las CGPs migran desde la región posterior de la línea primitiva al endodermo embrionario, el cual dará origen al intestino posterior (Tam y Snow, 1981, Molyneaux y Wylie, 2004). Sin embargo, algunas CGPs ingresan al alantoides aquí, su destino es incierto, pero se cree que mueren.

Por otra parte, se ha demostrado que durante este proceso, las CGPs presentan características de movimiento tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Clark y Eddy 1975; Godin *et al.*, 1990). A este respecto, los estudios realizados por Anderson y colaboradores (2000) con ratones transgénicos en los cuales la proteína verde fluorescente es expresada en las CGPs bajo el control de un

promotor truncado de Oct-4, permitieron observar la actividad migratoria de las CGPs desde que abandonan la cresta primitiva. Esta migración ocurre en el embrión de ratón durante el proceso de gastrulación, entre los 7.5 a 8 dpc. A los 8.5 dpc, las células germinales se encuentran dispersas en el intestino posterior. Para los 9 dpc, el intestino posterior se ha extendido y se ha cerrado para formar una estructura tubular, confinando en su interior a las CGPs, las cuales se mueven activamente sólo dentro de esta estructura. Entre el día 9 y 9.5, las CGPs emergen desde el lado dorsal del intestino posterior y comienzan a migrar hacia la cresta genital, a los 10.5 dpc se les puede observar formando un grupo de células migrando.

Hacia los 11.5 dpc, las CGPs ingresan en la cresta genital. Todo el proceso de migración toma aproximadamente cuatro días (7.5-11.5 dpc), tiempo durante el cual las CGPs proliferan teniendo una población inicial de 10 a 100 células llegando a ser de 2500 a 5000 células, presentes en la gónada a los 12 dpc (Anderson *et al.*, 2000; Molyneaux y Wylie 2004; Gilbert 2005).

### **1.3.1 Diferenciación de las células germinales primordiales en la gónada**

Una vez que las CGPs se encuentran en la gónada, su desarrollo en ovocitos o espermatogonias depende del tiempo en el cual inician la meiosis. Si la meiosis comienza durante el desarrollo fetal como ocurre en el caso del ovario de ratón a los 13.5 dpc, estas células formarán los ovocitos primarios, los cuales quedaran arrestados en la profase I de la meiosis. En el caso del testículo, las CGPs quedan en arresto mitótico en la fase G0/G1, estado en el que permanecen hasta después del nacimiento. Las CGPs en el testículo iniciarán la meiosis sólo hasta alcanzar la pubertad.

Investigaciones recientes han revelado el mecanismo que regula el destino específico de las CGPs durante el desarrollo de la gónada fetal en el ratón. El ácido retinoico producido por el mesonefros funciona como un inductor del inicio de la meiosis en ambos sexos (Koubova *et al.*, 2006; Bowles *et al.*, 2006), y durante la etapa embrionaria, promueve que las CGPs en el ovario expresen el

gen Stra8 (Stimulated by Retinoic Acid Gene 8) requerido para la transición a la meiosis e inicio del proceso de ovogénesis. En las CGPs del ovario de ratón la expresión de Stra8 ocurre antes de los 12.5 dpc, justo un día antes de que se inicie la meiosis, en este momento las CGPs se caracterizan por presentar cromatina altamente condensada. La expresión de Stra8 en el ovario ocurre de la zona anterior a la posterior, este patrón de expresión es seguido por otros marcadores meióticos tales como Dmc1 (recombinasa meiótica) y Scp3 (proteína del complejo sinaptonémico). En el caso del testículo fetal el inicio de la meiosis prenatal es inhibida por la acción de la enzima que degrada el ácido retinoico, la CYP26B1, la cual se expresa en las células de Sertoli (Bowles *et al.*, 2006), previniendo la prematura expresión de Stra8 (Koubova *et al.*, 2006).

## **1.4 Morfogénesis de la gónada**

### **1.4.1 Diferenciación del testículo**

Los primeros eventos morfológicos de la diferenciación de la gónada en mamíferos se aprecian en el macho. En el caso del ratón, la diferenciación testicular se inicia a los 12.5 dpc con la formación de los cordones testiculares, precursores de los túbulos seminíferos en la vida adulta. Su formación se da cuando los cordones sexuales se separan del epitelio celómico, debido a un incremento de mesénquima e invasión de vasos sanguíneos, lo que conduce a la compactación de los cordones. Una vez que comienza la segregación de los cordones sexuales, estos migran a la región medular de la gónada, lo que provoca cambios en la adhesividad de las células epiteliales e inducción del depósito de moléculas principalmente laminina y colágena, las cuales forman la lámina basal que rodea a los cordones testiculares. La lámina basal delimita dos compartimentos, uno constituido por los cordones testiculares y el otro por tejido estromático (Merchant y Moreno, 1996; Wilhelm *et al.*, 2007). Las células del epitelio interno que forman los cordones testiculares, se denominan células de Sertoli y poseen diversas funciones. En etapas embrionarias, se asocian con las

CGPs y las empaquetan, además sintetizan la hormona anti-Mulleriana (Josso *et al.*, 1977), responsable de la regresión de los conductos Mülllerianos (Jost, 1953). Las células de Sertoli, forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplasmáticas las cuales permiten la interacción con las CGPs siendo capaces de rodearlas y agruparlas, esto provee un microambiente controlado y crea un espacio de protección inmunológica, además de brindar todos los nutrientes y factores de crecimiento requeridos para el completo desarrollo de las células espermatozógenas (Carreau *et al.*, 1994; Schlatt *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 2002). Estas células sólo proliferan en etapa fetal y por un periodo breve en etapa postnatal. La hormona anti-Mulleriana (AMH), también conocida como hormona inhibidora de los conductos de Müller (MIS) es un miembro de la familia de factores de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), y es secretada específicamente por las células de Sertoli en testículos fetales y adultos (Cate *et al.*, 1990). Es la primera sustancia secretada por las células de Sertoli durante su diferenciación en la etapa de desarrollo testicular. La expresión de MIS se localiza incluso en ausencia de CGPs en modelos de ratones mutantes en el locus W (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991).

Actualmente, se considera que la diferenciación testicular es inducida por la expresión del gen Sry en un subgrupo de células somáticas que se diferenciarán en células de Sertoli. Este gen se expresa en la gónada desde los 11.5 dpc, su expresión se asocia con las células somáticas o células pre-Sertoli de la cresta genital, pero no con las CGPs (Koopman *et al.*, 1990; Rossi *et al.*, 1993). Por muchos años las evidencias definitivas de la expresión endógena de Sry *in situ* en el modelo de ratón fue complicada (Wilhelm *et al.*, 2007). Sin embargo, los modelos de ratones transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (GFP) bajo el control del promotor del gen Sry, sugieren que la expresión de Sry se restringe al linaje de las células de Sertoli (Albrecht y Eicher, 2001). Recientes estudios han permitido el desarrollo de un anticuerpo para SRY en el ratón, demostrando que el grupo de células que expresan SRY casi de forma inmediata inician la coexpresión de SOX9, el cual también representa un marcador del linaje de Sertoli (Wilhelm *et al.*, 2005; 2007). La diferenciación de células pre-Sertoli a

células de Sertoli comienza cuando ellas se polarizan y forman agregados epiteliales que se ensamblan para formar los cordones testiculares, este evento está acompañado por un cambio en la expresión de proteínas de la matriz extracelular (Frojdman *et al.*, 1992). Con base en esto, las células de Sertoli son aquellas que expresan Sox9 y forman parte de la estructura de los cordones testiculares (Wilhelm *et al.*, 2007). En mamíferos, la expresión del gen Sox9, junto con otros genes autonómicos como Sf1, Wt1 y Gata4 promueven la activación de MIS (Marshall y Harley, 2000; De Santa Barbara *et al.*, 2000). Por lo tanto, Sry puede actuar solo como el “interruptor” que promueve la regulación positiva de Sox9 para la condensación de las células epiteliales de macho y así iniciar la diferenciación testicular (Moreno *et al.*, 2003).

Paralelamente a la diferenciación de las células de Sertoli, la gónada incrementa su tamaño, como se había mencionado previamente por la migración y proliferación de células del mesonefros adyacente, este proceso inicia después de la expresión del Sry y está involucrado en la formación del tejido estromático el cual está rodeando a los cordones testiculares y está constituido por diferentes tipos celulares: células mioides peritubulares, células endoteliales, fibroblastos y células de Leydig.

En el ratón las células mioides peritubulares, forman una única capa de células de tipo planas que rodean a las células de Sertoli delimitando los cordones testiculares. Poseen dos funciones principales: 1) contribuyen a la formación estructural de los cordones testiculares junto con las células de Sertoli, ya que ambos tipos celulares secretan componentes de la matriz extracelular que forman la lámina basal entre sus respectivas capas (Skinner *et al.*, 1985); 2) en la etapa adulta promueven el movimiento de los espermatozoides maduros a través de los túbulos seminíferos, para exportarlos a la vesícula seminal, esta función es posible por sus características parecidas al músculo liso. Estas células expresan actina de músculo liso  $\alpha$  y la proteína desmina que les permiten contraerse (Tripiciano *et al.*, 1998; Wilhelm *et al.*, 2007). Las células endoteliales, fibroblastos, así como tipos celulares de la sangre tales como macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y monocitos forman la vasculatura propia del testículo junto con la formación de

prominentes vasos sanguíneos en la superficie de la gónada y entre los cordones testiculares (Wilhelm *et al.*, 2007). Las células de Leydig poseen actividad endocrina ya que realizan la síntesis de andrógenos, se diferencian poco después de la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de cordones testiculares (Merchant y Moreno, 1996), y son evidentes en el ratón a los 14 dpc. Morfológicamente, las células de Leydig poseen crestas tubulares, gran acumulación de retículo endoplásmico liso, un aparato de Golgi desarrollado, gotas de lípidos e inclusiones de glucógeno en el citoplasma (Russo y De Rosas, 1971). Estas células están involucradas en la masculinización fetal y en el mantenimiento de las características sexuales secundarias en el macho (Wilhelm *et al.*, 2007).

#### **1.4.2 Diferenciación del ovario**

El ovario, a diferencia del testículo, durante la etapa de diferenciación gonadal presenta cambios morfológicos poco evidentes con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada. A los 12.5 dpc, sólo se observa cierto crecimiento debido a la proliferación de células somáticas y de CGPs. Las CGPs durante su proliferación comienzan a diferenciarse en ovogonias. Estas células pierden las características que les permitieron su migración activa hasta colonizar la cresta gonadal, tiñen con menor intensidad para la actividad de fosfatasa alcalina, adquieren una forma más esférica y disminuye la cantidad de organelos en su citoplasma.

La población de ovogonias incrementa a través de un número de divisiones mitóticas y estas células entran en meiosis, las cuales ahora se denominan ovocitos primarios. En el caso del ovario de ratón, las ovogonias presentan aproximadamente 4 ciclos mitóticos antes de iniciar la meiosis entre los 13.5 y 16 dpc, de un periodo de gestación de 19 días. Las primeras ovogonias que inician la división meiótica se localizan en el área menos innervada del ovario en la zona del córtex (Picton, 2001). Entre los 13.5 y 14 dpc, se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. A los 15 y 16 dpc, la gran

mayoría de los ovocitos se encuentran en las etapas de cigoteno y paquiteno, éste último se caracteriza por la presencia de complejos sinaptonémicos, estructura que permite la unión de los cromosomas homólogos para llevar a cabo el entrecruzamiento de material genético. Sin embargo, los ovocitos no concluyen la profase I de la meiosis, debido a que sólo progresan hasta la etapa de diploteno, en donde quedan arrestados.

Se ha reportado que en muchas especies de mamíferos ocurre una pérdida masiva de ovocitos antes del nacimiento (Beaumont y Mandl, 1962; Baker, 1963; Burgoyne y Baker, 1985). McClellan y colaboradores (2003) han demostrado que existe un proceso de degeneración de ovocitos entre los 13.5 y 14.5 dpc, a los 15.5 y 16.5 dpc, entre el día del nacimiento y el día 1 post parto (dpp). Estos períodos corresponden a la fase S-premeiótica, la etapa de cigoteno y el final del paquiteno, respectivamente. Sin embargo, sus observaciones sugieren que podrían ser múltiples causas las responsables de la pérdida de estos ovocitos, las cuales podrían incluir la necesidad de factores tróficos, errores en el proceso de mitosis o durante el apareamiento de los cromosomas homólogos, así como defectos en los telómeros de los cromosomas.

Los ovocitos primarios que sobreviven quedan en estado quiescente hasta la pubertad, etapa en la que se seleccionan los que serán ovulados (Picton, 2001). Para que este proceso se lleve a cabo, es decir para que se generen ovocitos capaces de ser fertilizados a lo largo de la vida reproductora de los mamíferos, se requiere de una comunicación estrecha entre las células germinales y somáticas del ovario. Las interacciones entre estos dos tipos celulares, permitirán la formación de la unidad funcional del ovario, denominada folículo primordial. Estos folículos primordiales, posteriormente serán reclutados dentro de una fase de crecimiento que culmina con el reinicio de la meiosis y la ovulación de un ovocito maduro hacia el oviducto, preparado para su fertilización.

### 1.4.3 Genes candidatos implicados en la diferenciación del ovario

#### 1.4.3.1 *Wnt4* (*wingless-type MMTV integration site family, member 4*)

Wnt4 es un gen conservado en todos los grupos de vertebrados, en mamíferos está involucrado en la formación del riñón. Ratones que pierden el gen Wnt4, mueren poco tiempo después de haber nacido debido a fallas en este órgano (Stark *et al.*, 1994). Wnt4 se requiere para la transformación de tejido mesenquimal en epitelial, evento que es importante para la formación de los túbulos del riñón (Kisper *et al.*, 1998). Este gen también se expresa en estructuras tales como el mesonefros y la gónada, los cuales están en asociación con los conductos Mülllerianos, lo que lleva a la conclusión de que Wnt4 es importante en el desarrollo del tracto reproductivo femenino.

El trabajo de Vainio y colaboradores (1999) demostró que ratones XX, los cuales pierden el gen Wnt4 a causa de mutaciones presentan fenotipo masculino, con desarrollo de conductos de Wolff. Esto sugirió que el desarrollo del ovario es un mecanismo regulado genéticamente y no se da únicamente en ausencia del gen Sry (Bernard y Harley, 2007).

Sin embargo, estudios posteriores también en embriones de ratón XX determinaron que la pérdida del gen Wnt4 que conduce a la masculinización, no presentan marcadores de células de Sertoli y no hay desarrollo de tejido testicular en la gónada, es decir sólo se presenta una reversión sexual parcial de hembra a macho, concluyendo que Wnt4 no es un gen primario determinante del sexo. Aunado a esto, ratones XY con sobre expresión de Wnt4 no inician desarrollo ovárico y no exhiben reversión sexual de macho a hembra (Biason-Lauber *et al.*, 2004; Jeays-Ward *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2003).

Wnt4 también participa en la formación vascular de la gónada en desarrollo, en los machos y en hembras knockout para Wnt4<sup>-/-</sup> se ha observado que las células endoteliales mesonefricas migran hacia la gónada y participan en la formación de vasos sanguíneos típicos de machos (Brennan *et al.*, 2002; Jeays-Ward *et al.*, 2003; Martineau *et al.*, 1997). Las observaciones hechas de estos trabajos, indican

que una de las funciones normales de Wnt4 es impedir la migración de células desde el mesonefros al ovario en desarrollo, por lo que resulta necesario que en el caso de la gónada de machos se dé una disminución en la expresión de este gen, poco después de que inicia la expresión del gen Sry (Bernard y Harley, 2007). Estos antecedentes fueron confirmados mediante la formación de ratones transgénicos con sobre-expresión de Wnt4 (Wnt4tg), las gónadas XY con esta condición presentaron formación desordenada de vasos sanguíneos (Jeays-Ward *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2001).

Por otra parte, en el proceso de vascularización de la gónada otro gen está involucrado, la Folistatina, el cual es un potencial efector cascada abajo de Wnt4. Los ratones hembra knockout para este gen (*Fst<sup>-/-</sup>*), desarrollan un fenotipo idéntico al observado en gónadas knockout para Wnt4, con formación de vasos sanguíneos. Yao y colaboradores (2004) determinaron que gónadas de ratón XX con pérdida del gen Wnt4, no expresan folistatina, lo que indicó que efectivamente este gen actúa cascada abajo de Wnt4. Actualmente, se sabe que estos dos genes Wnt4 y folistatina suprimen la acción de Inhibina B, en el desarrollo de la gónada normal XX, ya que este gen en las gónadas XY contribuye a la formación de vasos sanguíneos (Yao *et al.*, 2006).

En cuanto a la regulación de la expresión de Wnt4 en el desarrollo de la gónada de ratón, se ha demostrado mediante hibridación *in situ* que Wnt4 se expresa antes de la formación de la gónada, en el mesénquima mesonéfrico en machos y hembras a los 9.5 dpc. Posteriormente, Wnt4 está presente en la gónada presuntiva (primordio gonadal) a los 10 dpc y su expresión se mantiene hasta los 11.5 dpc en ambos sexos, sin embargo después de esta edad en la gónada de machos la expresión de Wnt4 disminuye mientras que en la gónada de hembras continúa (Barrionuevo *et al.*, 2006; Vainio *et al.*, 1999). Wnt4 se expresa únicamente en las células somáticas (Vainio *et al.*, 1999). La disminución en la expresión de Wnt4 en la gónada de macho, parece ser un evento que es regulado por señales específicas, el trabajo de Barrionuevo y colaboradores (2006) en el cual realizaron el análisis de gónadas XY knockout para Sox9 reveló que Wnt4 es expresado a los 12.5 y 15.5 dpc, a pesar de la presencia del gen Sry, por el

contrario la sobre expresión de Sox9 en una gónada XX, provoca una disminución en los niveles de transcritos de Wnt4. Estos hallazgos demostraron que Sox9 participa, ya sea de forma directa o indirecta en la represión de la expresión de Wnt4 en la gónada masculina.

#### 1.4.3.2 *Foxl2* (Forkhead box L2)

El gen *Foxl2* pertenece a una familia de factores de transcripción denominados cabeza de horquilla, los cuales están involucrados en el desarrollo embrionario de mamíferos, identificados en un inicio durante la formación de la glándula pituitaria, y posteriormente se determinó que son necesarios para el establecimiento de los ejes del cuerpo, del desarrollo de las tres capas germinales y el control del ciclo celular. Tienen en común un dominio de unión al DNA de aproximadamente 110 aminoácidos con una estructura de hélice-vuelta-hélice (Treier *et al.*, 1998; Carlsson *et al.*, 2002). *Foxl2*, ha sido relacionado con una enfermedad congénita, el síndrome de blefarofimosis, ptosis y epicanto inverso (BPES), el cual se caracteriza por anomalías en los párpados y se asocia con falla prematura del ovario, lo cual sugiere que este factor está implicado en el desarrollo y mantenimiento del párpado y del ovario (Crisponi *et al.*, 2001). La expresión de *Foxl2* es dimórfica, se detecta desde los 12.5 dpc en gónadas femeninas y no en gónadas masculinas. Además, estos patrones de expresión están conservados entre diferentes grupos de vertebrados. Los transcritos de *Foxl2*, se localizan en las células mesenquimáticas que constituyen el ovario y posteriormente en células de la granulosa, aunque su expresión disminuye en etapa postnatal (Loffler *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004). Estudios en ratones que acarrean una mutación homociga en *Foxl2*, confirmaron que este gen es esencial para la función ovárica, ya que las células de la granulosa en ovarios de ratones *Foxl2*<sup>-/-</sup> no son capaces de completar la transición de células de tipo planas (escamosas) a cuboidales lo que conduce a la ausencia de folículos secundarios y atresia folicular. Esto indica que *Foxl2* es esencial en la diferenciación de células de la granulosa. Se demostró también que en ovarios *Foxl2*<sup>-/-</sup>, la expresión de activina-βA y la hormona anti-

mulleriana, dos factores inhibidores de la activación de folículos primordiales, están ausentes o disminuyen drásticamente. Por el contrario, aproximadamente dos semanas después del nacimiento la mayoría de los ovocitos de ovarios *Foxl2*<sup>-/-</sup> expresan *Gdf9* lo que indica que casi todos los folículos primordiales han iniciado su crecimiento en este estado. Esta activación precoz, en ausencia de células de la granulosa funcionales es la que conduce a la atresia de los ovocitos y a depleción folicular progresiva (Schmidt *et al.*, 2004, Uhlenhaut *et al.*, 2006). A su vez, en los ovarios mutantes para *Foxl2*, se encontró expresión ectópica de *Sox9* (Ottolenghi *et al.*, 2005). Sin embargo, la función de *Foxl2* en el ovario parece solo esencial durante el proceso de reclutamiento inicial de folículos primordiales después del nacimiento (Schmidt *et al.*, 2004), ya que los ovarios de ratones mutantes *Foxl2*<sup>-/-</sup> no presentan defectos durante el desarrollo temprano que conduzca a reversión sexual en hembras de ratón XX. Sin embargo, un número de genes han sido inactivados en modelos knockout en ratón incluyendo *Wnt4*, la pérdida de este gen en individuos XX, conduce a la disgenesia ovárica con producción temprana de testosterona por parte de las células mesenquimáticas y genitales internos masculinos, a su vez, las células germinales inician el proceso de ovogénesis antes de su degeneración y las células de soporte de la gónada adquieren características parecidas a las de testículo sólo parcialmente y en etapas muy cercanas al nacimiento. Por lo tanto, *Wnt4* y *Foxl2* presentan un fenotipo complementario en la diferenciación del ovario, *Wnt4* requerido de etapas muy tempranas para la diferenciación del tejido estromático y sobrevivencia de los ovocitos y el papel de *Foxl2* radica principalmente en la formación de los folículos (Ottolenghi *et al.*, 2007). De lo anterior se considero que la pérdida de estos dos genes podría conducir a la completa reversión sexual de hembra a macho. Ottolenghi y colaboradores (2007), reportaron un doble knockout para los genes *Wnt4* y *Foxl2*, demostrando que la inactivación de estos dos genes que se expresan en las células somáticas del ovario provoca la diferenciación testicular en un individuo XX.

#### 1.4.3.3 *R-spondin 1*

R-spondin 1, pertenece a una familia recientemente identificada de ligandos que interactúan con un receptor complejo Fzd/LRP (representative frizzled receptor FZD y la proteína co-receptor LRP), los cuales están involucradas en el desarrollo de varios órganos tales como la formación de los dedos (RSPO4) y la placenta (Rspo3) (Bergmann *et al.*, 2006; Blaydon *et al.*, 2006). En el caso de R-spondin 1, el análisis de ARN mediante la técnica de northern blot, demostró que este gen presenta niveles altos de expresión en tejidos de humano adulto, en la glándula adrenal, ovario, testículo, así como, en tiroides, traquea, columna espinal, estomago, leucocitos, colón, intestino delgado, próstata, timo y bazo (Parma *et al.*, 2006). Parma y colaboradores (2006), identificaron que R-spondin 1, se encontraba mutado en dos familias independientes, el fenotipo de estos individuos (46, XX, Sry negativos) pertenecientes a estas familias se caracterizó por la presencia de hiperqueratinosis palmoplantar, predisposición a carcinoma de células escamosas de la piel y reversión sexual completa de hembra a macho. La reversión en estos individuos se confirmó por la ausencia de derivados del conducto de Müller y la presencia de genitales internos y externos masculinos. Sin embargo, todos los individuos en esta condición son estériles debido probablemente a la presencia de dos cromosomas sexuales X y la ausencia del cromosoma Y. Estos datos sugieren que Rspo1 no se requiere para la diferenciación y función testicular. A su vez, el grupo de Parma observó la expresión específica de este gen en la cresta urogenital desde los 10.5 dpc en el epitelio celómico, entre los 10.5 y 11 dpc no observaron diferencias en los niveles de transcritos de Rspo1 entre gónadas XX y XY. A los 12.5 dpc encontraron un claro incremento en la expresión de este gen en gónadas XX y aproximadamente a los 14.5 dpc, la expresión de Rspo1 en la gónada femenina se presentó cinco veces más alta que en las gónadas XY, esto sugiere, que la expresión de Rspo1 está regulada en un tiempo específico durante el proceso de determinación sexual en humanos y que es necesario para la diferenciación sexual de la hembra. Sin embargo, hasta el momento no se ha demostrado que la expresión ectópica de

este gen en individuos XY resulte en el desarrollo de una hembra. Y por otra parte, aunque parece que *Rspo1* se encuentra conservado entre el humano y el ratón, es claro que podrían existir diferencias con respecto a los efectos de las dosis del gen entre estos dos modelos. Es decir, los fenotipos presentes en humanos ante la ausencia de *Rspo1*, no necesariamente reflejan un proceso de determinación sexual femenina entre todas las especies (Wilhelm, 2007).

## **1.5 Ovario postnatal**

### **1.5.1 Formación de folículos primordiales**

El inicio de la meiosis en el ovocito coincide con el principio de la foliculogénesis, proceso definido por la formación de folículos primordiales en el ovario de los mamíferos, a partir de estructuras denominadas cordones sexuales u ovígeros (Merchant, 1984; Loffler y Koopman, 2002). La formación de los cordones ovígeros se da durante el desarrollo del ovario embrionario, entre los 12 y 13.5 dpc (Odor y Blandau, 1969a; Konishi *et al.*, 1986). Estos cordones están formados por grupos de CGPs rodeadas por células somáticas con apariencia mesenquimática. Se ha demostrado que las CGPs dentro de estos cordones están físicamente conectadas a través de puentes citoplasmáticos formando cistos. Los cistos derivan de una incompleta citocinesis de las CGPs cuando se dividen mitóticamente antes de que éstas células inicien la meiosis (Pepling y Spradling, 1998). Entre el día 1 y 3 después del nacimiento, se lleva a cabo una rápida reorganización de la morfología del ovario, los puentes intercelulares entre los ovocitos dentro de los cordones ovígeros se disocian y los ovocitos comienzan a ser rodeados por una monocapa de células epiteliales de forma plana, denominadas células de pregranulosa (Pepling y Spradling, 2001).

Por lo tanto, el proceso de foliculogénesis, se divide en tres etapas (Merchant y Chimal, 1989). 1) Los ovocitos se encuentran dentro de los cordones sexuales formando grupos, interconectados mediante los puentes citoplasmáticos; 2) Los ovocitos rompen sus uniones intercelulares en el interior de los cordones ovígeros

por células epiteliales, estas células somáticas eventualmente forman una capa completa de células prefoliculares que individualiza a los ovocitos; 3) Los ovocitos junto con las células prefoliculares son individualizados, formando los folículos primordiales (Loffler y Koopman, 2002). Durante este evento se lleva a cabo el depósito de una lámina basal alrededor de la periferia de los folículos, que los separa de las células del estroma (Merchant y Chimal, 1989; Rajah *et al.*, 1992; Gougeon, 1996). La organización folicular inicia en la región cortical del ovario, la cual es la menos inervada.

Observaciones hechas en roedores, los cuales carecen de ovocitos, mostraron ser deficientes en folículos (Columbre y Russell, 1954; Hirshfield, 1994), lo que sugirió que los ovocitos representan un papel importante en la formación y crecimiento de los folículos (Soyal *et al.*, 2000). Estudios recientes han identificado un factor de transcripción específico del ovocito, denominado  $\text{Fig}\alpha$  (factor en la línea germinal,  $\alpha$ ). Este factor fue primero caracterizado en la expresión coordinada de los tres genes de la zona pelucida (Liang *et al.*, 1997). Los transcritos de  $\text{Fig}\alpha$ , se detectan desde los 13 dpc, y persisten en la vida adulta. En ratones hembras que pierden  $\text{Fig}\alpha$ , el desarrollo de la gónada es normal hasta los 18 dpc, sin embargo, en la etapa perinatal, no se da la formación de folículos primordiales, los ovocitos degeneran y los ovarios disminuyen en tamaño, en los cuales solo se pueden observar estructuras parecidas a cordones sexuales formados por células somáticas. Las hembras que carecen de  $\text{Fig}\alpha$  son estériles, mientras que los machos no parecen ser afectados a la ausencia de este gen. Estos datos sugieren que  $\text{Fig}\alpha$  podría regular la formación inicial de los folículos primordiales y modular la sobrevivencia de los ovocitos (Epifano y Dean, 2002). Sin embargo, existen otros genes que están involucrados en el inicio de la foliculogénesis. Un fenotipo similar al de la ausencia del gen  $\text{Fig}\alpha$ , se ha descrito en hembras de ratón que pierden el gen  $\text{Wnt4}$ , el cual se expresa en las células somáticas. A los 14.5 dpc, el ovario carente de  $\text{Wnt4}$  posee un número normal de ovocitos, pero en el nacimiento, menos del 10% permanece y continúan degenerando (Vainio *et al.*, 1999), por lo que presentan escasos folículos primordiales. Por otra parte, en estos ovarios, algunas células somáticas muestran parcial transdiferenciación en

células de Sertoli. Estos dos genes, *Foxg1* y *Wnt4*, expresados en diferentes linajes celulares parecen ser importantes en el mantenimiento post-meiótico de los ovocitos y en la formación de los folículos primordiales (Epifano y Dean, 2002).

Una gran parte de los ovocitos que se encuentran en la gónada, forman folículos primordiales sin embargo otros degeneran llevando a cabo un proceso de atresia folicular. Este proceso permite la diferenciación del tejido intersticial esteroideogénico del ovario, es decir permite la formación de la glándula intersticial primaria (Merchant y Centeno, 1981).

Las CGPs en el ovario embrionario forman grupos denominados sincicios, los cuales se encuentran unidos mediante puentes citoplasmáticos, por los cuales los organelos pueden ser intercambiados. Posteriormente, los sincicios se disocian. El rompimiento de estos grupos es un proceso programado el cual se da antes de la formación de los folículos. La muerte masiva de los ovocitos se correlaciona con el rompimiento de los puentes intercelulares en los últimos estados de gestación, sin embargo, sólo un subgrupo de ovocitos dentro de los sincicios individuales muere (Pru y Tilly, 2001; Pepling y Spradling, 2001). La necesidad de la muerte de las CGPs a gran escala puede reflejar una activa redistribución de los componentes citoplasmáticos entre los ovocitos dentro de los sincicios.

El rompimiento del grupo de CGPs es un mecanismo importante para entender la formación de los folículos primordiales. Estudios en ratón y oveja revelaron que antes del nacimiento las células somáticas son las que invaden el grupo de CGPs, penetrando entre los puentes intercelulares (Lawson y Hage, 1994; Merchant y Chimal, 1989; Odor y Blandau, 1969b; Byskov, 1978). El rompimiento de los sincicios ocurre justo antes de que los folículos primordiales sean ensamblados, sugiriendo que las células de la granulosa juegan un papel activo en el rompimiento de los sincicios y la formación de los folículos primordiales (Epifano y Dean, 2002).

### 1.5.2 Crecimiento folicular

Conforme los folículos primordiales inician la fase de crecimiento varios tipos celulares comienzan a diferenciarse. El primer evento, consiste en el cambio de células de la pregranulosa de forma plana a cuboidal y su proliferación para formar un epitelio estratificado, así como, el aumento en tamaño del ovocito. En adición, las células de la granulosa forman uniones entre ellas, como la formación de desmosomas que junto con la membrana basal formaran la barrera hematofolicular (Merchant y Chimal, 1989). Se forma la zona pelúcida, compuesta de tres glicoproteínas (ZP1, ZP2 y ZP3), alrededor del ovocito. De estos tipos celulares se conforman los folículos primarios. Progresivamente, en los folículos en estado secundario (los cuales poseen dos o más capas completas de células de la granulosa que rodean completamente al ovocito), células del estroma cercanas a la lámina basal comienzan a alinearse de forma paralela una con respecto a otra, formando la teca. Esta capa se estratifica y diferencia en dos partes. La teca interna, la cual esta constituida por células miodes, fibroblastos y células esteroideogénicas. Mientras las células de la teca externa están constituidas por tejido conectivo fibroso. En estados más avanzados del crecimiento folicular, las células de la granulosa que rodean el ovocito son estimuladas por la hormona folículo estimulante (FSH) y estrógenos de manera sinérgica para continuar con su proliferación, esto es debido a que las células de la granulosa en esta etapa expresan una gran cantidad de receptores a ambos factores (Gougeon, 2004).

Cuando los folículos están constituidos de aproximadamente 7 a 8 capas de células de la granulosa alrededor del ovocito, se inicia la formación de la cavidad antral. Los factores o fluidos que secretan las células de la granulosa son principalmente proteínas, polipéptidos, FSH, LH, estrógenos, progesterona y noradrenalina. Todos estos componentes que se depositan en el antro folicular aumentan gradualmente con el desarrollo del folículo (Kenneth, 1987). En esta etapa, los folículos se denominan preantrales o antrales tempranos. Las células de la granulosa, también adquieren un espacio específico, es decir, las células foliculares que rodean al ovocito cuando se ha formado la cavidad antral,

constituyen el *cumulus oophorus* y por otro lado las células que revisten la cavidad antral, se denominan células de la granulosa mural. Todos estos arreglos morfológicos requieren una interacción entre las células de la granulosa y el ovocito, para esto se forma una extensa red de uniones gap las cuales poseen un mecanismo para coordinar su función (Salustri *et al.*, 2004).

Todo este proceso culminará en la formación de un folículo maduro que es capaz de ovular a un ovocito que completó su crecimiento, reasume la meiosis y puede ser fertilizado.

Se ha sugerido que el inicio del crecimiento de los folículos primordiales es independiente de gonadotropinas (Gougeon, 2004), y parece más bien estar relacionado con la expresión de factores intraováricos (Kol y Adashi, 1995) que involucran tanto al ovocito como a las células de la granulosa. Uno de estos factores es un receptor de tirosina cinasa que se expresa en los ovocitos denominado KIT y su ligando KILT, el cual es secretado por las células foliculares (Parrot y Skinner, 1999; Driancourt *et al.*, 2000). Ratones con mutaciones en este ligando inicialmente forman folículos primordiales, pero son incapaces de progresar hasta el estadio primario (Huang *et al.*, 1993; Bedell *et al.*, 1995). La disociación entre este ligando y su receptor impide la comunicación entre las células somáticas y las germinales afectando la producción de factores paracrinos necesarios para el crecimiento folicular (Epifanio y Dean, 2002).

Miembros de la familia de los factores de crecimiento transformantes  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) también regulan la foliculogénesis temprana. La BMP15 (proteína morfogenética del hueso 15) y el GDF9 (factor de crecimiento y diferenciación 9), se encuentran en el ovocito dentro de los folículos primarios y persisten aún después de la ovulación (Dube *et al.*, 1998; McGrath *et al.*, 1995). Los ovarios de ratones que pierden el gen GDF9 forman folículos primordiales, pero no progresan a la etapa de folículo primario. Algunos aspectos de la ovogénesis se presentan, incluyendo el crecimiento y la formación de la zona pelúcida, pero los organelos del ovocito se pierden o se ven alterados, por lo tanto las hembras son estériles (Dong *et al.*, 1996). Aquellos ratones que pierden la proteína BMP15 son subfértiles (Yan *et al.*, 2001).

### **1.5.3 Genes asociados con el crecimiento folicular: Amh (anti-Mullerian hormone), GATA4 (GATA binding protein 4) y FOG2 (friend of gata 2)**

Actualmente se han descrito otra serie de factores involucrados en el inicio del crecimiento folicular. Uno de estos factores es la hormona anti-mulleriana (AMH) también conocida como sustancia inhibidora de Müller (MIS). La AMH es un factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) y es codificada por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 10 en ratón (Vilain y McCabe, 1998). Esta hormona es responsable de la regresión de los conductos de Müller durante el desarrollo fetal masculino (Jost, 1947), AMH es producido por las células de Sertoli del testículo, por lo tanto es la señal de regresión del sistema de conductos femeninos en el macho, debido a que en hembras los conductos de Müller se diferencian en los oviductos, el útero y el tercio superior de la vagina (Josso *et al.*, 1993; Lee y Donahoe, 1993).

En hembras, la expresión de Amh por el ovario se inicia en los primeros días después del nacimiento, tiempo después de que los conductos Müllerianos han perdido su sensibilidad a la hormona (Münsterberg y Lovell-Badge, 1991; Visser *et al.*, 1998). Tanto la expresión del ARNm como de la proteína de AMH se localizan en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños en rata y ratón (Baarends *et al.*, 1995b; Durlinger *et al.*, 2002a; Hirobe *et al.*, 1992; Ueno *et al.*, 1989).

Las células de la pregranulosa de los folículos primordiales no expresan Amh, pero cuando los folículos primordiales comienzan a ser reclutados a la población de folículos en crecimiento, las células de la granulosa inmediatamente inician la expresión de Amh (Baarends *et al.*, 1995b; Durlinger *et al.*, 2002a; Hirobe *et al.*, 1992; Münsterberg y Lovell-Badge, 1991; Taketo *et al.*, 1993).

Altos niveles de expresión de Amh se localizan en folículos preantrales grandes y en folículos antrales pequeños. Hirobe (1994) y Ueno (1989) reportaron que hay expresión de Amh en folículos preovulatorios de rata, sin embargo este estudio no coincide con otros trabajos en donde se observó que la expresión de Amh desaparece en folículos en estado antral, en folículos preovulatorios, cuerpo lúteo

y en folículos que entran en atresia (Baarends *et al.*, 1995b; Durlinger *et al.*, 2002b; Hirobe *et al.*, 1992). Por otro lado, no se ha reportado la expresión de Amh en las células de la teca, ovocitos y células intersticiales del ovario (Baarends *et al.*, 1995b; Durlinger *et al.*, 2002., Hirobe *et al.*, 1992, 1994; Ueno *et al.*, 1989).

Durante la foliculogénesis se llevan a cabo dos procesos regulatorios de selección que involucran el reclutamiento de folículos: el primero es conocido como reclutamiento inicial, es decir, los folículos son reclutados desde la población de folículos primordiales quiescentes. Durante la segunda selección, conocida como reclutamiento cíclico, los folículos en crecimiento son seleccionados y alcanzan el estado preovulatorio. Este proceso está asociado con los niveles de FSH y únicamente los folículos preantrales grandes y antrales pequeños que son sensibles a esta hormona son rescatados de la atresia (McGee y Hsueh, 2000).

En el caso del ovario de ratón y rata, la expresión de Amh se inicia inmediatamente después del reclutamiento inicial y continúa expresándose durante el crecimiento folicular hasta el reclutamiento cíclico. Por lo tanto, se ha propuesto que la proteína AMH puede modular dos pasos regulatorios de la foliculogénesis: inhibe el reclutamiento de los folículos primordiales y disminuye la sensibilidad de folículos preantrales grandes y antrales pequeños a FSH (Gruijters *et al.*, 2003).

En un estudio realizado con ratones deficientes de Amh, se observó que los ovarios de 25 dpp comparados con ovarios también carentes de Amh de 120 dpp, contienen más folículos en crecimiento que los ovarios control. Estos estudios sugirieron que en ausencia de la proteína de la AMH más folículos primordiales son reclutados a la población de folículos en crecimiento (Durlinger *et al.*, 1999). A su vez, Durlinger y colaboradores (2005), en un estudio realizado en un sistema de cultivos de ovario observaron que en presencia de la AMH se inhibe el inicio del crecimiento de folículos primordiales, comparado con ovarios control.

El factor de transcripción GATA4 también se ha involucrado en el desarrollo y función de las gónadas. GATA4 pertenece a la familia de factores de transcripción relacionados con las proteínas de dedos de zinc, las cuales se unen a secuencias consenso GATA de DNA, (A/T)GATA(A/G) que se encuentran en los promotores

de sus genes blanco para potenciar su actividad (Heikinheimo *et al.*, 1997). El gen Gata-4 se encuentra en el cromosoma 14 del ratón. En el ovario postnatal de roedores este factor se ha detectado en células de la granulosa de folículos primarios y en folículos antrales tempranos (Ketola *et al.*, 1999). El papel de GATA-4 en la gonadogénesis ha sido establecido identificando sus genes blanco, entre los cuales se encuentra la AMH, y es esencial para su completa activación. La regulación de genes por GATA4 se lleva a cabo en parte por los cofactores FOG (friend of GATA)1 y FOG2, los cuales interactúan con GATA4 uniéndose a su extremo amino terminal (Lu *et al.*, 1999). Fog2 se encuentra localizado en el cromosoma 15 del ratón. Experimentos *in vitro* revelaron que FOG1 y FOG2 pueden activar o reprimir la acción de GATA4. La expresión de Gata4 es regulada negativamente en el ovario fetal poco tiempo después de la diferenciación ovárica, mientras que se mantienen en el testículo junto con la expresión de la AMH. En el caso de FOG2, su expresión se detecta en ambos sexos durante el establecimiento de la gónada indiferenciada, pero no se ha establecido un papel dimórfico de este factor. La proteína del gen Fog2 en el ovario postnatal fue detectada en células de la granulosa y la teca de folículos en crecimiento, a su vez, en folículos primordiales y antrales se encontró que los ovocitos expresan Fog2 (Anttonen *et al.*, 2003). Estudios realizados por Anttonen y colaboradores (2003) sugieren que GATA4 y FOG2 pueden estar jugando distintos papeles durante el desarrollo ovárico. Además, estudios de transactivación sugiere que ambos factores actúan en la regulación de la expresión de la AMH.

## **1.6 Reversión sexual en mamíferos**

Los eventos descritos anteriormente son algunos de los procesos que normalmente permiten el desarrollo ovárico en los mamíferos. Sin embargo, existen modelos biológicos en los cuales estos eventos están alterados. Para profundizar en el conocimiento de estos procesos, el empleo de modelos biológicos con alteraciones de la diferenciación sexual gonadal resulta de gran interés. Una forma de reversión sexual que asemeja casos clínicos en humanos ha sido descrita en ratones. En esta cepa de ratones, denominada B6.Y<sup>tir</sup>, los machos con constitución cromosómica XY se diferencian como hembras fenotípicas, desarrollando ovarios bilaterales.

### **1.6.1 Ratón B6.Y<sup>tir</sup> como modelo de reversión sexual**

La reversión sexual en el ratón B6.Y<sup>tir</sup> se identificó cuando el cromosoma Y del ratón silvestre *Mus musculus domesticus* (Y<sup>tir</sup> de la región de Tirano, Italia) se introdujo en el genoma de la cepa C57BL/6J (B6). Todos los individuos machos que pertenecieron a la primera generación (F1) resultaron normales; sin embargo, la progenie derivada de retrocruzas de machos F1 con hembras B6 no relacionadas, resultó en individuos XY con una reversión sexual parcial o completa, debido a que el cromosoma Y<sup>tir</sup> falla en la inducción de la diferenciación testicular normal (Eicher *et al.*, 1982). De la sexta generación (F6) en adelante, los individuos XY no desarrollaron testículos normales durante la vida fetal, aproximadamente la mitad desarrollaron ovotestis y el resto presentó una reversión sexual severa, los cuales formaron ovarios y se desarrollaron como hembras fenotípicas (Nagamine *et al.*, 1987).

### **1.6.2 Fenotipo del ratón B6.Y<sup>tir</sup>**

Como se menciona, las gónadas de los ratones B6.Y<sup>tir</sup> se pueden desarrollar como ovotestis o como ovarios bilaterales.

**Ovotestis:** no se da la formación de testículos normales durante el desarrollo fetal. En los ovotestis se localizan cordones seminíferos en la región medular de la gónada, mientras que en los polos craneal y caudal se evidencia el desarrollo de tejido ovárico (Nagamine *et al.*, 1987). En la región de la médula se ha detectado la presencia de factores característicos de la diferenciación testicular (Moreno *et al.*, 2004). A su vez, la región que corresponde al ovario posee células germinales en meiosis (Nagamine *et al.*, 1987).

**Ovarios:** Las hembras XY desarrollan ovarios bilaterales los cuales son morfológicamente idénticos a los ovarios XX hasta los 16.5 dpc. Sin embargo, entre los 16.5 y 19 dpc los ovocitos de la zona medular degeneran lo cual parece ocurrir en el estado de paquiteno de la meiosis I. Los folículos primordiales que se sitúan en la zona de la corteza, al inicio de la pubertad, continúan con el proceso de foliculogénesis como en el ovario XX. Por otra parte, se sabe que los ovarios XY<sup>tir</sup> expresan el gen Sry, el cual desencadena la expresión de otros genes autosómicos tales como Sox9 involucrado en el desarrollo testicular (Moreno, 2003). A pesar de la expresión de estos genes involucrados en la determinación y diferenciación testicular normal, la expresión de AMH no se detecta en ovarios XY<sup>tir</sup> fetales (Lee y Taketo, 1994).

Las hembras con ovarios XY son infértiles, presentan una función endocrina anormal y alteración en el ciclo estral (Taketo *et al.*, 1989). Se ha reportado que las hembras XY presentan  $\pm 5$  ciclos estrales y se quedan en diestro permanente. A su vez, recientes estudios histológicos del ovario XY<sup>tir</sup> han revelado que a los 30 días postnatales (dpp) los ovocitos forman folículos normales. Sin embargo, entre los 40 y 60 dpp se detectó una depleción masiva de folículos (Morales, 2004).

Eicher y colaboradores (1982) proponen que la condición de reversión sexual en los ratones B6.Y<sup>tir</sup> se debe a que ocurre una interacción anormal entre los alelos que acarrea el cromosoma Y de *Mus musculus domesticus* como sería el caso del gen Sry y uno o más alelos derivados de cromosomas autosómicos presentes en el cromosoma X de la cepa C57BL/6J (B6).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Como se mencionó, la expresión de *Amh* se requiere para el desarrollo ovárico postnatal, así como la presencia del gene *Gata4* y su cofactor *Fog2*. Por lo cual, en este proyecto nos propusimos analizar la expresión de los genes *Amh*, *Gata4* y su cofactor *Fog2* durante el reclutamiento de folículos primordiales, y el crecimiento folicular (formación de folículos primarios, antrales y preantrales) en el ovario del ratón B6.Y<sup>tir</sup>.

A pesar de que en el ovario B6.Y<sup>tir</sup> existe una atrofia masiva y precoz, es posible detectar los diferentes estadios del crecimiento folicular, aunque en número reducido. Estudios anteriores han mostrado que en los ovarios B6.Y<sup>tir</sup>, la expresión de factores como los receptores a estrógenos (Re  $\alpha$  y  $\beta$ ) se encuentran disminuidos, es decir, no todas las células de la granulosa los expresan. Además, también se ha encontrado que la expresión de transcritos de ARNm de *Sox9*, característico de las células de Sertoli en el macho, se encuentran en algunos grupos de células de la granulosa. Esto sugiere, que este linaje celular, de alguna manera, se encuentra alterado, por lo que su contribución al desarrollo folicular no funciona adecuadamente llevando a la degeneración folicular prematura y por consiguiente a la infertilidad de las hembras B6.Y<sup>tir</sup>.

### 3. HIPÓTESIS

Se espera que la expresión de la Amh se encuentre alterada en los ovarios de hembras B6.Y<sup>tmr</sup>, es decir, tanto la expresión de la proteína como los niveles de transcritos se encuentren disminuidos. Por consiguiente, el gen Gata4 y su cofactor Fog2 que promueven el aumento de la expresión de Amh, se encontrarán también alterados.

## 4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el patrón de expresión tanto del ARNm como de la proteína Amh, del factor de transcripción Gata4 y su cofactor Fog2 durante el desarrollo folicular del ovario del ratón B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual.

### 4.1 Objetivos particulares

1. Corroborar el número de ciclos estrales que presentan las hembras de la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, comparado con el número de ciclos en dos cepas normales: C57BL/6J(B6) y CDI.
2. Analizar el patrón de expresión de la proteína AMH en ovarios B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual y ovarios normales C57BL/6J(B6) de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 días postparto (dpp).
3. Analizar el patrón de expresión de la proteína del factor de transcripción GATA4 y su cofactor FOG2 en ovarios tanto B6.Y<sup>tir</sup> como C57BL/6J(B6) de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 100 dpp.
4. Cuantificar los niveles de expresión de transcritos del gen Amh, Gata4 y Fog2 por RT-PCR en tiempo real en ovarios B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual y ovarios normales C57BL/6J(B6) de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 dpp.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Mantenimiento de la cepa de ratones B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual

La cepa B6.Y<sup>tir</sup> se mantuvo en condiciones de bioterio, mediante cruza entre machos B6.Y<sup>tir</sup> y hembras de la cepa C57BL/6J(B6) no relacionadas.

### 5.2 Identificación del cromosoma Y<sup>tir</sup> por PCR del gen Zfy.

La identificación del sexo cromosómico de las hembras fenotípicas B6.Y<sup>tir</sup>, se realizó mediante la detección del gen Zfy el cual se encuentra en el cromosoma Y, amplificando un fragmento de 600 pb por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El DNA utilizado para la identificación del gen Zfy se aisló de tejido de colas de ratones de 30 dpp. Los tejidos se incubaron en buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40 y 0.4 mg/ml proteinasa K) a 55°C toda la noche. Posteriormente, la proteinasa K se inactivó por calor a 85°C durante 10 min. El lisado se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a 4°C, se tomaron 15 µl y se mezclaron con 85 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. Se usaron 2 µl de DNA como templado, el cual se amplificó en un volumen de reacción de 20 µl conteniendo Buffer 1X PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM de dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimerasa (5 U/ µl), 0.25 mM de los oligonucleótidos de Zfy y β-Actina (Tabla 1).

**Tabla 1.** Secuencia de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de fragmentos de los genes Zfy y β-actina.

Oligonucleótidos	Sentido	Antisentido
Zfy	5' AAGATAAGCTTACATAATCACATGGA3'	5' CCTATGAAATCCTTTGCTGCACATGT 3'
β-Actina	5' GGGTCAGAAGGATTCTATG 3'	5' GGTCTCAAACATGATCTGGG 3'

El programa de amplificación consistió de los siguientes rangos: 94°C /10min (1 ciclo); 94°C/15seg, 60°C/15 seg, 72°C/30seg (35 ciclos) y 72°C/10min (1 ciclo). El producto de PCR se colocó en geles de agarosa 1% preparados con buffer TAE 1X (48.4 g de Tris base, 11.5 ml de ácido acético, 20 ml de EDTA 0.5 M con pH 8 y H<sub>2</sub>O desionizada) y bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se observaron en un transiluminador con luz UV.

### **5.3 Monitoreo de ciclo estral**

Ratones hembras de las cepas B6, B6.Y<sup>flr</sup> y CD1 fueron monitoreadas diariamente (días consecutivos) para determinar el ciclo estral tomando una muestra vaginal empleando solución salina. La muestra se colocó en un portaobjetos y se dejaron secar, posteriormente se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina-eosina y se evaluaron al microscopio óptico para determinar la etapa del ciclo estral.

### **5.4 Inmunohistoquímica para la detección de la proteína de los genes Amh, Gata4 y su cofactor Fog2.**

Se obtuvieron las muestras de ovarios B6.Y<sup>flr</sup> con reversión sexual y ovarios normales C57BL/6J(B6) de 30 a 100 dpp. Los órganos disectados se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 20 min y se colocaron en sacarosa al 30% en PBS 1X a 4°C toda la noche. Posteriormente los ovarios se incluyeron en Tissue-Tek y congelaron a -70°C. Se realizaron cortes seriados alternados de 20 µm de espesor los cuales se colocaron en laminillas tratadas con poly-L-lisina. Las secciones colocadas en una cámara húmeda se trataron con PBS 1X por 10min, Tritón 1% en PBS 1X por 10 min y con una solución de bloqueo constituida por albumina 1% en PBS 1X (Ab-PBS) durante 2 horas a temperatura ambiente. Concluido el tiempo de bloqueo se colocaron los anticuerpos primarios en diluciones de 1:250 en Ab-PBS incubando toda la noche a 4°C (Tabla 2).

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios empleados para la localización de las proteínas AMH, GATA4 y FOG2.

<b>Anti-AMH</b>	policlonal generado en cabra	(Santa Cruz Biotechnology C-20)
<b>Anti-GATA4</b>	policlonal generado en cabra	(Santa Cruz Biotechnology C-20)
<b>Anti-FOG2</b>	policlonal generado en conejo	(Santa Cruz Biotechnology M-247)

El sitio de unión de los anticuerpos primarios (antígenos) se hizo evidente incubando por 1 hora los cortes, con anticuerpos secundarios anti-cabra Rodaminado (GATA4) y anti-conejo Cy<sup>TM</sup>5 (FOG2). En las mismas secciones tratadas con el anticuerpo anti-GATA4 se detectó la distribución de anti-AMH post fijando con paraformaldehído al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, con Tritón 1% en PBS por 5 min y sometiendo los cortes a solución de bloqueo Ab-PBS por 2 horas. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario anti-AMH 1:250 en Ab-PBS toda la noche a 4°C. Después de lavar las secciones en PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-cabra Cy<sup>TM</sup>5. Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal láser (LSM Pascal, Zeiss).

### **5.5 Cuantificación de folículos de ovarios B6 y B6.Y<sup>tir</sup>**

Las secciones empleadas para inmunohistoquímica una vez analizadas se les retiro el cubreobjetos sumergiendolas en PBS 1X durante dos días. Una vez, realizado lo anterior se tiñeron empleando la técnica de hematoxilina-eosina y se analizaron con microscopia de luz. Se considero para el análisis la clasificación de folículos reportada por Myers y colaboradores (2004).

## 5.6 Diseño de oligonucleótidos

Se realizó el diseño de oligonucleótidos de los genes Amh, Gata4 y Fog2 a partir de la secuencia del ARNm reportadas en el Banco de Genes (Tabla 3).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes Amh, Gata4 y Fog2. Diseñados a partir de la secuencia de ARNm del banco de genes.

GenBank	Gen	T.F. (pb)	Referencias
1.NM_007445	<i>Mus musculus</i> anti-Mullerian hormone (Amh)	120	Bouma, 2004
Sentido	5' CTATTTGGTGCTAACCGTGGACTT 3'		
Antisentido	5' AAGGCTTGCAGCTGATCGAT 3'		
2.NM_008092	<i>Mus musculus</i> GATA binding protein 4 (Gata4)	520	Morales, 2006
Sentido	5' CACAAGATGAACGGCATCAA 3'		
Antisentido	5' GCGATGTCTGAGTGACAGGA 3'		
3. AF107306	<i>Mus musculus</i> zinc-finger protein FOG-2 (Fog2)	406	Presentes resultados
Sentido	5' CAAAGCAACCATCTCCCAAC 3'		
Antisentido	5' TTGGCCGTAGGTCTTTCATC 3'		

Se considero que los oligonucleótidos tuvieran una longitud de 10-25 nucleótidos, un porcentaje de G/C y A/T cercano al 50% y una Tm (temperatura media) similar para cada par de oligonucleótidos. Se empleo el programa "Primer 3" para su diseño y se eligieron los adecuados de acuerdo a nuestros parámetros establecidos.

## 5.7 Extracción de ARN Total

El ARN total se obtuvo a partir de un ovario el cual se mantuvo en congelación a -70°C en TRIzol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA). Este reactivo es una solución mono-fásica de fenol y tiocianato de guanidina que se ha implementado

como un método de aislamiento de ARN (Chomezynski y Sacchi, 1987), el cual consiste principalmente de cinco fases:

Fase de homogeneización: Los tejidos aislados se congelaron con TRIzol en tubos eppendorf a  $-70^{\circ}\text{C}$ . La gónada se homogeneizó en un volumen de  $400\ \mu\text{l}$  de TRIzol y se incubó por 5 min a  $10^{\circ}\text{C}$ . El trizol mantiene la integridad del RNA mientras se da la ruptura de las células que constituyen el tejido, el incubar el homogeneizado permite la completa disociación de complejos nucleoproteicos.

Fase de separación: Se adicionaron  $80\ \mu\text{l}$  de cloroformo y se dejó incubando por 15 min a  $10^{\circ}\text{C}$ , seguido por una centrifugación a  $14,000\ \text{rpm}$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, al término se obtuvieron 2 fases una fase acuosa y una fase orgánica. Es en la fase acuosa donde exclusivamente permanece el ARN.

Fase de precipitación: Se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf tratado con  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC (dietilpirocarbonato) evitando tocar la fase orgánica y la contaminación con DNA, proteínas, y TRIzol. A la fase acuosa recuperada se le adicionaron  $100\ \mu\text{l}$  de alcohol isopropílico (isopropanol), el cual se homogeneizó suavemente hasta que se observó solo una fase y se dejó precipitando toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Lavado de ARN: Para remover el sobrenadante la muestra se centrifugó a  $14,000\ \text{rpm}$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , posteriormente el RNA se lavó con  $100\ \mu\text{l}$  de alcohol etílico al 80% en  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsas y se centrifugó nuevamente 15 min a  $14,000\ \text{rpm}$  a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa se retiró y el pellet de RNA se dejó secar por 10 min.

Resuspensión del ARN: El botón que contiene el ARN se resuspendió en  $\text{H}_2\text{O}$  tratada con DEPC ( $20\ \mu\text{l}$ ). Se tomó  $1\ \mu\text{l}$  de la muestra y se diluyó en  $\text{H}_2\text{O}$  tratada con DEPC (1:100), la cual se analizó por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm para determinar la concentración de ARN por muestra.

Por esta técnica se obtuvo ARN total con un mayor grado de pureza de 1.5-2 y con una concentración en promedio de  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Para determinar la calidad del ARN extraído, cada muestra se corrió en un gel de agarosa al 1%.

Se procesaron muestras de ovario de hembras B6 y B6.Y<sup>tir</sup> de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 dpp, las cuales posteriormente se usaron para llevar a cabo la

amplificación de fragmentos de los genes de Amh, Gata4 y Fog2 por RT-PCR semicuantitativo y RT-PCR en tiempo real.

## **5.8 Secuenciación**

Se amplificaron los fragmentos de los genes Amh, Gata4 y Fog2 a partir de ARN total aislado de ovarios de hembras B6.Y<sup>tir</sup> de edades de 30 dpp, mediante la técnica de RT-PCR de un paso especificada anteriormente empleando los oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 3), se empleo como control positivo un ARN proveniente de un testículo. Los productos de PCR (ADN copia) se corrieron en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. Una vez visualizadas las bandas correspondientes a cada uno de los genes identificados por el peso molecular, se cortaron y se colocaron en tubos eppendorf manteniéndolos con una temperatura de 4°C.

Posteriormente las bandas se purificaron con el kit QIAquick gel extraction K (Qiagen) y las muestras que se extrajeron de ADN fueron secuenciadas mediante un analizador genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), para determinar su identidad, usando los oligonucleótidos descritos en la tabla 3.

## **5.9 RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa - Transcriptasa reversa)**

Para la determinación y cuantificación de los niveles de expresión de los genes Amh, Gata4 y Fog2 se empleo la técnica de RT-PCR convencional y en tiempo real.

Las muestras de ARN total se trataron con DNAsa I (Deoxyribonucleasa I, Invitrogen) según el protocolo del fabricante. Se empleo 1 µg de ARN total al cual se agrego 1 µl de Buffer de reacción de DNAsa I 10X, 1 µl de DNAsa I (1U/ 1 µl) el cual se llevo a un volumen final de 10 µl con H<sub>2</sub>O tratada con DEPC. Las muestras se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Al terminó de este tiempo se adiciono 1 µl de EDTA (25 mM) y se incubaron a 65°C durante 10 min para inactivar la acción de la DNAsa.

**RT-PCR semicuantitativo:** El cDNA se sintetizó con 500 ng de ARN total previamente tratado con DNAsa I utilizando 1 mM de hexameros al azar (Invitrogen), 0.5 mM de dNTP (Invitrogen), Buffer 1X (Tris-HCl 50 mM a pH 8.3; HCl 75 mM; MgCl<sub>2</sub> 3 mM) y DTT 10 mM, las muestras se incubaron a 80°C por 10 min. La síntesis se llevó a cabo a 42°C por 1h empleando 100 U de transcriptasa reversa del virus de leucemia murino de Moloney (M-MLV RT, Invitrogen) y 10 U de inhibidor de RNAsas (Invitrogen) continuando con una incubación a 75°C por 15 min. Posterior a la síntesis de cDNA, las muestras se incubaron con 0.2 U de RNAsa H (Invitrogen) por 30 min a 37°C. La mitad del producto de la reacción se amplificó con oligonucleótidos específicos para Amh, Gata4 y Fog2 (Tabla 3) y la otra mitad se empleo para amplificar  $\beta$ -actina (Tabla 2). La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la mezcla: 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), 0.4  $\mu$ M de cada oligonucleotido (Tabla), 0.5  $\mu$ M de dNTP y MgCl<sub>2</sub>, en Buffer 1X PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl). Las muestras se sometieron a 1 ciclo de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos del protocolo: 94°C por 30 seg; 60°C por 30 seg y 72°C durante 35 seg y un paso final de 72°C, 10 min. El número de ciclos se estableció haciendo una curva de amplificación para los tres genes, se empleo como control positivo ARN proveniente de un testículo adulto. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. El análisis densitométrico se llevó a cabo con el programa Kodak 1D versión 3.5.

Análisis: Las imágenes digitalizadas de los geles se analizaron mediante la normalización de la intensidad de cada banda correspondiente a los genes Amh, Gata4 y Fog2 dada por su relación con la banda correspondiente a  $\beta$ -actina. Este cociente indica los niveles de expresión de la muestra con respecto a la actina (cuya expresión se asume es constante).

**RT-PCR en tiempo real:** La amplificación se llevó a cabo empleando el Kit One-Step, utilizando la mezcla de reacción: 2X mix (amortiguador que contiene 0.4 mM de dNTP, 2.4 mM MgSO<sub>4</sub>), SuperScript II Transcriptasa reversa/ Platinum Taq DNA polimerasa (Life Technologies Invitrogen); 50 ng de ARN total previamente tratado con DNAsa I, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleotido específico para cada gen (Tabla) mismos que se emplearon en la RT-PCR convencional y se agrego 1  $\mu$ l de

SYBR Green I de una dilución 1:10000 (AMRESCO) complementando con H<sub>2</sub>O libre de RNAsas un volumen de reacción final de 20 µl. Para establecer la concentración de ARN empleada como templado se realizó una curva de cinco concentraciones distintas de ARN total amplificando con la misma mezcla de reacción. Como control interno se amplificó β-actina utilizando los oligonucleótidos mostrados en la tabla. Para realizar el RT-PCR en tiempo real de cada uno de los genes se utilizó el termociclador Rotor-Gene RG-300 (Corbett-Research). El programa de amplificación consistió de los siguientes rangos: 50°C por 30 min (1 ciclo); 94°C durante 5 min (1 ciclo) y 30 ciclos con 94°C 1 min, 60°C por 1 min y 72°C 1 min seguido de 1 ciclo de 72°C por 5 min.

El SYBR Green I, es un fluoróforo (marcador intercalante) que se une a la subunidad mayor de la doble hélice del ADN. En solución exhibe poca fluorescencia pero al unirse al ADN se potencia su fluorescencia. Este marcador puede ser adicionado a la mezcla de reacción de amplificación tradicional. Su uso es efectivo para la prueba de detección en tiempo real, no requiere el diseño de sondas específicas y el diseño de nuevos oligonucleótidos (Ponchel *et al.*, 2003).

Se realizaron 5 repeticiones para cada edad de 30-100 dpp, a partir de las muestras de ARN que se obtuvieron de ovarios B6.Y<sup>tir</sup> y B6.

### **5.10 Análisis estadístico**

Con el fin de determinar si se empleaban pruebas paramétricas o no paramétricas se aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas (test Levene), para todos los datos obtenidos. Para la frecuencia de ciclos estrales se empleó un estadístico multifactorial y para realizar un análisis individual se utilizó ANOVA (paramétrica) seguido de una prueba de comparación múltiple (test Tukey). La cuantificación de folículos entre hembras de la cepa B6 y B6.Y<sup>tir</sup> fueron comparados, mediante la prueba de t-Students usando el programa Statistica v. 6.0.

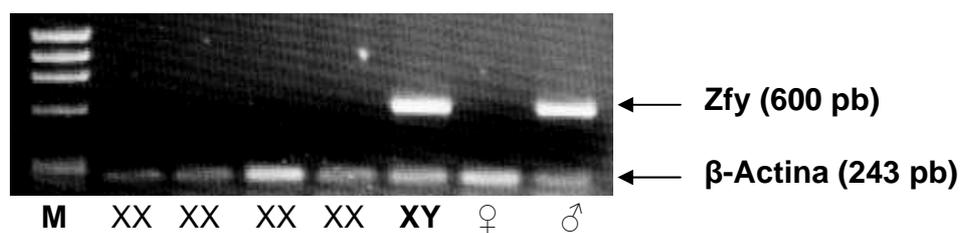
Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de la amplificación de los genes, y su comparación entre las edades de 30 a 100 dpp tanto de ovarios de la cepa B6 (XX), como de la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, se emplearon los valores de expresión de 5 experimentos independientes del gen Amh. Se llevaron a cabo pruebas de ANOVA (paramétrica), seguido de una prueba de comparación múltiple (test Duncan). De igual manera, para el gen Gata4 y Fog2 se emplearon las mismas pruebas las cuales fueron calculadas usando el programa Statistica v. 6.0.

Los valores de expresión de los genes Amh, Gata4 y Fog2, de 5 experimentos para cada edad (30 a 100 dpp) entre hembras de la cepa B6 y B6.Y<sup>tir</sup> fueron comparados; la desviación estándar y la prueba de t-Students fueron calculadas usando el programa Statistica v. 6.0.

## 6. RESULTADOS

### Detección el cromosoma Y

El sexo cromosómico de las hembras B6.Y<sup>tir</sup> se identificó por la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), amplificando una secuencia de nucleótidos de 600 pb, correspondiente al gen Zfy, característico del cromosoma Y. En la figura 1 se muestra un gel representativo, donde se puede observar el análisis de cinco hembras provenientes de la cepa B6.Y<sup>tir</sup> y sus respectivos controles que corresponden a tejido obtenido de hembra y macho adultos. En este caso solo una hembra fue identificada con constitución cromosómica XY.



**Figura 1.** Identificación del fragmento que corresponde al gen Zfy mediante el cual se determina la constitución cromosómica de individuos XY<sup>tir</sup>. Bandas en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de peso molecular. ♀: control negativo, hembra adulta. ♂: control positivo, macho adulto.

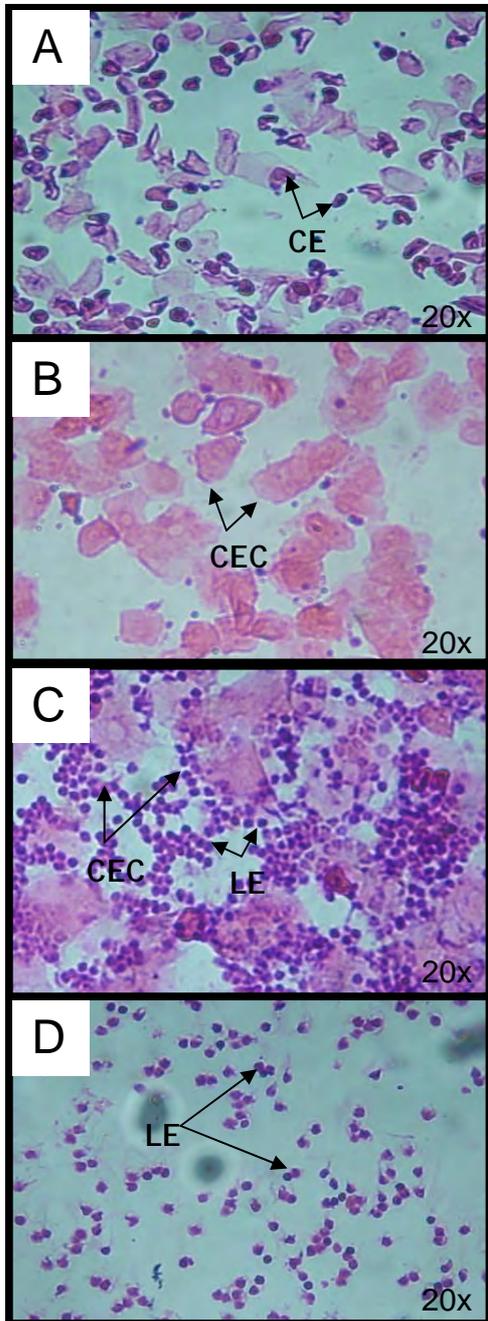
## Monitoreo de ciclo estral de hembras B6.Y<sup>tir</sup>

Diariamente se monitorearon ratones hembras de la cepa B6, B6.Y<sup>tir</sup> y CD1, para determinar la longitud y regularidad del ciclo estral. Se realizaron frotis vaginales, los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina y se analizaron al microscopio de campo claro y se evaluó la etapa del ciclo estral de acuerdo al aspecto de las células de la pared vaginal (Fig. 2). De esta manera, se determinó la frecuencia de ciclos estrales de hembras fenotípicas B6. Y<sup>tir</sup> y se compararon con hembras normales B6 y CD1.

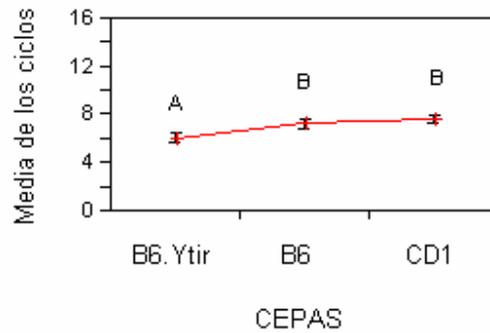
Mediante un análisis estadístico multifactorial, observamos diferencias significativas en la frecuencia de ciclos estrales entre la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, con respecto a las cepas B6 y CD1 (ANOVA  $p=0.0001$ ). Sin embargo entre las cepas B6 y CD1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 3).

Con el fin de analizar de manera independiente la frecuencia de ciclos estrales entre las tres cepas, con respecto a cada una de las edades, empleamos ANOVA de una sola vía ( $p \leq 0.05$ ), seguida de una prueba de Tukey. El análisis estadístico arrojó diferencias significativas (ANOVA  $p=0.0001$ ) comparando las tres cepas en: 50 dpp ( $p=0.033645$ ), 80 dpp ( $p=0.012077$ ), 90 dpp ( $p=0.026658$ ) y 100 dpp ( $p=0.001141$ ) (Fig. 4). Los datos anteriores nos permiten sugerir que existe una disminución en el número de ciclos estrales en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, con respecto a la frecuencia de ciclos cuantificados en las cepas B6 y CD1.

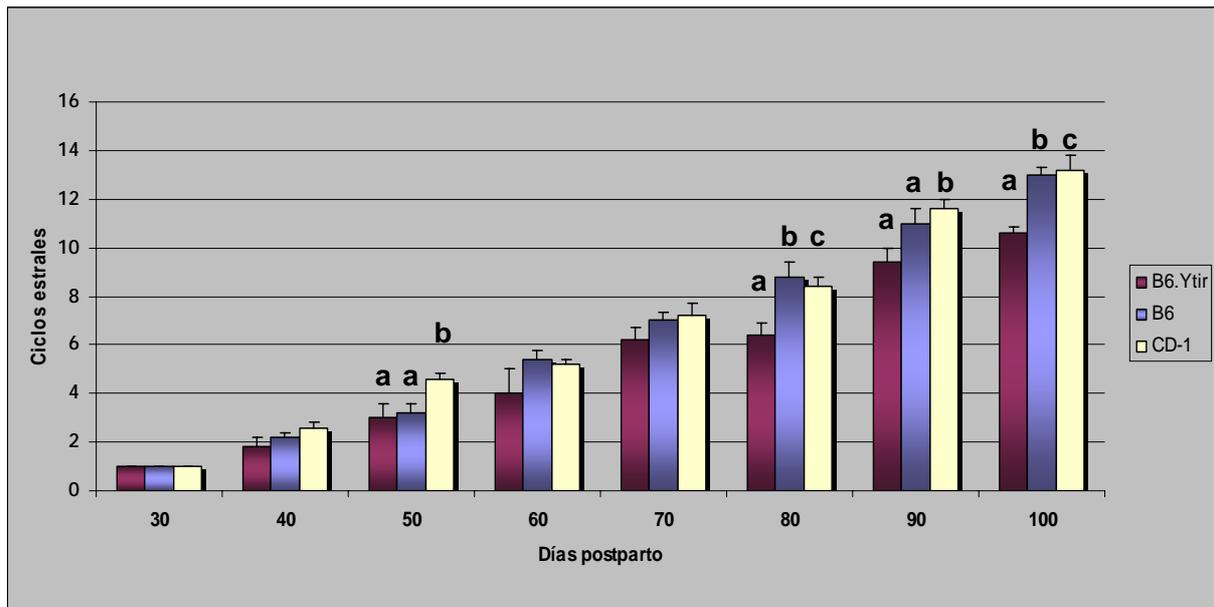
Con la finalidad de establecer cual etapa o etapas del ciclo estral estaban siendo alteradas en la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, se analizó la duración de cada uno de los estadios que corresponden al ciclo estral (proestro, estro, metaestro y diestro). Se comparo el numero de días de cada una de las etapas del ciclo estral detectados en la cepa B6.Y<sup>tir</sup> con la hembras provenientes de la cepa control B6. En el caso de las hembras B6 los días que permanecen en cada etapa del ciclo no varia, contrario a lo que se observa en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, donde conforme avanza la edad se detecta una etapa de diestro mas prolongada (Fig. 5).



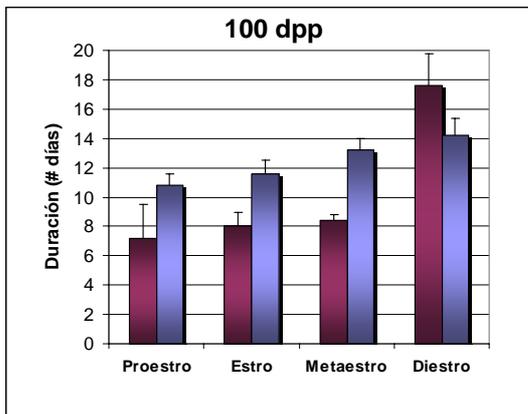
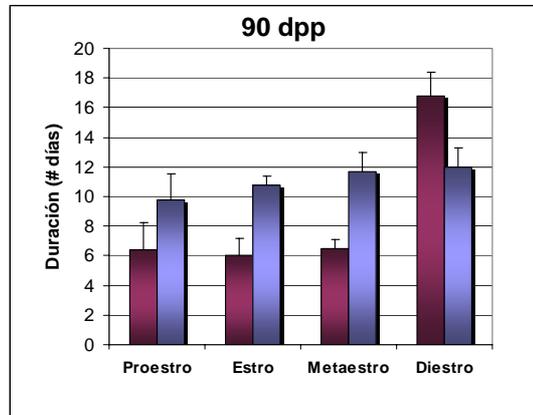
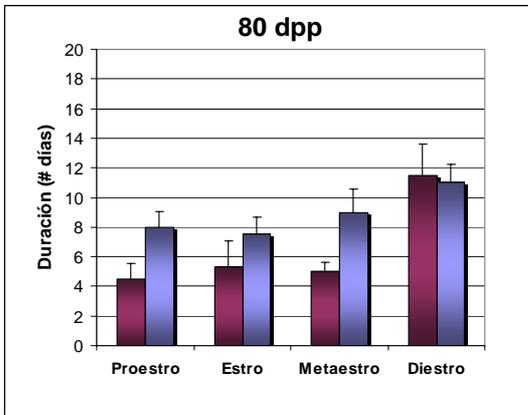
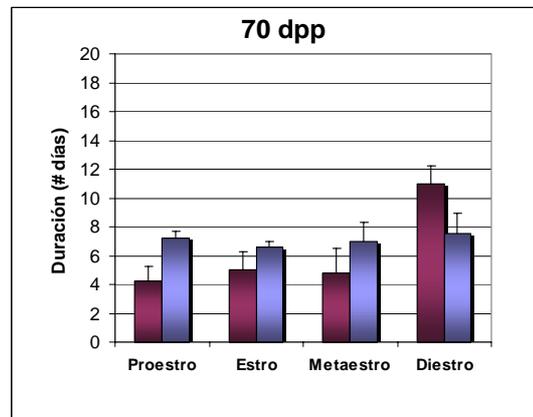
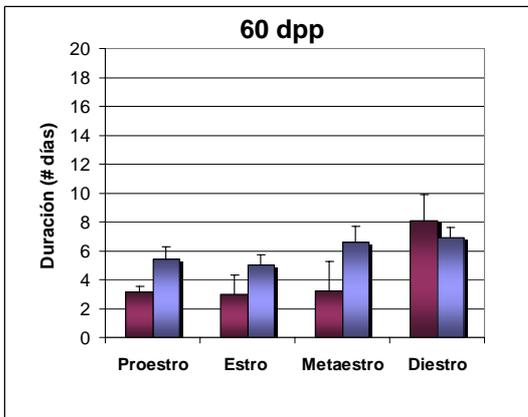
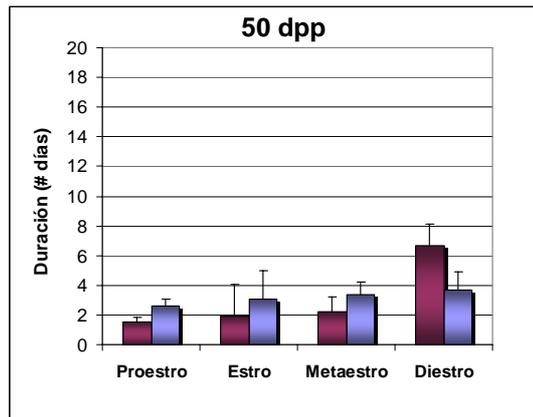
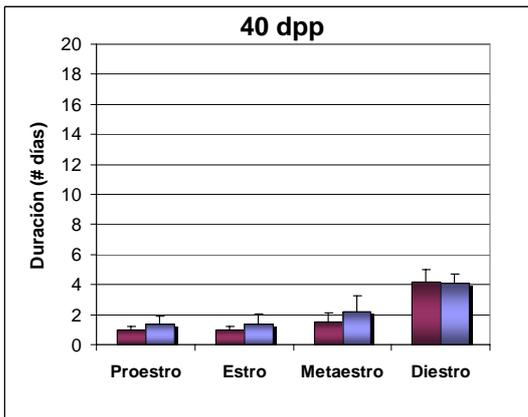
**Figura 2.** Aspecto de las células de la pared vaginal de las hembras B6.Ytir, en las cuatro fases del ciclo estral. A) Proestro, se observan células epiteliales abundantes, de forma circular o de huso, con citoplasma granular; B) Estro, restos de células epiteliales, grandes células cornificadas de forma irregular o plana, las cuales carecen de núcleo; C) Metaestro, células epiteliales cornificadas y presencia de leucocitos y D) Diestro, células epiteliales escasas, pocos o muchos leucocitos. Tinción con hematoxilina/eosina. (CE) células epiteliales; (CEC) células epiteliales cornificadas; (LE) leucocitos.



**Figura 3.** Análisis estadístico multifactorial aplicado a la frecuencia de ciclos estrales. La gráfica representa diferencias significativas en la frecuencia de los ciclos estrales comparando la cepa B6.Y<sup>tir</sup> con respecto a las cepas B6 y CD1. Los datos son representados como la media ± E.S.M. Diferentes letras representan diferencias significativas (ANOVA p= 0.0001).



**Figura 4.** Número de ciclos estrales de hembras de la cepa B6 (XX), B6.Y<sup>tir</sup> (XY<sup>tir</sup>) y de la cepa CDI (XX) de edades de 30-100 dpp, monitoreadas diariamente. Los resultados están expresados como la media ± ESM. Diferentes letras representan diferencias significativas entre los tres grupos.



Hembras control B6  
 Hembras B6.Y<sup>tir</sup>

**Figura 5.** Duración en días de las etapas del ciclo estral analizadas desde los 40 hasta los 100 dpp, registradas para las hembras B6 y B6.Y<sup>tir</sup>. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.

## **Expresión de las proteínas AMH, GATA4 y FOG2 en ovarios control B6 y B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual de edades de 30 a 100 dpp.**

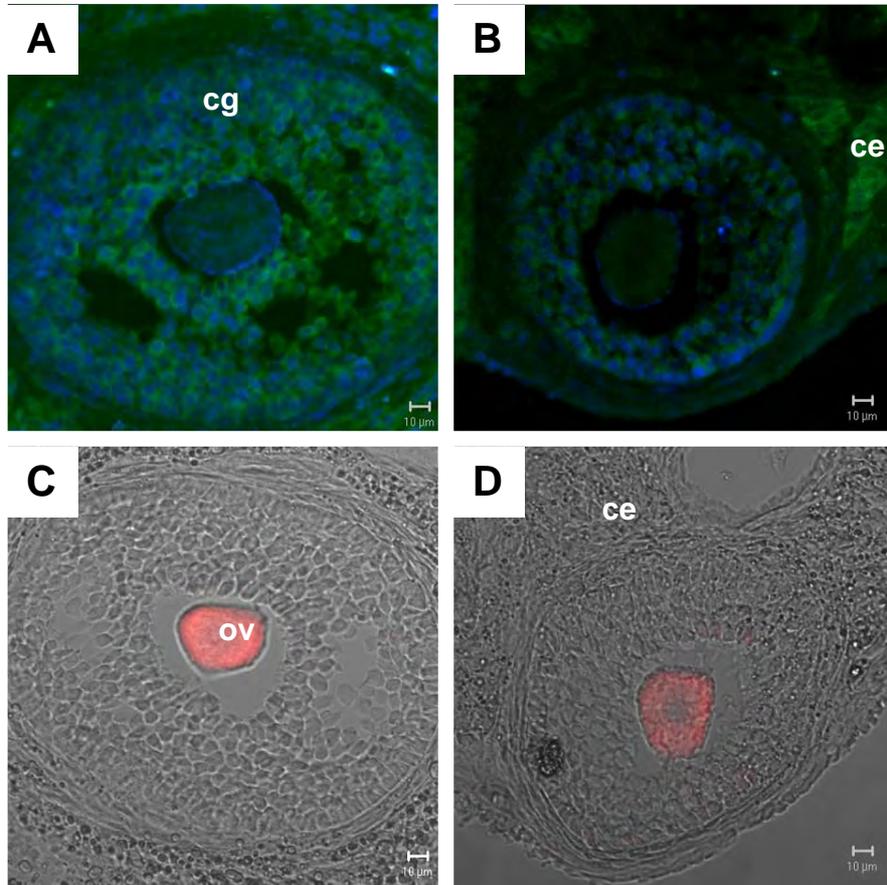
Para establecer el sitio de expresión de la proteína en ovarios postnatales de ratón, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica doble para determinar la localización espacial de las proteínas AMH y GATA-4 e inmunohistoquímica sencilla para la proteína FOG2. La técnica se realizó en cortes de ovarios de ratones XY<sup>tir</sup> con reversión sexual de macho a hembra, empleando como control ovarios XX de la cepa B6 entre las edades de 30 a 100 dpp y posteriormente se analizaron mediante microscopía confocal láser.

Los anticuerpos usados reconocieron específicamente las tres proteínas y se pudo determinar su localización en los tipos celulares que conforman a los ovarios postnatales de las cepas B6 y B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual. Mediante las observaciones que se realizaron se determinó que su localización no cambió en cuanto al tipo de cepa.

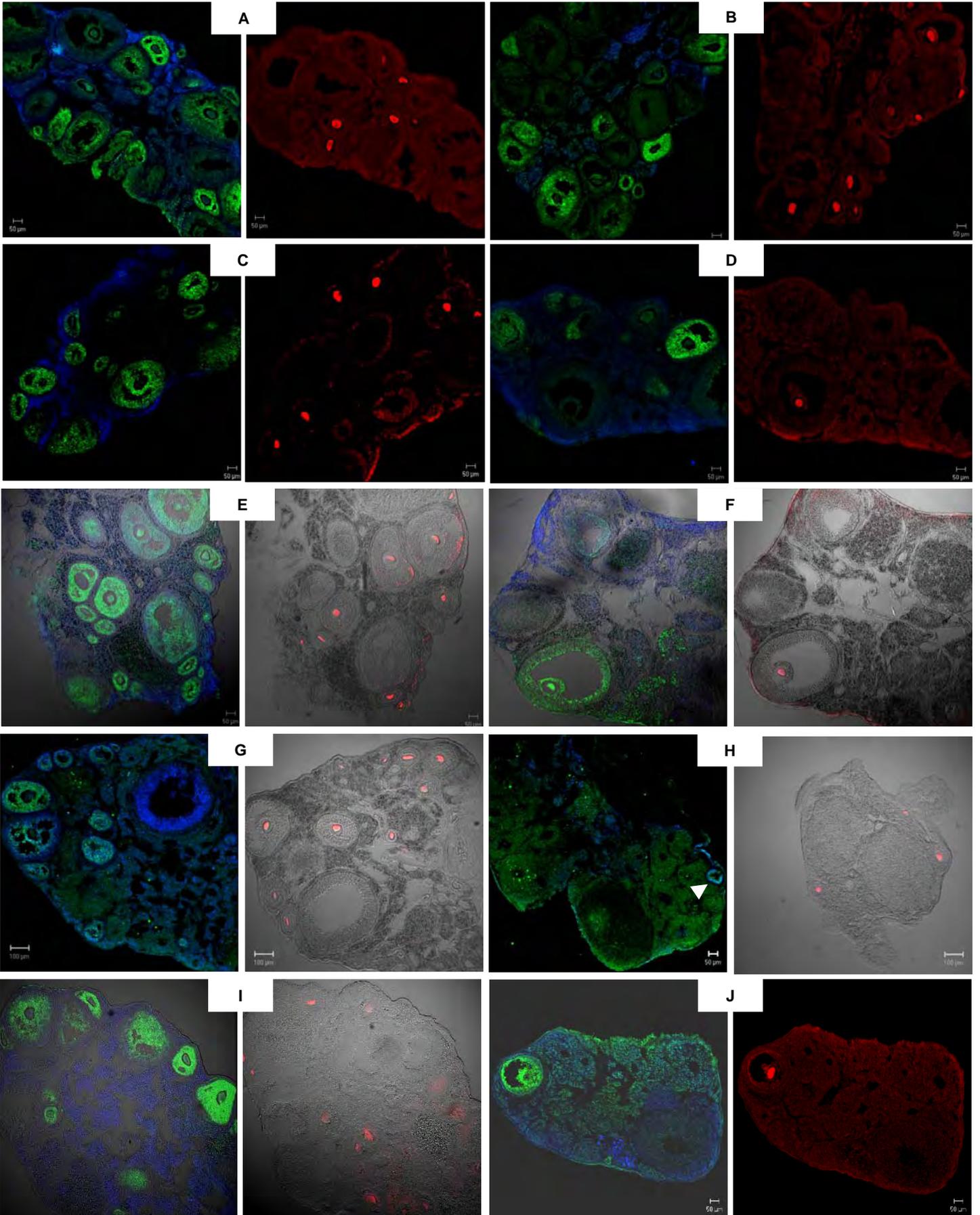
La expresión de la proteína de la AMH se localizó en el citoplasma de las células de la granulosa de folículos preantrales hasta antrales, la proteína también se detectó en el citoplasma del ovocito de folículos preantrales hasta antrales y en células que conforman el cuerpo lúteo. No hubo presencia de la proteína AMH en células que conforman el compartimento estromático del ovario. La AMH y el factor de transcripción GATA4 colocalizan en las células de la granulosa, donde GATA4 se restringe exclusivamente al núcleo de estas células foliculares. Esta proteína se presentó tanto en células de la granulosa de folículos preantrales como antrales, no se detectó en el núcleo del ovocito de los folículos en ninguna etapa de crecimiento. Sin embargo, sí se observó en el núcleo de las células del tejido estromático del ovario (Fig. 6 A,B).

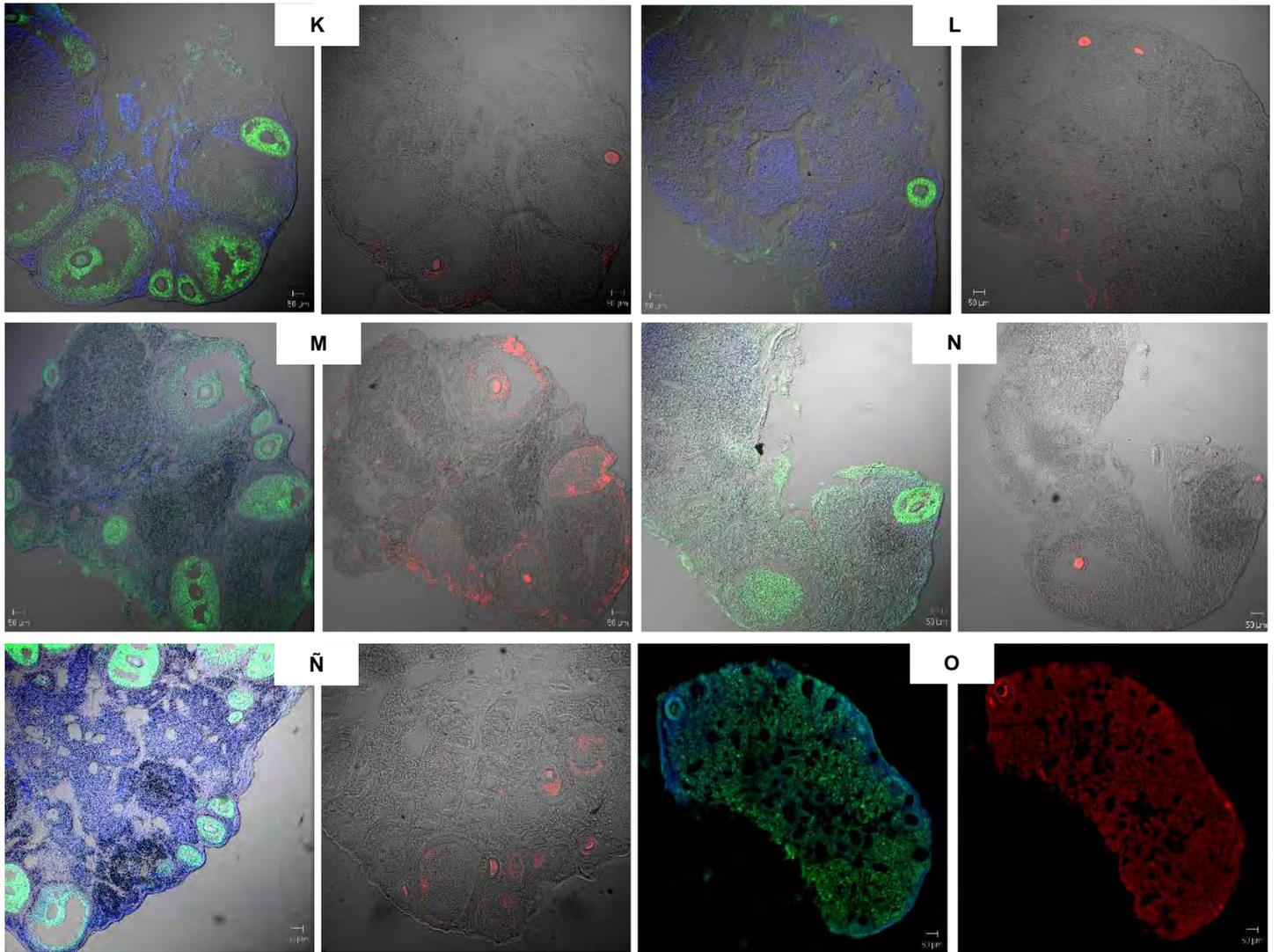
La proteína de FOG2 se localizó en el citoplasma de ovocitos de folículos preantrales y antrales, y en menor distribución en células de la granulosa de todos los folículos en crecimiento. Esta proteína no se observó en ninguna otra estructura folicular y tampoco en el tejido estromático (Fig. 6 C,D).

En cuanto a la morfología del ovario de 30 dpp no se observaron diferencias tanto en las hembras  $XY^{tir}$  como  $XX$ , los ovarios de ambas cepas son muy similares en cuanto a tamaño. Sin embargo, entre la edad de 40 y 50 dpp, en ovarios de hembras  $XY^{tir}$  se observó un menor número de folículos comparando con ovarios  $XX$ , así como una disminución en el tamaño de la estructura ovárica. En ovarios de 60 a 100 dpp de hembras fenotípicas  $XY^{tir}$  es evidente la disminución en el número de folículos en todas las etapas de crecimiento, los cuales posteriormente se cuantificaron. También se observó la reducción en el tamaño de la estructura ovárica al ser comparado con ovarios de hembras normales  $XX$ . Estos ovarios se caracterizaron por presentar una gran cantidad de cuerpos lúteos (Fig.7).



**Figura 6.** Localización de las proteínas AMH, GATA4 y FOG2 en ovarios de 40 dpp. Comparación en una sección entre el ovario B6 (A) y B6.Y<sup>tir</sup> (B). Análisis de inmunofluorescencia de AMH (verde) en combinación con GATA4 (azul). Marcaje de FOG2 (rojo) en los ovarios postnatales B6 (C) y B6.Y<sup>tir</sup> (D), en combinación con microscopia de Nomarski. Células de la granulosa (cg); células del estroma (ce); ovocito (ov). Barra= 10 μm.





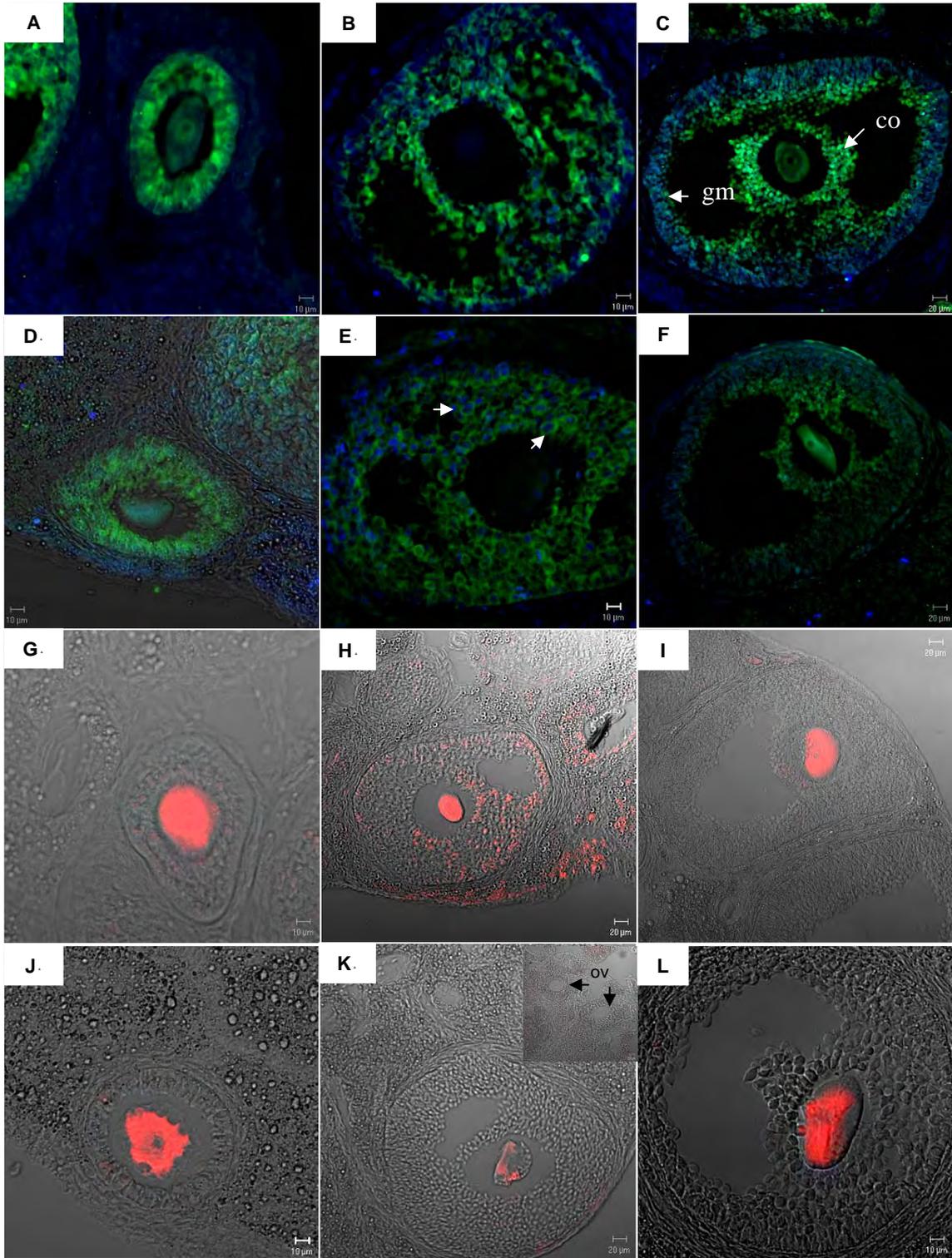
**Figura 7.** Inmunolocalización de la proteína AMH (verde) en combinación con el factor de transcripción GATA4 (azul) y la proteína FOG2 (rojo) en combinación con microscopía de Nomarski. Secciones de ovarios de hembras control B6 de edades de 30 dpp (A); 40 dpp (C); 50 dpp (E); 60 dpp (G); 70 dpp (I); 80 dpp (K); 90 dpp (M) y 100 dpp (Ñ). Secciones de ovarios de la cepa B6.Y<sup>fir</sup>, en edades de 30 dpp (B); 40 dpp (D); 50 dpp (F); 60 dpp (H); 70 dpp (J); 80 dpp (L); 90 dpp (N) y 100 dpp (O).

En todas las células de la granulosa que conforman los folículos, en distintas etapas de crecimiento, se observó la expresión de la proteína AMH, tanto en hembras XX como XY<sup>tiir</sup>, en el rango de las edades estudiadas (Fig. 8 A-F).

La AMH se localizó en todas las células de la granulosa de folículos preantrales (Fig. 8 A y D). En los folículos antrales tempranos, antrales y preovulatorios, AMH se restringió a la zona del *cumulus oophorus* conforme avanzó el crecimiento de los folículos y a escasas células de la granulosa murales, que están en contacto con la cavidad del antro (Fig. 8 B y C; D y F).

En cuanto al factor de transcripción GATA4, el cual colocalizó con AMH, se localizó en folículos en distintas etapas de desarrollo tanto en ovarios de la cepa B6.Y<sup>tiir</sup> como B6, con el mismo patrón de expresión (Fig. 8 A-F). Se encontró en todas las células de la granulosa en folículos preantrales pequeños (Fig. 8 A y D), posteriormente se localizó en células de la granulosa de folículos antrales y preovulatorios (Fig. 8 B y C; E y F). En el caso de los folículos preovulatorios a diferencia del patrón de expresión de la AMH, GATA4 disminuyó su expresión en células de la granulosa del *cumulus oophorus* y la mayor expresión se observó en células de la granulosa murales tanto en folículos de ovarios XX como XY<sup>tiir</sup> (Fig. 8 C y F).

La proteína de FOG2 en ovarios B6.Y<sup>tiir</sup> y B6 de edades de 30 a 40 dpp, se presentó en todos los ovocitos de folículos preantrales, antrales y preovulatorios (Fig. 7). Sin embargo, en la edad de 50 dpp, en algunos ovocitos XY<sup>tiir</sup>, tanto de folículos preantrales, antrales como preovulatorios no se detectó la expresión de esta proteína, o se observó muy reducida en el citoplasma al comparar con ovarios control XX (Fig. 8 J-L). De igual manera, en ovarios B6.Y<sup>tiir</sup> de 60 a 100 dpp se observó este patrón de expresión. En el caso de los ovarios de la cepa B6, los ovocitos de edades de 60 a 100 dpp, nunca pierden la expresión de FOG2, como en el caso de la cepa B6.Y<sup>tiir</sup>; sin embargo, después de la edad de 60 dpp en adelante, si se observó que en algunos ovocitos disminuye la expresión de FOG2 en el citoplasma, lo cual es más evidente en ovocitos de folículos preovulatorios.



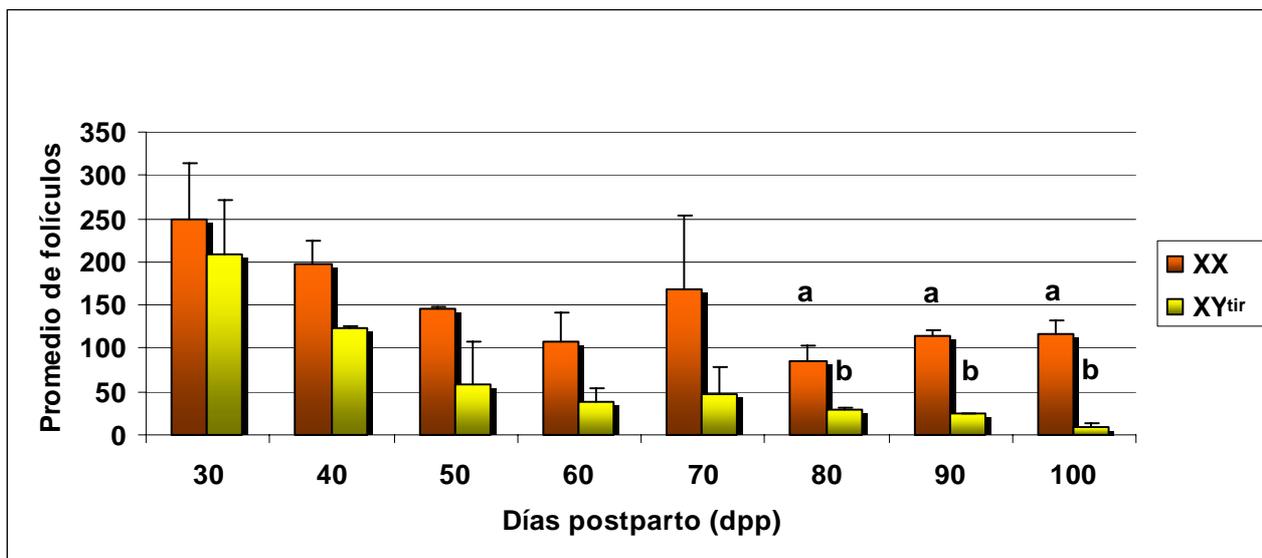
## Cuantificación de folículos en ovarios B6 y B6.Y<sup>tir</sup>

La estimación del número de folículos en ovarios en diferentes etapas del desarrollo es un importante indicador del proceso de foliculogénesis en relación a las señales endocrinas, es decir, los mecanismos paracrinos y autocrinos que controlan el crecimiento y maduración de los ovocitos, así como de las células foliculares (Myers *et al.*, 2004). Por lo anterior se llevó a cabo el conteo total de folículos en los ovarios de ratón con reversión sexual de la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, el cual se comparo con ovarios control B6, en edades de 30 a 100 dpp. Se realizaron los cortes de ovarios de ambas cepas y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y se analizaron mediante microscopia de campo claro.

Se observó un mayor número de folículos en todas las edades analizadas en los ovarios XX en comparación con los ovarios XY<sup>tir</sup>, desde los 30 dpp. Es notable destacar que conforme va incrementando la edad tanto en hembras control como en hembras XY<sup>tir</sup>, hay una tendencia a la disminución del número de folículos. Aunque en las edades de 50 a 90 para ovarios XY<sup>tir</sup> parece constante y posteriormente a la edad de 100 dpp la disminución del número de folículos es drástica, lo cual es congruente con la inmunohistoquímica realizada para esta edad. Se llevó a cabo el análisis estadístico empleando una t-Student, para cada edad comparando entre la cepa B6 y la cepa B6.Y<sup>tir</sup>. Las edades que presentaron diferencia estadísticamente significativa fueron 80 dpp ( $p=0.158334$ ), 90 dpp ( $p=0.140893$ ) y 100 dpp ( $p=0.376167$ ) (Fig. 9).

---

**Figura 8.** Inmunolocalización de la proteínas AMH/GATA4 en folículos preantrales (A), antrales (B) y preovulatorios (C) de la cepa B6; y de la cepa B6.Y<sup>tir</sup> (D, E y F) de 50 dpp. La señal de GATA4 (azul) se detecta en el núcleo de células de la granulosa y la AMH (verde), se observa en el citoplasma de células de la granulosa (flechas). Inmunolocalización de la proteína de FOG2 en combinación con microscopia de Nomarski, en ovarios B6 de 50 dpp (G, H e I). FOG2 se localiza en el ovocito de folículos preantrales (G), antrales, en donde también se observa la presencia de esta proteína en algunas células de la granulosa (H), y preovulatorios (I). (J, K y L) Localización de la proteína de FOG2 en combinación con Nomarski en ovarios B6.Y<sup>tir</sup> de 50 dpp. Folículo preantral (J), antral (K), donde también se observó que en algunos no se detecta (recuadro), y preovulatorios (L). Células de la granulosa murales (gm); células de la granulosa que forman el *cumulus oophorus* (co); ovocito (ov).



**Figura 9.** Cuantificación de folículos totales en ovarios B6 y B6.Y<sup>tir</sup> comparando edades de 30-100 dpp. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$ , letras diferentes representan diferencias significativas entre los dos grupos.

### Secuenciación

Se realizó un análisis de secuenciación para determinar la identidad de las bandas que corresponden a los tres genes Amh (120pb), Gata4 (520 pb) y Fog2 (406 pb). De lo anterior, se corroboró que los tres genes corresponden al ARNm descrito en el Banco de Genes como se muestra en la tabla 4, reportando el porcentaje de identidad obtenido empleando el oligonucleótido sentido. Los resultados de la amplificación para Amh, Gata4 y Fog2 se confirman mediante las gráficas de alineación (Fig. 10).

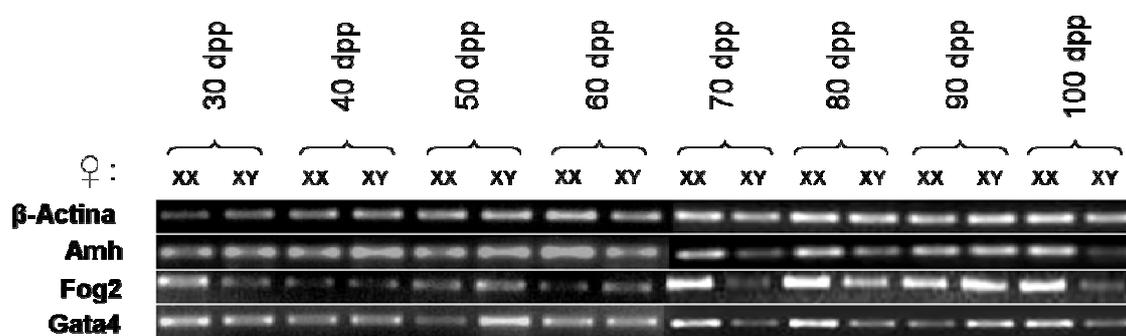
**Tabla 4.** Porcentaje de identidad de los genes amh, Gata4 y Fog2 con el banco de genes.

GeneBank	Gen	Especie	Identidad (%)
NM_007445.2	Hormona Anti-Mulleriana (Amh)	<i>Mus musculus</i>	89/92 (96 %)
NM_008092.3	Proteína de unión a GATA4 (Gata4)	<i>Mus musculus</i>	248/256 (96%)
AF107306.1	Proteína de dedos de zinc FOG2 (Fog2)	<i>Mus musculus</i>	192/198 (96%)



## RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa - Transcriptasa reversa) semicuantitativa y en tiempo real

Por RT-PCR semicuantitativa se amplificaron los fragmentos de los genes Amh, Gata4 y Fog2 a partir del ARN total de ovarios de hembras XX y XY<sup>tir</sup> en edades de 30 a 100 dpp. Tanto en los ovarios B6 como B6.Y<sup>tir</sup>, en todas las edades estudiadas se expresan los tres genes. Se empleo como control positivo ARN total derivado de testículos adultos y en cada experimento se incluyo el control sin la enzima retrotranscriptasa (Fig. 11).



**Figura 11.** Experimento representativo del análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa de los genes Amh (120 pb), Gata4 (520 pb) y Fog2 (406 pb) en ovarios XX y XY<sup>tir</sup> de 30 a 100 dpp. El gen  $\beta$ -actina (243 pb) se utilizó como un control común para ambos grupos. Electroforesis en gel de agarosa 1%.

Una vez que se determinó la presencia de los fragmentos de estos genes en ovarios XX y XY<sup>tir</sup>, se cuantificaron los niveles de expresión de cada uno en las diferentes edades estudiadas empleando la técnica de RT-PCR en tiempo real acoplado el fluoróforo SYBR Green I.

Primero se llevó a cabo el análisis de los niveles de expresión de cada uno de los genes para los ovarios de hembras control B6 y B6.Y<sup>tir</sup> a lo largo del tiempo (edades 30 a 100 dpp), de manera independiente empleando una ANOVA seguida de la prueba de Duncan.

Mediante el análisis de RT-PCR en tiempo real para el gen Gata4 en ovarios de hembras control B6, se pudo observar que conforme aumentó la edad se presento

una variación en la expresión de este gen (ANOVA  $p= 0.030$ ), ya que la expresión en 40 dpp es estadísticamente diferente comparándola con las edades de 80 a 100 dpp (40-80 dpp,  $p= 0.02$ ; 40-90 dpp,  $p= 0.01$ ; 40-100,  $p= 0.011$ ), a su vez, ovarios de 50 dpp presentaron diferencias significativas con 90 y 100 dpp (50-90 dpp,  $p= 0.042$ ; 50-100 dpp,  $p= 0.045$ ) (Fig.12).

Por otra parte, cuando se realizó el análisis para el gen Gata4 en ovarios de hembras B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas edades. Sin embargo, se pudo observar cierta tendencia a la disminución de los niveles de expresión de este gen conforme aumentó la edad de los ovarios (Fig. 13). Estos datos coinciden con los empleados para inmunohistoquímica, en la cual se pudo observar que va disminuyendo la marca de la proteína GATA4 en hembras XY<sup>tir</sup> aunque no es tan claro para los ovarios control XX. Sin embargo, tomando en cuenta que la proteína de Gata4 también se expresa en las células del estroma del ovario, es claro, que esto influye en los niveles de expresión que observamos, para ovarios control B6 y B6.Y<sup>tir</sup>.

En cuanto a los niveles de expresión de Amh en ovarios control XX, se observó que la edad de 30 dpp presentó niveles de expresión con un alto número de transcritos, que se distinguen del resto de las edades analizadas (ANOVA  $p= 0.0014$ ). La edad de 30 dpp presentó diferencias estadísticamente significativas con las edades de 40 a 100 dpp (30-40 dpp,  $p= 0.0084$ ; 30-50 dpp,  $p= 0.006$ ; 30-60,  $p= 0.0013$ ; 30-70 dpp,  $p=0.0007$ ; 30-80 dpp,  $p=0.0008$ ; 30-90 dpp,  $p= 0.0003$ ; 30-100 dpp,  $p= 0.0002$ ). Sin embargo, en ovarios de 40 a 100 dpp no se observaron variaciones drásticas en cuanto a los niveles de expresión de este gen (Fig. 14), lo que coincide con la presencia constante de la proteína AMH en ovarios con las mismas edades (Fig. 7) y con un mayor número de folículos (Fig. 9) para los ovarios control B6.

Para el caso de ovarios XY<sup>tir</sup>, la expresión del gen Amh presentó variación entre las distintas edades analizadas (ANOVA  $p= 0.00002$ ). La edad de 30 dpp tuvo diferencias estadísticamente significativas con 70 a 100 dpp (30-70,  $p= 0.007$ ; 30-80 dpp,  $p= 0.001$ , 30-90 dpp,  $p= 0.000031$ , 30-100 dpp,  $p= 0.000021$ ), 40, 50 y 60

dpp con 80-100 dpp (40-80 dpp,  $p= 0.02$ ; 40-90 dpp,  $p= 0.001$ ; 40-100 dpp,  $p= 0.0003$ ; 50-80 dpp,  $p=0.012$ ; 50-90 dpp,  $p=0.001$ ; 50-100 dpp; 60-80 dpp,  $p=0.017$ ; 60-90 dpp,  $p= 0.0016$ ; 60-100 dpp,  $p= 0.0002$ ) y 70 dpp con 90-100 dpp (70-90 dpp,  $p= 0.021$ ; 70-100 dpp,  $p= 0.004$ ). Es notable que las principales diferencias que se observaron con respecto a los niveles de transcritos del gen *Amh* fueron entre ovarios con edades más tempranas comparando con ovarios de edades avanzadas, lo que indicó una disminución en la expresión de este gen, conforme aumento la edad de los ovarios (Fig.15). Este análisis coincidió con lo encontrado mediante inmunohistoquímica, conforme aumentó la edad de los ovarios  $B6.Y^{tir}$  se observó disminución en el número de folículos y por lo tanto la presencia de la proteína y el número de transcritos del gen *Amh* también disminuyeron. A la edad de 30 dpp encontramos la mayor presencia de la proteína AMH y en 100 dpp la presencia disminuye drásticamente.

El gen *Fog2* presentó variación en sus niveles de expresión en ovarios XX de hembras control entre edades de 30 a 100 dpp (ANOVA  $p= 0.00001$ ). Ovarios de 30 dpp presentaron el mayor número de transcritos y presentaron diferencia significativa con las edades de 40 a 100 dpp (30-40 dpp,  $p= 0.00025$ ; 30-50 dpp,  $p= 0.000057$ ; 30-60 dpp,  $p= 0.000026$ ; 30-70 dpp,  $p= 0.000020$ ; 30-80 dpp,  $p= 0.000023$ ; 30-90 dpp,  $p= 0.000034$ ; 30-100 dpp,  $p= 0.000074$ ). Los ovarios XX también presentaron diferencias significativas en el número de transcritos del gen *Fog2* con ovarios de 60 a 80 dpp (40-60 dpp,  $p= 0.048$ ; 40-70 dpp,  $p= 0.026$ ; 40-80 dpp,  $p= 0.043$ ) (Fig. 16). En el caso de la proteína FOG2 en ovarios XX, se observó constante en las primeras edades, sin embargo en edades a partir de 80 dpp disminuye.

Los ovarios  $XY^{tir}$ , presentaron una variación en el número de transcritos del gen *Fog2* en ovarios con edades de 30 a 100 dpp (ANOVA  $p= 0.000001$ ). 30 dpp es la edad con los niveles más altos de transcritos comparados con edades de 40-100 dpp (30-40 dpp,  $p= 0.000062$ ; 30-50 dpp,  $p= 0.000135$ ; 30-60 dpp,  $p= 0.000055$ ; 30-70 dpp,  $p= 0.000026$ ; 30-80 dpp,  $p= 0.000033$ ; 30-90 dpp,  $p= 0.000023$ ; 30-100 dpp,  $p= 0.000020$ ). A su vez, ovarios  $XY^{tir}$  con 40 y 50 dpp también presentaron diferencias significativas con los niveles de transcritos detectados entre los 90 y

100 dpp (40-90 dpp,  $p= 0.012$ ; 40-100 dpp,  $p= 0.00024$ ; 50-90 dpp,  $p= 0.0105$ ; 50-100 dpp,  $p= 0.00020$ ) y a los 60, 70 y 80 dpp se encontraron diferencias significativas con respecto a 100 dpp (60-100 dpp,  $p= 0.0032$ ; 70-100 dpp,  $p= 0.0095$ ; 80-100 dpp,  $p= 0.0059$ ) (Fig. 17).

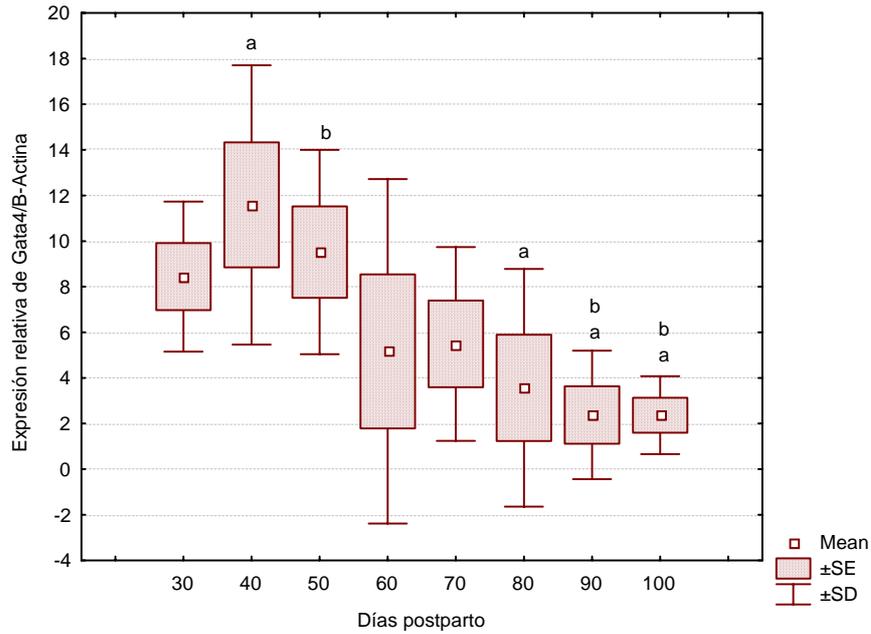
Los niveles de transcritos para este gen disminuyeron conforme aumentó la edad de los ovarios XY<sup>tir</sup>, estos datos comparados con los datos de inmunohistoquímica son congruentes, se observó que a mayor edad la presencia de la proteína disminuye debido a la reducción progresiva del número de folículos. Por otra parte, el decremento en los niveles de expresión también pueden deberse a la ausencia o disminución de la proteína de FOG2 en el citoplasma de los ovocitos XY<sup>tir</sup>, lo cual se demostró mediante inmunohistoquímica de las secciones de ovarios B6.Y<sup>tir</sup> a partir de 50 dpp, fenómeno que continúa en todas las edades analizadas.

Una vez que se realizó el análisis de los ovarios B6 y B6.Y<sup>tir</sup> y se determinó la expresión de estos genes a lo largo del tiempo de forma independiente, se llevó a cabo una comparación entre ellos. En el análisis comparando los niveles de expresión del gen Gata4 de ovarios XX con XY<sup>tir</sup>, para cada edad demostró que de 30 a 100 dpp no se presentaron diferencias significativas entre ellos. Aunque como se observó de forma independiente para ovarios XX y XY<sup>tir</sup> hay una variación en las distintas edades, disminuyendo el número de transcritos de este gen conforme la edad de los ovarios aumento (Fig.18).

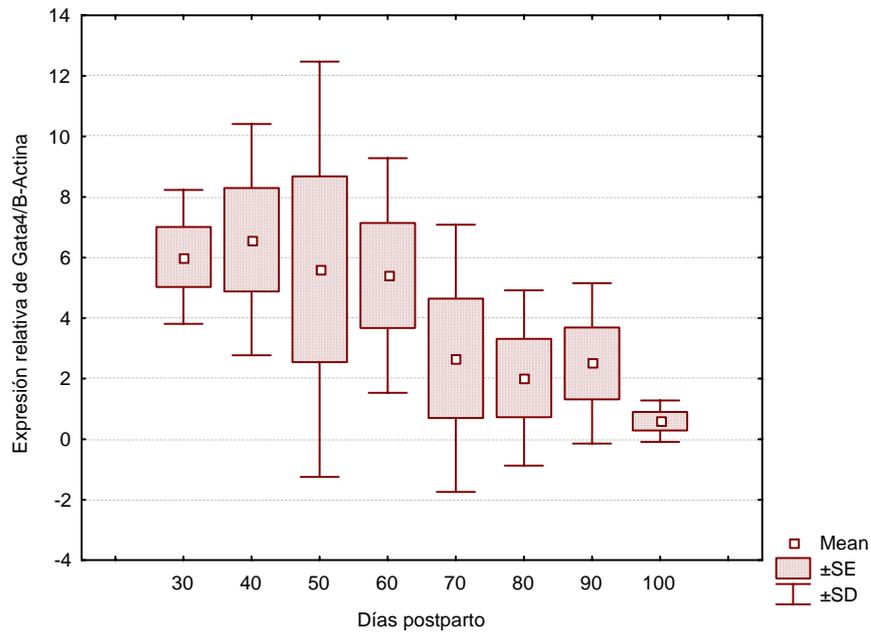
En el caso del gen Amh, se observó diferencia significativa entre ovarios XX y XY<sup>tir</sup> en las edades de 80 a 100 dpp (80 dpp,  $p= 0.049$ ; 90 dpp,  $p= 0.016$ ; 100 dpp,  $p= 0.001$ ) (Fig.19). Estos datos son comparables con la presencia de la proteína AMH en edades de 80 a 100 dpp, en donde se observó una drástica disminución de la proteína asociado con disminución en el número de folículos

El gen Fog2 presentó diferencias significativas en ovarios B6 de 90 dpp comparados con ovarios B6.Y<sup>tir</sup> de la misma edad ( $p= 0.0030$ ), al igual que ovarios de 100 dpp para ambas cepas ( $p= 0.021$ ) (Fig.20). La presencia de la proteína

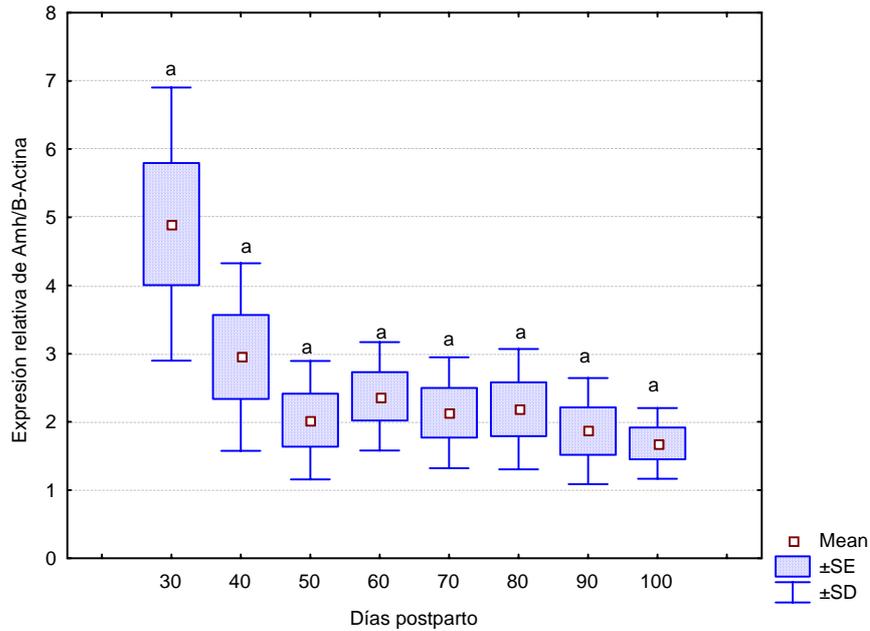
FOG2 en estas edades tiene un patrón similar a los niveles de transcritos detectados. En ovarios XX en 90 y 100 dpp la proteína se observó en el citoplasma de los ovocitos de los folículos en varias etapas del crecimiento, mientras que para los ovocitos XY<sup>tiir</sup>, la expresión de esta proteína disminuyó e incluso no se localizó en algunos folículos.



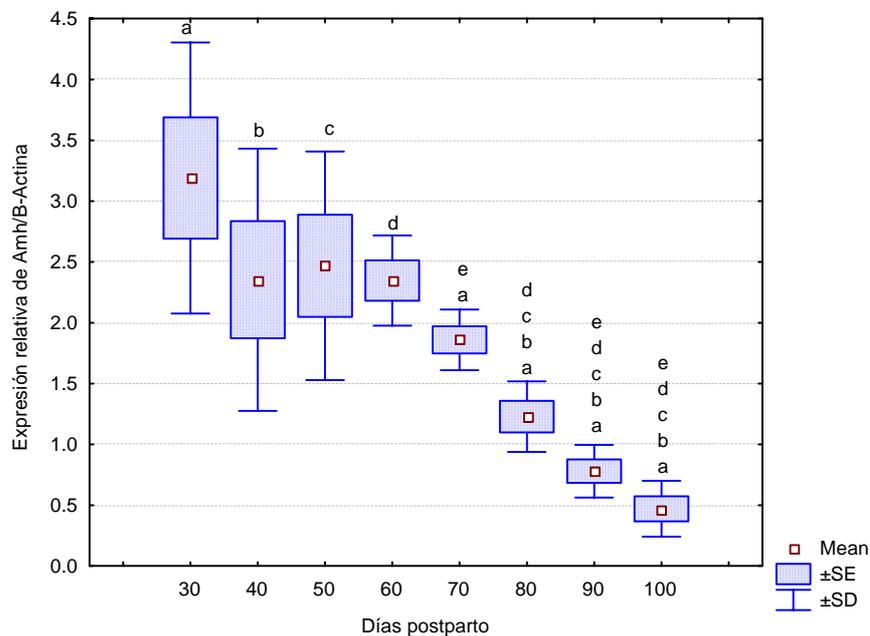
**Figura 12.** Patrón de expresión del gen Gata4 en ovarios de ratón B6 con genotipo XX. Se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 40 vs 80 – 90 -100 dpp (a), 50 vs 90 – 100 dpp (b). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (ANOVA, seguida por una prueba de Duncan).



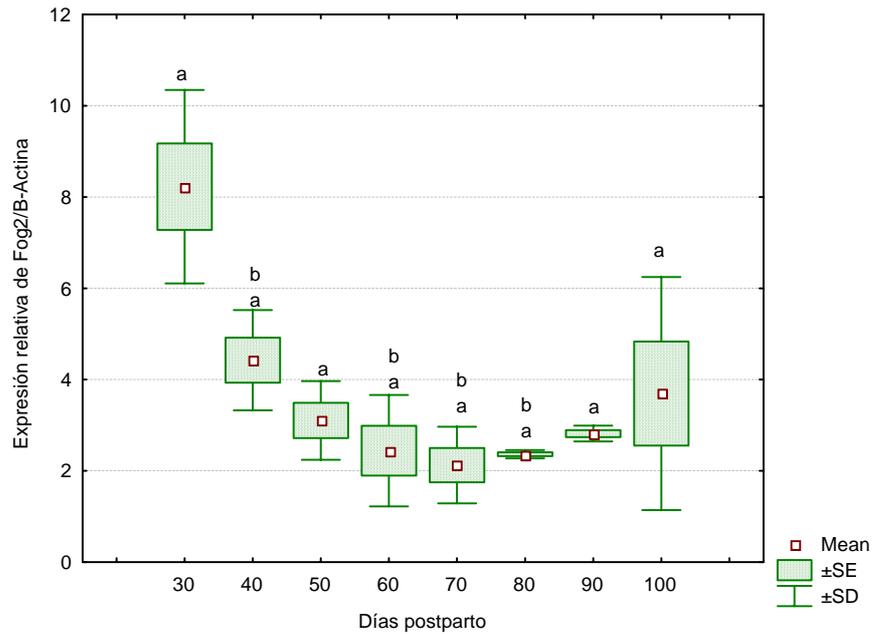
**Figura 13.** Patrón de expresión del gen Gata4 en ovarios de ratón B6.Y<sup>irr</sup> con genotipo XY. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de este gen entre ninguna de las edades estudiadas. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (ANOVA, seguida por una prueba de Duncan).



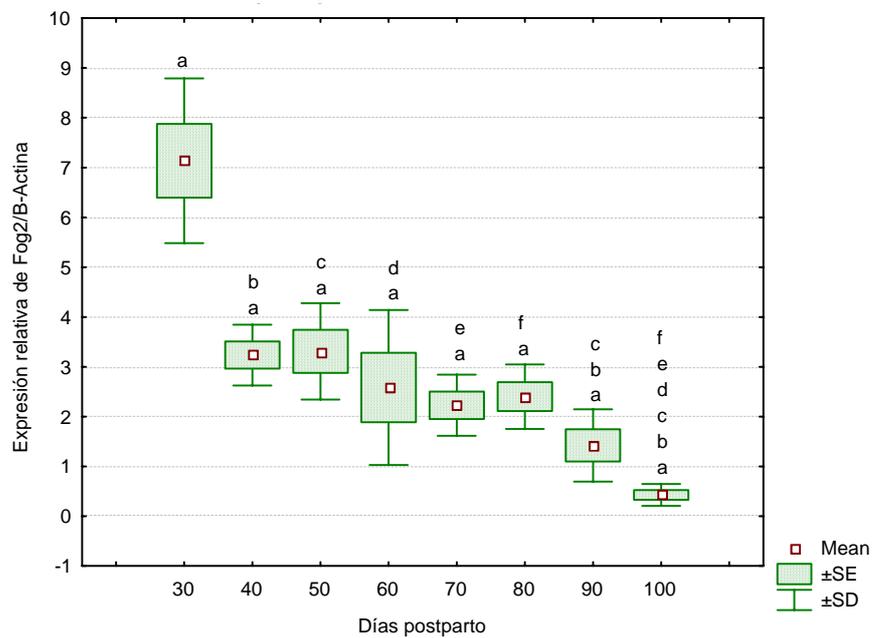
**Figura 14.** Patrón de expresión de transcritos del gen Amh en ovarios de ratón B6 con genotipo XX. Se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 30 dpp con todas las edades analizadas (a). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (ANOVA, seguida por una prueba de Duncan).



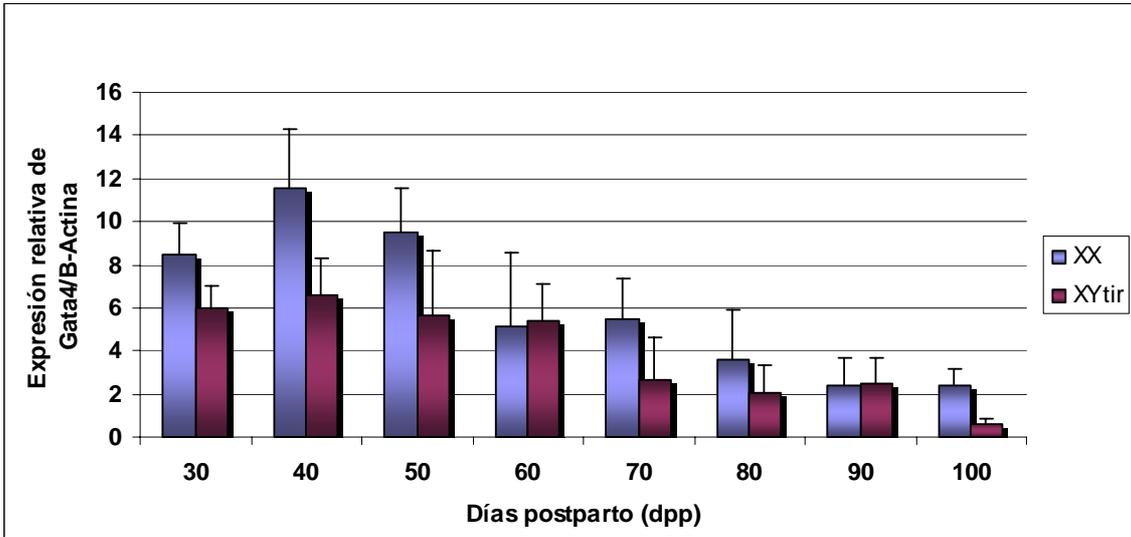
**Figura 15.** Niveles de expresión de transcritos del gen Amh en ovarios de ratón B6.Y<sup>irr</sup> con genotipo XY. Se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 30 vs 70 – 80 - 90 – 100 dpp (a), 40 vs 80 - 90 -100 dpp (b), 50 vs 80 -90 -100 dpp (c), 60 vs 80 – 90 -100 dpp (d), 70 vs 90 -100 dpp (e). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (ANOVA, seguida por una prueba de Duncan).



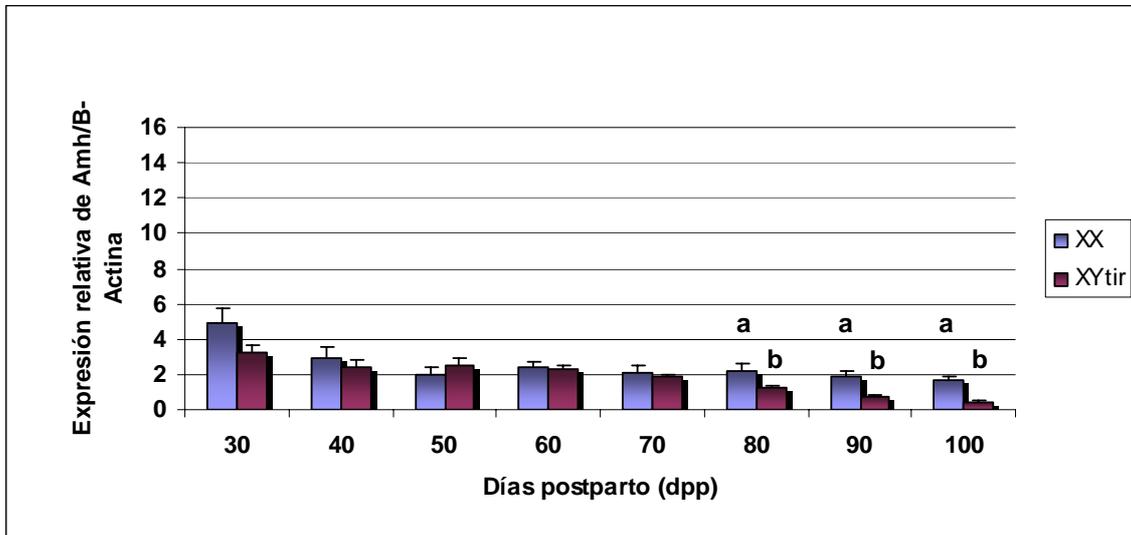
**Figura 16.** Niveles de expresión del gen Fog2 en ovarios de ratón B6 con genotipo XX. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 30 y todas las edades analizadas (a), 40 vs 60 - 70 -80 dpp (b). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (ANOVA, seguida por una prueba de Duncan).



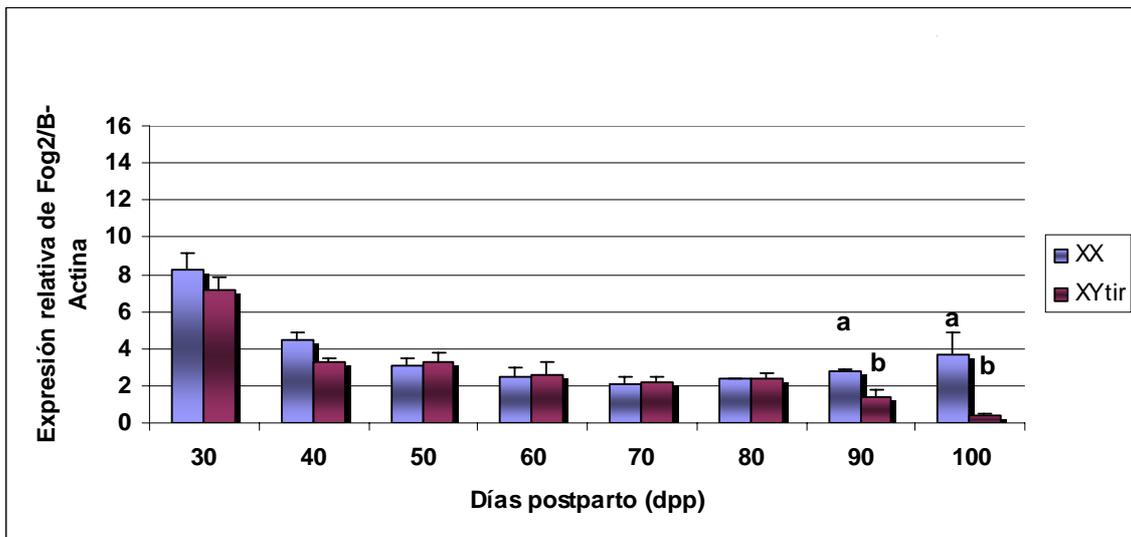
**Figura 17.** Patrón de los niveles de expresión del gen Fog2 en ovarios de ratón B6.Y<sup>Tir</sup> con genotipo XY. Se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 30 y todas las edades analizadas (a), 40 vs 90 -100 dpp (b), 50 vs 90 -100 dpp (c), 60 vs 100 dpp (d), 70 vs 100 dpp (e), 80 vs 100 dpp (f). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (ANOVA, seguida por una prueba de Duncan).



**Figura 18.** Expresión relativa del gen Gata4 en ovarios de ratón B6 y B6.Y<sup>tir</sup>. En ninguna de las edades se encontró diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión de este gen comparando ovarios XX y XY<sup>tir</sup> de la misma edad. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (t-Student).



**Figura 19.** Expresión relativa del gen Amh en ovarios de ratón B6 y B6.Y<sup>tir</sup>. A partir de 80 dpp se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 80 XX - 80 XY<sup>tir</sup> (a), 90 XX - 90 XY<sup>tir</sup> (b) y 100 XX - 100 XY<sup>tir</sup> (c). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  ESM.  $p \leq 0.05$  (t-Student).



**Figura 20.** Expresión relativa del gen Fog2 en ovarios de ratón B6 y B6.Y<sup>tir</sup>. A partir de 90 dpp se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de este gen entre: 90 XX - 90 XY<sup>tir</sup> (a), 100 XX – 100 XY<sup>tir</sup> (b). Los resultados están expresados como la media ± ESM.  $p \leq 0.05$  (t-Student).

## 7. DISCUSIÓN

En la década de los ochentas, Eicher y colaboradores (1982) describieron un modelo de reversión sexual en ratones, que asemeja algunas anomalías del sexo descritas en humanos. En esta cepa de ratones, denominada B6.Y<sup>tir</sup>, existe una reversión sexual de macho a hembra con desarrollo de ovarios bilaterales y fenotipo femenino. Hasta el momento esta condición de reversión sexual se ha mantenido, lo cual en este estudio se ha corroborado amplificando por PCR un fragmento del gen Zfy, característico del cromosoma Y. Se emplearon 27 camadas, donde en promedio se identificaron 2 machos revertidos (hembras B6.Y<sup>tir</sup>) por camada. Las hembras B6.Y<sup>tir</sup> mantenidas en nuestro laboratorio, presentan una conducta de apareamiento normal; sin embargo, de acuerdo a lo reportado (Eicher *et al.*, 1982), son estériles.

Estudiando esta condición de reversión sexual en el ratón B6.Y<sup>tir</sup>, algunos autores han propuesto que esta anomalía podría deberse a una inapropiada interacción entre el gen determinante del testículo (Sry) en el cromosoma Y<sup>tir</sup> y genes autosómicos dominantes en el genoma de la cepa C57BL/6J(B6), pero la identificación de estos genes aún no es conocida (Moreno *et al.*, 2004). Se ha encontrado que la expresión del gen Sry en las gónadas B6.Y<sup>tir</sup> se inicia al mismo tiempo que en el desarrollo normal pero su expresión persiste por más tiempo (Lee y Taketo, 1994). Aunado a esto, se sugirió que bajos niveles de expresión de Sry podría ser la causa de la falla de la diferenciación testicular (Nagamine *et al.*, 1999). Sin embargo, posteriormente Lee y Taketo (2001) observaron que los niveles de transcritos de Sry en las gónadas de un macho normal de la cepa C57BL/6J(B6) son similares a los de las gónadas B6.Y<sup>tir</sup>, lo cual sugiere que los bajos niveles de transcritos de Sry no pueden ser la única causa de la reversión sexual.

Aunque la expresión de genes determinantes de la diferenciación testicular, como Sry (Lee y Taketo, 1994) y Sox9 (Moreno *et al.*, 2004), se lleva a cabo en la gónada B6.Y<sup>tir</sup>, la diferenciación morfológica de la gónada es dirigida hacia ovario.

El desarrollo ovárico, se lleva a cabo normalmente hasta el inicio de la pubertad, donde posteriormente se observa una degeneración masiva de folículos y por lo tanto una esterilidad precoz.

Al respecto se han realizado varios estudios tratando de explicar la causa de la esterilidad de las hembras B6.Y<sup>tir</sup> o machos revertidos. En un principio se pensó que la ausencia de un cromosoma X podría ser la causa de dicha esterilidad. Sin embargo, se ha reportado que ratones hembras XO son fértiles a pesar de carecer de un segundo cromosoma X y presentar un número reducido de ovocitos al ser comparados con hembras con dosis normal de cromosomas sexuales (Burgoyne y Baker, 1981; Lyon y Hawker, 1973). Por lo tanto, podría sugerirse que factores presentes en el cromosoma Y<sup>tir</sup> pueden estar alterando la función normal del ovario.

Dentro de los primeros mecanismos abordados para entender la esterilidad de las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, se analizó el inicio y mantenimiento del ciclo estral, el cual consiste de una serie de eventos endocrinos regulados de forma precisa y controlados a través del eje hipotálamo-hipófisis-gónada el cual se establece durante la pubertad (Norris, 1997).

En un estudio realizado por Taketo y colaboradores (1989), se reporta que las hembras B6.Y<sup>tir</sup> pierden su ciclo estral regular, aunque conservan la capacidad de aparearse y ovular después de ser tratadas con gonadotropinas. Específicamente, en este estudio se determinó que hembras XX de 70 a 90 dpp, presentaron ciclos estrales regulares (3-5 días por ciclo), en contraste a las hembras XY<sup>tir</sup> de las mismas edades, en las cuales no observaron ciclos estrales regulares sino por el contrario, todas permanecieron en estado de diestro. Todas las hembras XY<sup>tir</sup> con edades de 110 a 150 dpp, se encontraron en estado de cornificación vaginal. El monitoreo diario realizado en hembras XX y XY consistió de 3 a 4 semanas, con un promedio de 5 y 6 animales.

En contraste, en nuestro trabajo se realizó un monitoreo diario de las hembras XY<sup>tir</sup> y de las cepas control B6 y CD1, desde la edad de 30 dpp, etapa señalada como el inicio de la pubertad en el ratón, hasta los 100 días de edad. Las tres cepas presentan ciclos estrales a partir de los 30 dpp. En el caso de las hembras

de la cepa B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual, se observó que conforme aumentó la edad el número de ciclos disminuyó con respecto a las hembras control B6 y CD1. Es decir, en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, es evidente que cada ciclo se prolonga; sin embargo, el monitoreo llevado a cabo hasta los 100 dpp, nos indicó que no han perdido la capacidad de mantener patrones cíclicos estrales. Determinando la frecuencia de las etapas del ciclo estral desde los 30 hasta los 100 dpp, encontramos que conforme aumenta la edad en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, la etapa del ciclo estral con mayor permanencia fue la de diestro, prolongando cada uno de los ciclos que presentan las hembras B6.Y<sup>tir</sup>. Pero contrario a lo reportado, hasta la edad de 100 dpp estas hembras no se mantienen en un estado de diestro permanente. Aunque no se descarta la posibilidad de un monitoreo posterior a la edad de 100 dpp, para determinar si las hembras permanecen en diestro.

Se sabe que existe una estrecha relación entre el ciclo estral y el crecimiento folicular. El estudio del número de folículos puede proveer información importante acerca de la función ovárica, en particular la relación que existe entre el mecanismo de la foliculogénesis y los factores que regulan este proceso. Con mayor detalle se pueden determinar las funciones de las gonadotropinas, hormonas esteroideas y de los factores de crecimiento intraováricos locales en la regulación de la sobrevivencia y maduración de folículos en cualquier estado de su desarrollo (Myers *et al.*, 2004).

Mediante análisis histológicos se ha observado que los ovarios XY<sup>tir</sup> poseen un número menor de folículos que los ovarios provenientes de hembras normales XX. El estudio en ovarios XY<sup>tir</sup> en etapa fetal sugiere que esto puede deberse a una muerte masiva de ovocitos, la cual se da entre los 16-18 dpc principalmente en la zona medular (Taketo *et al.*, 1989) a pesar de que los ovocitos que permanecen en la zona de la corteza continúan desarrollándose formando folículos, los cuales pueden ser ovulados.

Al evaluar los niveles de hormonas esteroideas en los ovarios XY<sup>tir</sup> de 14-35 dpp, se observó que estos producen bajos niveles de esteroideas al compararlos con ovarios XX, desde el período neonatal hasta la pubertad. Se ha propuesto que debido a la pérdida de ovocitos y consecuentemente de células esteroideogénicas

intersticiales en la zona de la médula en la etapa prenatal es que se da una función endocrina anormal (Villalpando *et al.*, 1993).

En el presente trabajo se realizó una caracterización completa de la población folicular en ratones de la cepa B6 y B6.Y<sup>tir</sup>. Los resultados obtenidos indican que el número de folículos totales que constituyen el ovario en los dos grupos disminuyen con respecto a la edad. Sin embargo, en hembras B6.Y<sup>tir</sup>, la población de folículos desciende más rápido que en los ratones C57BL/6J(B6) con genotipo XX. Aunque a la edad de 30 dpp no se encontraron diferencias significativas entre las dos cepas, entre las edades de 80 a 100 dpp el número de folículos disminuyó significativamente en las hembras B6.Y<sup>tir</sup>. El hecho de que no se detectaran diferencias significativas en el número de folículos totales entre ratones B6 y B6.Y<sup>tir</sup> al inicio de la pubertad, puede explicarse sobre el conocimiento de que los mecanismos involucrados en el desarrollo del ovario antes de los 30 dpp son intraováricos. Este indica que antes y durante el inicio del ciclo estral las hembras han tenido el desarrollo de un ovario que permite el establecimiento de un eje hipotálamo-hipófisis-gónada funcional. Estos datos coinciden con el trabajo de Taketo y colaboradores (1989), en el cual se reporta que el número de folículos en el ovario XY<sup>tir</sup> tiende a disminuir más rápidamente conforme avanza a la edad, con respecto al ovario XX. Alrededor de los 60 dpp, pocos folículos fueron observados en el ovario XY<sup>tir</sup> a diferencia de los ovarios XX, en los cuales se encontró una gran cantidad de folículos en varias etapas del desarrollo folicular. Por otro lado, el conteo total del número de folículos en la cepa B6.Y<sup>tir</sup> en el cual se observó una disminución a partir de la edad de 40 dpp en adelante también es consistente con el trabajo de Morales (2004, datos no publicados). En el cual la presencia de células apoptóticas en el ovario XY<sup>tir</sup> de 40 y 50 dpp correlaciona con la disminución drástica del número de folículos. De lo anterior, haciendo referencia a la frecuencia de los ciclos estrales que se observó en los machos revertidos B6.Y<sup>tir</sup> con el conteo del número total de folículos, se sugiere que la presencia de folículos en los ovarios XY<sup>tir</sup> de edades de 100 dpp, aunque es limitada, podría permitir la persistencia de ciclos estrales con etapa de diestro prolongada. Al existir un número pequeño de folículos se esperaría que los niveles de hormonas

esteroidogénicas que se están produciendo por parte de estos ovarios sea bajo, lo cual al parecer no impide al menos en las edades (100 dpp) analizadas, la continuidad del ciclo estral. Como se observó en el trabajo de Villalpando y colaboradores (1993), los bajos niveles de hormonas esteroides en etapas tempranas del desarrollo postnatal antes y durante la etapa de inicio de la pubertad no impide que el crecimiento folicular se continúe en algunos ovocitos en los ovarios XY<sup>tir</sup>. Con base en esto, es probable que la esterilidad de las hembras B6.Y<sup>tir</sup> no se deba a una anomalía del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, sino que al parecer es debido a factores intrínsecos del ovario.

Como se menciona, los ovocitos que permanecen en los ovarios XY<sup>tir</sup> en la etapa postnatal forman folículos morfológicamente normales, y se ha demostrado que son capaces de ser ovulados después de un tratamiento con gonadotropinas y de ser eficientemente fertilizados. Estos cigotos inician la segmentación pero mueren durante el período temprano de preimplantación, alcanzando sólo el estado de 1 ó 2 células. Sólo en dos casos, en los cuales se tomaron ovocitos llevando a cabo su maduración *in vitro* y posteriormente su fertilización, se obtuvieron cigotos que alcanzaron el estado de blastocisto (Merchant *et al.*, 1994; Amleh *et al.*, 1996). Por lo tanto, se sugiere que la incompetencia de los ovocitos en los ovarios XY<sup>tir</sup>, no es completamente programada durante su diferenciación y crecimiento, parece estar dada por múltiples factores (Amleh *et al.*, 1996).

Un estudio realizado por Amleh y colaboradores (2000), donde mediante microcirugías se intercambiaron los componentes citoplasmáticos y nucleares de los ovocitos XY<sup>tir</sup>, demostró que ambos son deficientes. Con respecto a los componentes nucleares se observó que en muchas de las células germinales (ovogonias) que inician la meiosis sus autosomas presentan apareamiento normal con sus homólogos; sin embargo, el cromosoma X y el Y permanecen sin aparearse durante la profase meiótica. De estos resultados se sugirió que la pérdida de apareamiento de X-Y, probablemente causa aneuploidía en algunos ovocitos, aunque al menos la mitad de los ovocitos recibe un número correcto de cromosomas, indicando que la aneuploidía por si sola no puede explicar los defectos nucleares en los ovocitos.

En condiciones normales, la regulación del crecimiento y maduración del ovocitos se da con la formación de los folículos, considerados la unidad funcional del ovario. En el caso de los ovarios XY<sup>tir</sup>, se ha observado que desarrollan la habilidad normal de regular la diferenciación de las células de la granulosa, aunque presentan sutiles diferencias. Observaciones al microscopio electrónico muestran que la expansión de las células del *cumulus oophorus* de folículos XY<sup>tir</sup> no alcanzan el tamaño máximo que presentan los controles XX, posiblemente debido a que fallan y no completan su diferenciación, a su vez, algunos ovocitos XY<sup>tir</sup> parece que no retienen el número apropiado de células de la granulosa en la zona del *cumulus oophorus* en los folículos antrales. También la zona pelúcida es más delgada tanto en folículos en estado preantral como antral, lo cual puede reflejar el número de células de la granulosa con las cuales puede hacer contacto el ovocito (Vanderhyden *et al.*, 1997).

De tal manera surge la necesidad de explorar si se presentan alteraciones en el ambiente somático que rodea a los ovocitos XY<sup>tir</sup>. En etapas embrionarias del desarrollo gonadal se ha establecido que en todas las gónadas que acarrean el cromosoma Y<sup>tir</sup> se expresa la proteína del gen Sox9 de los 11.5 a los 12.5 dpc al igual que en las gónadas normales de la cepa B6 con constitución cromosómica XY. De los 13.5 dpc en adelante la expresión de la proteína Sox9 esta ausente en el 50% de los embriones de la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, lo cual corresponde al número de gónadas que se desarrollan como ovarios XY<sup>tir</sup> (Moreno *et al.*, 2004), y a la proporción reportada por Eicher y colaboradores (1982). Moreno y colaboradores (2004), por RT-PCR también reportaron el patrón de expresión de los transcritos de Sox9 en gónadas fetales y postnatales de la cepa B6.Y<sup>tir</sup>. En ovarios de 18.5 dpc y de 30 dpp se detectaron transcritos de Sox9 en las células de la granulosa de algunos folículos en ovarios B6.Y<sup>tir</sup> de 30 dpp.

Estos hallazgos sugieren que el desarrollo anormal de las gónadas B6.Y<sup>tir</sup>, podría deberse a una falla parcial de la función de Sox9 como consecuencia de una reducida dosis en células pre-Sertoli, lo cual conduce al desarrollo de un ovotestis o al desarrollo de células foliculares en los ovarios B6.Y<sup>tir</sup>.

Por otra parte Morales (2004), estudiando el grado de diferenciación de las células de la granulosa en los ovarios XY<sup>tir</sup>, con base en la expresión de los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ , durante el crecimiento folicular (30 a 50 dpp), observó que ambos receptores se expresan en las células de la granulosa tanto en folículos preantrales y antrales; sin embargo, la expresión disminuye considerablemente en las células cercanas al ovocito, las cuales forman el *cumulus oophorus* en todas las edades analizadas, lo que sugiere un daño fisiológico en las células de la granulosa.

Considerando que la esterilidad en las hembras B6.Y<sup>tir</sup> (Eicher *et al.*, 1982; Taketo *et al.*, 1989; Marmolejo *et al.*, 1999) ocurre a nivel del ovario, se podría sugerir que la presencia anormal de transcritos de Sox9 (Moreno *et al.*, 2004), junto con la disminución en la expresión de receptores a estrógenos (Morales, 2004) podrían ser elementos clave que interrumpen el desarrollo del ovocito en los folículos provenientes de los ovarios XY<sup>tir</sup>. Sin embargo, la maduración de los ovocitos, así como, el proceso de foliculogénesis involucra otros factores tales como Amh, Gata4 y Fog2, que participan de manera importante como parte normal de la función ovárica. En el presente trabajo se analizó la localización de la proteína de los genes Amh, Gata4 y Fog2 y se midieron los niveles de transcritos de cada gen, con el fin de determinar si alguna alteración en estos factores podría contribuir a la falla en la maduración o función de los ovocitos, lo cual de forma directa o indirecta podría estar afectando el desarrollo postfertilización de óvulos XY<sup>tir</sup>.

MIS o AMH, es una glicoproteína dimérica sintetizada por las células de Sertoli fetales causante de la regresión de los conductos de Müller en los machos (Josso y Picard, 1986; Donahoe *et al.*, 1982; 1987; Cate y Wilson, 1993). Mediante hibridación *in situ* y detección inmunohistoquímica se ha demostrado que la transcripción de AMH y su producción coinciden con la organización de los cordones testiculares. La transcripción de AMH en las gónadas B6.Y<sup>tir</sup> también precede a la organización testicular, sin embargo, comienza a expresarse a los 12 dpc y no a los 11 dpc como en el caso de las gónadas XY normales, es decir, que el inicio de la expresión del gen AMH en las gónadas B6.Y<sup>tir</sup> parece estar retrasado. Estas gónadas que inician la expresión de AMH se desarrollan como

ovotestis en etapa fetal. En el caso de los ovarios B6.Y<sup>tir</sup>, se ha reportado la presencia temporal o ausencia de transcritos de Amh en la etapa fetal, sugiriendo que probablemente el inicio de la transcripción de Amh en los ovarios B6.Y<sup>tir</sup> este aún más retrasada que en los ovotestis (Lee y Taketo, 1994). Sin embargo, es en la etapa postnatal del desarrollo normal del ovario, donde se puede observar la expresión de Amh.

Aunque AMH tiene una clara función durante el desarrollo fetal del macho (Jost, 1953), su completa acción en el ovario no queda del todo clara. En los ovarios, la expresión de AMH esta presente sólo después del nacimiento, mientras que la expresión de su receptor AMHRII se encuentra tanto en el ovario como en las células mesenquimáticas que rodean a los conductos Müllermanos antes del nacimiento (di Clemente *et al.*, 1994; Baarends *et al.*, 1994).

En la etapa postnatal del ovario, tanto el ARNm de AMH como su receptor se localizan en las células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños. En el presente estudio, al analizar el patrón de expresión del gen Amh durante el reclutamiento folicular tanto inicial como cíclico, en los ovarios de la cepa B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual, al igual que en los ovarios B6, observamos que a los 30 dpp los niveles de transcritos son mas elevados que en el resto de las edades estudiadas (40-100 dpp). Esto sugiere que hay presencia de un número mayor de folículos en etapas muy temprana de crecimiento, lo cual concuerda con estudios previos que demostraron que las células de la pre-granulosa de folículos primordiales no expresan AMH, pero cuando los folículos son reclutados dentro de la población de folículos en crecimiento, las células de la granulosa inmediatamente comienzan a expresar AMH (Baarends *et al.*, 1995b; Durlinger *et al.*, 2002a; Münsterberd y Lovell-Badge, 1991; Taketo *et al.*, 1993).

En el ovario del ratón y la rata, la expresión de AMH se ha localizado inmediatamente después del proceso de reclutamiento inicial y continúa su expresión durante el crecimiento de los folículos. AMH modula dos pasos regulatorios de la foliculogénesis; inhibe el reclutamiento de los folículos primordiales y disminuye la sensibilidad de los folículos preantrales grandes y antrales pequeños a FSH (Gruijters *et al.*, 2003).

Es importante señalar que durante el proceso de foliculogénesis dos procesos de selección o reclutamiento pueden ser reconocidos. En el primer proceso conocido como reclutamiento inicial, los folículos son reclutados o seleccionados desde la población de folículos primordiales quiescentes. Durante la segunda selección, conocida como reclutamiento cíclico, folículos primarios son seleccionados para crecer hasta el estado preovulatorio. Esta segunda selección es el resultado del aumento de los niveles de FSH durante cada ciclo reproductivo. Sólo los folículos preantrales grandes y antrales pequeños los cuales son sensibles a FSH pueden ser rescatados del proceso de atresia (McGee y Hsueh, 2000).

En la edad de 30 dpp, momento en que inicia la pubertad en el ratón y se establece el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, comienza el reclutamiento cíclico de folículos para iniciar su crecimiento. En el caso de las cepas B6 y B6.Y<sup>tir</sup>, ambas presentan este proceso sin ninguna alteración, dado que aunque el número de transcritos de Amh en el la cepa B6.Y<sup>tir</sup>, es ligeramente menor, no se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa. Esto sugiere, que desde etapas muy tempranas del crecimiento de los folículos de ovarios B6.Y<sup>tir</sup>, la expresión del gen Amh no esta alterada. Este hallazgo se refuerza con la cuantificación de folículos de la misma edad, donde no se encontraron diferencias estadísticas al comparar el número de folículos detectados en ovarios B6.Y<sup>tir</sup> con ovarios de la cepa B6. En las edades de 40 a 100 dpp, los niveles de expresión de Amh continúan disminuyendo en ambas cepas al compararlas con los 30 dpp. Aunque, entre las dos cepas, se encontraron diferencias estadísticas entre las edades de 80 a 100 dpp. Estos resultados sugieren que existe una relación importante entre la disminución de la expresión de este gen y la pérdida de folículos en cada una de las edades monitoreadas, es decir, la pérdida de los folículos podría ser la causa de la disminución del número de transcritos del gen Amh.

Durlinger (2000) ha reportado que ovarios provenientes del ratón nulo para Amh de 4 meses de edad (120 dpp) son más grandes al ser comparados con ovarios normales. El incremento en el peso se atribuyó a un mayor número de folículo pequeños en crecimiento, lo que a su vez indicó un incremento en el reclutamiento de folículos primordiales para su desarrollo. En el caso del modelo B6.Y<sup>tir</sup> con

reversión sexual, al contrario del modelo de ratón nulo para Amh, a los 100 dpp se observó que el ovario disminuye drásticamente de tamaño debido a la pérdida de folículos, al ser comparado con los ovarios control. Estos datos apoyan el hecho de que la disminución tanto de transcritos como de la proteína de AMH en los ovarios XY<sup>tir</sup>, podría deberse a la pérdida prematura de folículos en diferentes etapas de crecimiento.

Por otra parte, hay que considerar la gran cantidad de cuerpos lúteos que presentan los ovarios B6.Y<sup>tir</sup> en las edades analizadas, lo cual podría indicar pérdida de los folículos posiblemente por muerte de los ovocitos y no debido a que los ovocitos hayan alcanzado su estado de madurez. Se ha reportado que en los ovarios nulos para Amh, a la edad de 120 dpp, el número de cuerpos lúteos no difiere al compararlos con los ovarios control (Durlinger, 2000).

En este modelo de ratón nulo para Amh, el incremento del reclutamiento aparentemente se da antes de que de inicio el ciclo estral, es decir, se inicia precozmente debido a que en estos ovarios se observa un incremento en el número de folículos. En contraste, a los 13 meses (390 dpp), tanto la población de folículos primordiales como de folículos en crecimiento ha disminuido considerablemente (Durlinger, 2000). La alta proporción de folículos primordiales reclutados podría conducir a una prematura extinción de la población de folículos, causando una temprana ausencia de ovulación como sucede normalmente en animales envejeciendo (Visser *et al.*, 2005).

En las hembras B6.Y<sup>tir</sup> los bajos niveles de transcritos detectados para el gen Amh parecen no concordar con las características descritas para el modelo del ratón nulo para este gen. En edades tardías (90 a 100 dpp) no encontramos gran proporción de folículos creciendo en los ovarios XY<sup>tir</sup>, como en el caso del ovario nulo para AMH a los 120 dpp. En nuestro caso, el número de folículos disminuyó drásticamente, lo que sugiere el envejecimiento prematuro de estos ovarios. Por otra parte, el envejecimiento en los ovarios de los ratones nulos para Amh se detecta a los 390 dpp, cuando comienzan a disminuir el número de folículos en crecimiento, y es hasta la edad de 16 a 17 meses cuando estas hembras nulas detienen su ovulación y consecuentemente dejan de ciclar (Durlinger, 2000).

En este sentido, es importante tomar en cuenta que el efecto de AMH sobre el desarrollo del ovario puede explicarse también por la presencia de su receptor AMHR2, el cual también se expresa en las células de la granulosa tanto de ovarios fetales como postnatales (di Clemente *et al.*, 1994; Baarends *et al.*, 1994).

Durante el ciclo estral, no se han detectado cambios marcados en los patrones de expresión del ARNm del gen *Amh* y de su receptor *Amhr2*, excepto en la etapa de estro, cuando una disminución heterogénea en la expresión de ambos se detectó en folículos preantrales (Baarends *et al.*, 1995a).

Mediante un análisis de Northern blot realizado en ovarios de ratas postnatales, Hirobe y colaboradores (1994), determinaron que los niveles de ARNm de *Amh*, a lo largo de las distintas etapas del ciclo estral es relativamente constante. Estos datos fueron corroborados cuantificando la proteína por Western blot en hembras normales CD1. En este caso, encontramos que los niveles de expresión permanecen sin diferencias significativas durante todas las etapas del ciclo estral (comunicación personal, A. Freyermuth). Por lo tanto, no podemos atribuir que los cambios en los niveles de expresión durante las edades estudiadas se deba a la etapa del ciclo estral en que se encontraban las hembras al momento de disectar los ovarios.

En cuanto a la presencia celular de la proteína de AMH en los folículos, esta coincide con la localización de los transcritos de este gen reportada por Salmon y colaboradores (2004). En nuestro estudio, la proteína se detectó en el citoplasma de las células de la granulosa, en todos los estadios del crecimiento folicular. La expresión también se observó en el ovocito de todos los tipos de folículos. Esta localización celular es similar al patrón detectado para los transcritos de *Amh*. Específicamente, en folículos pre-ovulatorios, se observaron tanto niveles altos de ARNm (Salmon *et al.*, 2004), como de la proteína (presentes resultados) en las células del *cumulus oophorus* más que en las células de la granulosa mural. Esto sugiere que la localización celular de la proteína no está alterada en las hembras B6.Y<sup>tm</sup>, pero no descarta la posibilidad de que los niveles de expresión sean diferentes.

Entre los factores de transcripción que recientemente se han implicado como potenciales reguladores de la expresión de genes gonadales, son las proteínas de unión a secuencias GATA. Uno de los miembros de esta familia es el factor de transcripción Gata4. Este factor se expresa al inicio del desarrollo gonadal del ratón en ambos sexos a partir de los 11.5 dpc y posteriormente, se ha sugerido que presenta un patrón dimórfico, es decir, su expresión disminuye en el ovario a partir de los 13.5 dpc (Viger *et al.*, 1998). Sin embargo, en un reporte más reciente Anttonen y colaboradores (2003) demostraron la persistencia de la expresión de este gen durante toda la vida fetal del ovario. En el caso del ovario de ratón, se ha reportado que el ARN mensajero de Gata4 incrementa su expresión después del nacimiento y persiste en las células de la granulosa a través de todos los estadios del desarrollo folicular. La presencia del transcrito también se observó moderadamente en las células intersticiales que conforman el ovario adulto. A su vez, la proteína de GATA4 fue detectada en el núcleo de células de la granulosa en cultivo (Heikinheimo *et al.*, 1997). Por lo tanto, la proteína y el mensajero de Gata4 están presentes en las células de la granulosa de ovarios de ratón. Este trabajo coincide con nuestros resultados en cuanto a la localización de la proteína tanto para las hembras B6 como las hembras B6.Y<sup>tir</sup>. En el caso de las hembras B6.Y<sup>tir</sup>, no se presentó ninguna alteración en el patrón de expresión de la proteína GATA4. En cuanto al número de transcritos que se observó en ovarios desde los 30 a 100 dpp, no se encontraron diferencias significativas entre las dos cepas, sin embargo, se observó una tendencia a la disminución del número de transcritos conforme aumenta la edad de los ovarios.

Con base en los patrones de expresión, Heikinheimo y colaboradores (1997) propusieron que GATA4 puede controlar genes involucrados en la maduración o manutención de las células de la granulosa dentro de los folículos (antes de la ovulación). La expresión de GATA4 puede contribuir a que las células foliculares tempranas lleguen al proceso de maduración. La abrupta disminución de GATA4 durante la ovulación o apoptosis indica que este factor no es requerido en los últimos estadios del desarrollo folicular. Es probable que conforme avanza la edad de los ovarios tanto de las hembras B6 como B6.Y<sup>tir</sup>, la tendencia a la disminución

se deba al proceso de ovulación y de apoptosis de un ovario normal. Como se mencionó anteriormente, GATA4 está directamente implicado en la regulación de la expresión del gen *Amh*, aunque también esta regulación está modulada por otros factores como *Sf1* en el caso de las células de Sertoli en el testículo fetal. En el caso del ovario adulto murino, se ha demostrado en condiciones *in vitro* que GATA4 es capaz de transactivar a *Amh*, en las células de la granulosa. La colocalización de las proteínas de GATA4 y AMH observada en nuestro estudio sugiere una interacción de estos dos genes en las células de la granulosa. El patrón de expresión de estas dos proteínas es similar en los folículos de ovarios XX y XY<sup>flir</sup>. Por lo que es probable que la interacción de estos genes en los folículos de los ovarios XY<sup>flir</sup> no está alterada.

Por otra parte, se ha demostrado que el factor FOG2 interactúa con el factor de transcripción GATA4 actuando como un represor en el caso del ovario adulto (Anttonen *et al.*, 2003). Los primeros reportes de la presencia de FOG2 en células de la granulosa se llevaron a cabo en ovarios humanos mantenidos en cultivo (Laitinen *et al.*, 2000). Posteriormente, se reportó la expresión de FOG2 en células de la granulosa de ovarios de ratón, en donde también se observó una colocalización parcial con la proteína de AMH (Anttonen *et al.*, 2003). Estos datos sugieren que tanto FOG2 como GATA4 tienen efectos sobre el gen *Amh* durante el desarrollo ovárico.

Aunado a esto, en nuestros estudios encontramos una colocalización de las proteínas GATA4 y AMH en las células de la granulosa de folículos en las diferentes etapas de crecimiento, pero no una colocalización de GATA4 con FOG2 en este mismo linaje celular.

A diferencia del trabajo de Anttonen y colaboradores (2003), en donde observan una mayor expresión de FOG2 tanto en las células de la granulosa como en células de la teca y una limitada expresión en los ovocitos de ovarios XX, en el presente estudio encontramos que tanto en hembras B6 como B6.Y<sup>flir</sup>, la mayor expresión de esta proteína se encuentra exclusivamente en el citoplasma del ovocito, y en menor proporción o nula en las células de la granulosa. Este patrón de expresión se detectó en todas las etapas de crecimiento de los folículos y en

todas las edades analizadas, la cual no es similar a la expresión de GATA4. Por otra parte, la expresión del ARNm de Fog2 en las hembras B6.Y<sup>flr</sup> disminuyó en las edades de 90 y 100 dpp, más por consecuencia de la pérdida de folículos, que por alguna alteración de los folículos propiamente.

Los datos obtenidos en el presente trabajo apoyan la hipótesis sobre la regulación de AMH por parte del factor de transcripción Gata4, pero no de la participación de FOG2 en la activación de AMH. Este hecho lo basamos en que no se observó presencia de la proteína en las células de la granulosa de los folículos, como en el caso de las proteínas GATA4 y AMH. Sin embargo, la presencia de FOG2 en el ovocito, y su ausencia en las células de la granulosa no descarta la posibilidad de que exista una interacción entre estos genes o propiamente sus proteínas, ya que se ha demostrado que existe una comunicación bidireccional muy estrecha entre el ovocito y las células de la granulosa. Esta comunicación permite una interacción muy activa, la cual se establece antes y en un período corto después del nacimiento, haciendo probable la existencia de una vía de interacción entre estos factores (Salustri *et al.*, 2004).

## 8. CONCLUSIONES

- I. Las hembras B6.Y<sup>tir</sup> presentan más de cinco ciclos estrales contrario a lo reportado; sin embargo, conforme avanza la edad la etapa de diestro se prolonga, sin perder la capacidad de mantener patrones cíclicos estrales.
- II. En los ovarios XY<sup>tir</sup> disminuye el número de folículos en todas las etapas de crecimiento conforme aumenta la edad. Esta disminución es mas evidente de los 80 a los 100 dpp al compararlos con ovarios XX de la cepa C57BL/6J(B6).
- III. A la edad de 100 dpp el número de folículos que permanece en los ovarios XY<sup>tir</sup> parece ser suficiente para sostener la continuidad del ciclo estral, aunque mas extenso.
- IV. La localización celular de las proteínas AMH, el factor de transcripción GATA4 y su cofactor FOG2, no esta alterada en los ovarios de las hembras B6.Y<sup>tir</sup>. Tanto en ovarios XX como XY<sup>tir</sup>, AMH se observó en el citoplasma de las células de la granulosa y en los ovocitos. GATA4 se localizó en el núcleo de células de la granulosa, y FOG2 en el citoplasma de los ovocitos.
- V. Los transcritos de los genes Amh, Gata4 y Fog2, se detectaron tanto en ovarios XX como XY<sup>tir</sup> en todas las edades analizadas. Los niveles disminuyen conforme aumenta la edad de los ovarios probablemente debido a la pérdida de folículos.
- VI. La disminución en el número de transcritos entre las edades de 80 a 100 dpp en ovarios XY<sup>tir</sup>, puede deberse mas a una pérdida precoz de folículos en todas las etapas de crecimiento, más que a una

**pérdida funcional de los genes Amh, Gata4 y Fog2. Por lo tanto, la disminución del número de transcritos observada para los genes Amh, Gata4 y Fog2 en ovarios XY<sup>tir</sup>, no explica la esterilidad de las hembras B6.Y<sup>tir</sup>.**

## 9. REFERENCIAS

Albrecht, K.M., Eicher, E.M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240: 92-107.

Amleh, A., Ledee, N., Saeed, J., Taketo, T. (1996). Competence of oocytes from the B6.YDOM sex-reversed female mouse for maturation, fertilization, and embryonic development in vitro. *Dev Biol* 178(2): 263-275.

Amleh, A., Smith, L., Chen, H.Y., Taketo, T. (2000). Both nuclear and cytoplasmic components are defective in oocytes of the B6.Y<sup>tir</sup> sex-reversed female mouse. *Dev Biol* 219: 277-286.

Anderson, R., Copeland, K.T., Schöler, H., Heasman, J., Wylie, C. (2000). The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev* 91: 61-68.

Anttonen, M., Ketola, I., Parviainen, H., Pusa, A.K., Heikinheimo, M. (2003). FOG-2 and GATA-4 Are Coexpressed in the Mouse Ovary and Can Modulate Müllerian-Inhibiting Substance Expression. *Biol Reprod* 68: 1333-1340.

Baarends, W.M., van Helmond, M.J., Post, M., van der Schoot, P.J., Hoogerbrugge, J.W., de Winter, J.P., Uilenbroek, J.T., Karels, B., Wilming, L.C., Meijers, J.H., Themmen, A.P., Grootegoed, J.A. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Development* 120:189-197.

Baarends, W.M., Uilenbroek, J.T., Kramer, P., Hoogerbrugge, J.W., van Leeuwen, E.C., Themmen, A.P., Grootegoed, J.A. (1995a). Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology* 136: 4951-4962.

Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Post, M., Visser, J.A., De Rooij, D.G., Parvinen, M., Themmen, A.P.N., Grootegoed, J.A. (1995b). Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression during postnatal testis development and in the adult testis of the rat. *Endocrinology* 136: 5614-5622.

Baker, T.G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 158: 417-433.

Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klattig, J., Kilt, R., Taketo, M., Englert, C. (2006). Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 74(1): 497-501.

Beaumont, H.M., Mandl, A.M. (1962). A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 155: 557-579.

Bedell, M.A., Brannan, C.I., Evans, E.P., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Donovan, P.J. (1995). DNA rearrangements located over 100 kb 5' of the Steel (Sl)-coding region in Steel-panda and Steel-contrasted mice deregulated Sl expression and cause female sterility by disruption ovarian follicle development. *Genes Dev.* 9: 455-470.

Bergmann, C., Senderek, J., Anhof, D., Thiel, C.T., Ekici, A.B. (2006). Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. *Am J Hum Genet* 79: 1105-1109

Bernard, P., Harley, V.R. (2007). Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 31-43.

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

Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., Schoenle, E. (2001). A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46 XX woman. *N Engl J Med* 351(8): 792-798.

Blaydon, D.C., Ishii, Y., O'Toole, E.A., Unsworth, H.C., The, M.T. (2006). The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nat Genet* 38: 1245-1247.

Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.,J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P. (2006). Retinoic Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* 312: 596-600.

Brennan, J., Karl, J., Capel, B. (2002). Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol* 244(2): 418-428.

Burgoyne, P.S. Baker, T.G. (1981). Oocytes depletion in XO mice and their XX sibs from 12 to 200 days post partum. *J Reprod Fertil* 61: 207-212.

Burgoyne, P.S., Baker, T.G. (1985). Perinatal oocyte loss in XO mice and its implications for the aetiology of gonadal dysgenesis in XO women. *J Reprod Fertil* 75: 633-645.

Byskov, A.G. (1978). The anatomy and ultrastructure of the rete system in the fetal mouse ovary. *Biol Reprod* 19: 720-735.

Carlsson, P., Mahlapuu, M., (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* 250: 1-23.

Carreau, S., Foucault, P., Drosdoesky, M.A. (1994). La cellule de Sertoli: aspects fonctionnels compares chez le rat, le porc et l'homme. *Ann Endocrinol* 55: 203-220.

Cate, R.L., Donahoe, P.K., MacLaughlin. (1990). Müllerian inhibiting substance. *Handbook Exp Pharmacol* 95: 179-210.

Cate, R.L., Wilson, C.A. (1993). Müllerian inhibiting substance. In "Genes in mammalian reproduction". (R.Gwatkin, Ed.), Wiley-Liss, New York, pp. 185-205

- Chiquoine, A. (1954). The identification, origin and migration of the primordial germ cells of the mouse embryo. *Anat Rec* 118: 135-146.
- Chomezynski, P., Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraccion. *Annal Bioche* 162: 156-159.
- Clark, J.M., Eddy, E.M. (1975). Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol* 47: 136-155.
- Columbre, J. L., Russell, E.S. (1954). Analysis of the pleiotrophism of the W-locus in the mouse: The effects of W and W<sup>v</sup> substitution upon postnatal development of germ cells. *J Exp Zool* 126: 277-296.
- Coop, A.J., Roberts, H.M., Polani, P.E. (1986). Chimaerism of primordial germ cells in the early post-implantation mouse embryo following microsurgical grafting of posterior primitive streak cells in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 95: 95-115.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L., Zelante, L., Nagaraja, R., Porcu, S. (2001).The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27: 159-166.
- De Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., Berta, P. (2000). Expression and Subcellular Localization of SF1, SOX9, WT1, and AMH Proteins During Early Human Testicular Development. *Dev Dyn* 217: 293-298.
- di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N., Cate, R. (1994). Cloning, expression and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol* 8:1006-1020.
- Donahoe, P.K., Budzik, G.P., Trelstad, R., Mudgett-Hunter, M., Fuller, A., Jr. Hudson, J.M., Ikawa, H., Hayashi, A., MacLaughlin, D. (1982). Müllerian inhibiting substance: A update. *Rec Prog Horm Res* 38: 279-330.
- Donahoe, P.K., Cate, R.L., MacLaughlin, D.T., Epstein, J., Fuller, A.F., Takahashi, M., Coughlin, J.P., Ninfa, E.G., Taylor, L.A. (1987). Müllerian inhibiting substance: Gene structure and mechanism of action of a fetal regressor. *Rec Prog Horm Res* 43: 431-462.
- Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T.R., Lu, N. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383: 531-535.
- Driancourt, M.A. Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J. (2000). Roles of KIT and KIT ligand in ovarian function. *Rev Reprod* 5(3): 143-152.
- Dube, J.L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K.M., Celeste, A.J., Matzuk, M.M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12: 1809-1817.

Durlinger, A.L.L., Kramer, P., Karels, B., De Jong, F.H., Uilenbroek, J.T.J., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P.N. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 140: 5789-5796.

Durlinger, A. (2000). Ovarian follicle growth and development: role of anti-Müllerian hormone. Tesis Professional, Faculty of Medicine and Health Science, Erasmus University Rotterdam, Rotterdam.

Durlinger, A.L.L., Gruijters, M.J.G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.T.J., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P.N. (2002a). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143: 1076-1084.

Durlinger, A.L.L., Visser, J.A., Themmen, A.P.N. (2002b). Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction* 124: 601-609.

Durlinger, A.L.L., Gruijters, M.J.G., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., Uilenbroek, J.J., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P.N. (2005). Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary. *Endocrinology* 143: 1076-1084.

Eicher, E.M., Washburn, L.L., Whitney, J.B., Morrow, K. E. (1982). *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 217: 535-537.

Epifano, O., Dean, J. (2002). Genetic control of early folliculogenesis in mice. *TRENDS Endocrinol Metab* 13(4): 169-173.

Frojdman, K., Paranko, J., Virtanen, I., Pelliniemi, L.J. (1992). Intermediate filaments and epithelial differentiation of male rat embryonic gonad. *Differentiation* 50: 113-123.

Gilbert, S.F. (2005). *Biología del desarrollo*. 7ª edición. (Ed.) Médica panamericana. México, pp. 655-691.

Ginsburg, M., Snow, M., McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse during gastrulation. *Developmental* 110: 521-528.

Godin, I., Wylie, C., Heasman, J. (1990). Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108: 357-363.

Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Rev.* 17: 121-155.

Gougeon, A. (2004). Dynamic of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects In: Leung, P.C. y Adashi, E.Y. *The ovary*. Elsevier Academic Press 25-38.

Gruijters, M.J.G., Visser, J.A., Durlinger, A.L.L., Themmen, A.P.N. (2003). Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 211: 85-90.

Heikinheimo, M., Ermolaeva, M., Bielinska, M., Rahman, N.A., Narita, N., Huhtaniemi, T.I., Tapanainen, J.S., Wilson, D.B. (1997). Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138(8): 3505-3517.

Hirobe, S., He, W.W., Gustafson, M.L., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K. (1994). Müllerian inhibiting substance gene expression in the cycling rat ovary correlates with recruited or graafian follicle selection. *Biol Reprod* 50: 1238-1243.

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

Hirshfield, A.N. (1994). Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biol Reprod* 50: 421-428.

Huang, E.J., Monova, K., Packer, A.I., Sanchez, S., Bachvarova, R.F., Besmer, P., Liang, L., Soyak, S.M., Dean, J. (1993). The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 157: 100-109.

Jeays-Ward, K., Hoyle, C., Brennan, J., Dandonneau, M., Alldus, G., Capel, B. (2003). Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 130(16): 3663-3670.

Jordan, B.K., Mohammed, M., Ching, S. T., Delot, E., Chen, X.N., Dewing, P. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 68(5): 1102-1109.

Jordan, B.K., Shen, J.H., Olaso, R., Ingraham, H.A., Vilain, E. (2003). Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(19): 10866-10871.

Josso, W., Picard, J.Y., Tran, D. (1977). The antimüllerian hormone. *Recent Prog Horm Res* 33: 117-163.

Josso, N., Cate, R.L., Picard, J.Y., Vigier, B., di Clemente, N., Wilson, C., Imbeaud, S., Pepinsky, R.B., Guerrier, D., Boussin, L., Legeai, L., Carre-Eusebe, D. (1993). Anti-müllerian hormone: the Jost factor. *Rec Progr Horm Res* 48: 1-59.

Joss, N., Picard, J.Y. (1986). Anti-Müllerian hormone. *Physiol Rev* 66:1038-1090.

Jost, A. (1953). Problems of fetal endocrinology: the gonadal and hypophyseal hormones. *Recent. Prog. Horm. Res.* 8: 379-418.

Jost, A. (1947). Recherches sur la differentiation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 36:271-315.

Kenneth, P.M. (1978). Follicular fluid. In: *The vertebrate Ovary*. Eds. Richard E. Jones Plenum. New York y London pp. 215-251.

Ketola, I., Rahman, N., Toppari, J., Bielinska, M., Porter-Tinge, S.B., Tapanainen, J.S., Huhtaniemi, I.T., Wilson, D.B. y Heikinheimo, M. (1999). Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 140: 1470-1480.

Kispert, A., Vainio, S., McMahon, A.P. (1998). Wnt-4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 125(21): 4225-4234.

Kol, S., Adashi, E.Y. (1995). Intraovarian factors regulating ovarian function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 7: 209-913.

Konishi, I., Fugii, S., Okamura, H., Parmley, T. Mori, T. (1986). Development of interstitial cells and ovigerous cords in the human fetal ovary: an ultrastructural study. *J Anat* 148: 121-135.

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. Y., Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.

Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS* 103 (8): 2474-2479.

Laitinen, M.P, Anttonen, M., Ketola, I., Wilson, D.B., Ritvos, O., Butzow, R., Heikinheimo, M. (2000). Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3476-3483.

Lawson, K.A., Duna, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V., Korving, J.P., Hogan, B.L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the Mouse embryo. *Genes Dev.* 13: 424-236.

Lawson, K.A., Hage, W.J. (1994a). Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found, Symp.* 182: 68-84.

Lawson, K.A., Hage, W.J. (1994b). Germline development. In Goode, J. (Ed.). *CIBA Foundation Symposium*, vol. 182, Wiley, Chichester, pp. 68-91.

Lee, C.H., Taketo, T. (1994). Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6.Y<sup>DOM</sup> sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 164: 442-452.

Lee, C.H., Taketo, T. (2001). Low levels of sry transcripts cannot be the sole cause of B6.Y<sup>tir</sup> sex reversal. *Genesis* 30: 7-11.

Lee, M.M., Donahoe, P.K. (1993). Müllerian-inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev* 14: 152-164.

Liang, L.F., et al. (1997). Fig $\alpha$ , a germ cell-specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 124: 4939-4949.

Loffler, K.L., Koopman, P. (2002). Charting the course of ovarian development in vertebrates. *Int J Dev Biol* 46: 503-510.

Loffler, K.A., Zarkower, D., Koopman, P. (2003). Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: FOXL2 is a conserved, early, acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology* 144: 3237-3243.

Lu, J.R., McKinsey, T.A., Xu, H., Wang, D.Z., Richardson, J.A., Olson, E.N. (1999). FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 19: 4495-4502.

Lyon, M.F., Hawker, S.G. (1973). Reproductive lifespan in irradiated and unirradiated chromosomally XO mice. *Genet Res* 21: 185-194.

Marmolejo, A., Nishioka, Y., Moreno, N., Merchant, H. (1999). Fertility of Y<sup>Tir</sup>, B6 sex reversal females with XX orthotopic ovarian transplants. *Biol Reprod* 61: 1426-1430.

Marshall, O.J., Harley, V.R. (2000). Molecular mechanism SOX9 action. *Mol Genet Metab* 71(3): 455-462.

Martineau, J., Nordqvist, K., Tilmann, C., Novell-Badge, R., Capel, B. (1997). Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 7(12): 958-968.

McClellan, K.A., Gosden, R., Taketo, T. (2003). Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol* 258: 334-348.

McGee, E.A., Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine* 21: 200-214.

McGrath, S.A. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9: 131-136.

Merchant, L.H., Centeno, B. (1981). Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W mouse. *Eleventh International Congress of Anatomy: advances in the Morphology of Cells and Tissue*, pp. 383-392.

Merchant, L.H. (1984). Germ and somatic cells interactions during gonadal morphogenesis. In: *Ultrastructure of Reproduction*. Blerkmon J. and Motta, P.M. (eds.). Maotinus Nijhoff Publisher. Boston 19-30.

Merchant, L.H., Chimal, M.J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. In: *Developments in Ultrastructure of Reproduction*. 55-63. (Motta, P. Ed.) Alan R. Liss, Inc. New York.

Merchant, L.H., Taketo, T. (1991). Testicular differentiation under normal and abnormal experimental conditions. *J Electron Microsc Tech* 19: 158-171.

- Merchant, L.H., Clarke, H.J., Taketo, T. (1994). Developmental arrest of fertilized eggs from the B6.Ydom sex-reversed female mouse. *Dev Genet* 15(5): 435-442.
- Merchant, L.H., Moreno, M.N. (1996). Embryology of Mouse Gonadal Development. In: *Mouse Gonadal Development. Frontiers in Endocrinology* 20: 22-32.
- Molyneaux, K., Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* 48: 537-544.
- Morales, E. (2004). Apoptosis y diferenciación celular durante el desarrollo del ovario del ratón B6.Y<sup>tir</sup> con reversión sexual. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Moreno, M.N., Harley, V., Merchant, L.H. (2003). Cell aggregation precedes the onset of Sox9 expressing preSertoli cells in the genital ridge of mouse. *Cytogenet Genome Res* 101: 219-223.
- Moreno, M.N., Torres, M.L., Chimal, M.J., Harley, V., Merchant, L.H. (2004). Disturbed expression of Sox9 in pre-Sertoli cells underlies sex reversal in mice B6.Y<sup>tir</sup>. *Biol Reprod* 70: 114-122.
- Münsterberg, A., Lovell-Badge, R. (1991) Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.
- Myers, M., Britt, K.L., Wreford, N.G.M., Ebling, F.J.P., Kerr, J.B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 127: 569-580.
- Nagamine, C.M., Taketo, T., Koo, G.C. (1987). Morphological development of the mouse gonad in tda-1 XY sex reversal. *Differentiation* 33: 214-222.
- Nagamine, C.M., Morohashi, K., Carlisle, C., Chang, D.K. (1999). Sex reversal caused by *Mus musculus domesticus* Y chromosome linked to variant expression of the testis-determining gene *Sry*. *Dev Biol*. 216: 182-194.
- Norris, A. (1997). *Vertebrate Endocrinology*. 3a edición. (Ed) Academic Press. USA, pp. 358-406.
- Odor, L., Blandau, R.J. (1969) a. Ultrastructural studies of fetal and early postnatal mouse ovaries. 1. Histogenesis and organogenesis. *Am J Anat* 124: 163-186.
- Odor, L., Blandau, R.J. (1969) b. Ultrastructural studies of fetal and early postnatal mouse ovaries. II. Cytodifferentiation. *Am J Anat* 125: 177-216.
- Ottolenghi, C., Omari, S., García, J.E., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G., Schlessinger, D. (2005). *Foxl2* is required for commitment to ovary differentiation. *Hum Mol Genet* 14: 2053-2062.
- Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., Cao, A., Forabosco, A., Schlessinger, D. (2007). Loss of *Wnt4* and *Foxl2* leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet* 16: 2795-2804.

Parker, K.L., Schedl, A., Schimmer, B.P. (1999). Gene interactions in gonadal development. *Annu Rev Physiol* 61: 417-433.

Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentín, S., Guerra, L., Schedl, A., Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38(11): 1304-1309.

Parrott, J.A., Skinner, M.K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 140: 4262-4271.

Pepling, M.E., Spradling, A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125: 3323-3328.

Pepling, M.E., Spradling, A.C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol* 234: 339-351.

Picton, H.M. (2001). Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* 55: 1193-1210.

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F., Douglas, S., Field, S. Bell, S., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A., Robinson, P., Inglehearn, C., Isaacs, J., Markham, A. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplification and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3: 18.

Pru, J.K., Tilly, J.L. (2001). Programmed cell death in the ovary: insights and future prospect using genetic technologies. *Mol Endocrinol* 15: 845-853.

Rajah, R., Glaser, E.M., Hirshfield, A.N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn* 194: 177-192.

Rossi, P., Dolci, S., Albanesi, C., Grimardi, P., Geremia, R. (1993). Direct evidence that the mouse sex determining gene Sry is expressed in the somatic cells of male fetal gonads and in the germ cell line in the adult testis. *Mol Reprod Dev* 34: 369-373.

Russo, J., De Rosas, J.C. (1971). Differentiation of Leydig cells of the mouse testis during the fetal period. An ultrastructural study. *Am.J.Anat.* 130: 461-480.

Saitou, M., Barton, S.C., Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418: 293-300.

Salmon, N.A., Handyside, A.H., Joyce, I.M. (2004). Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol* 266: 201-208.

Salustri, A., Fulop, C., Camaioni, A., Hascall, V.C. (2004). Oocyte-Granulosa Cell Interactions In: Leung, P.C. y Adashi, E.Y. The ovary. Elsevier Academic Press 131-143.

Schlatt, S., Meinhardt, A., Nieschlag, E. (1997). Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* 137: 107-117.

Schmidt, D., Ovitt, C.E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A.C., Treier, M. (2004). The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131: 933-942.

Silva, F.R.M.B., Leite, L.D., Wassermann, G.F. (2002). Rapid signal transduction in Sertoli cells. *Eur J Endocrinol* 147: 425-433.

Skinner, M.K., Tung, P.S., Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol* 100: 1941-1947.

Snow, M.H. (1981). Autonomous development of parts isolated from primitive-streak-stage Mouse embryos. Is development clonal?. *J Embryol Exp Morphol* 65: 269-287.

Soyal, M.S., Amleh, A., Dean, J. (2000). FIG $\alpha$ , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 127: 4645-4654.

Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A.P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372(6507): 679-683.

Taketo, H.T., Saeed, J., Manganaro, T., Takahashi, M., Donahoe, P.K., (1993). Müllerian inhibiting substance production associated with loss of oocytes and testicular differentiation in the transplanted mouse XX gonadal primordium. *Biol Reprod* 49(1): 13-23.

Taketo, H.T., Nishioka, Y., Nagamine, C., Villalpando, I., Merchant, L.H. (1989). Development and fertility of ovaries in the B6.Y<sup>DOM</sup> sex-reversed female mouse. *Development* 107: 95-105.

Tam, P., Snow, M. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in Mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 64: 133-147.

Treier, M., Gleiberman, A.S., O'Connell, S.M., Szeto, D.P., McMahon, J.A., McMahon, A.P., Rosenfeld, M.G. (1998). Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* 12: 1691-1704.

Tripiciano, A., Filippini, A., Ballarini, F., Palombi, F. (1998). Contractile response of peritubular myoid cells to prostaglandin F2 $\alpha$ . *Mol Cell Endocrinol* 138: 143-150.

Ueno, S., Kuroda, T., MacLaughlin, D.T., Ragin, R.C. Manganaro, T.F., Donahoe, P.K., (1989). Mullerian inhibiting substance in the adult rata ovary during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 125: 1060-1066.

Uhlenhaut, N.H., Treier, M. (2006). Foxl2 function in ovarian development. *Mol Genet Metab* 88: 225-234.

Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397(6718): 405-409.

Vanderhyden, B.C., Macdonald, E.A., Merchant, L.H., Fernandez, A., Amleh, A., Nasser, R., Taketo, T. (1997). Interactions between the oocyte and cumulus cells in the ovary of the B6.Y(TIR) sex-reversed female mouse. *Biol Reprod* 57(3): 641-646.

Villalpando, I., Nishioka, Y., Taketo, T. (1993). Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *J Steroid Biochem Mol Biol* 45(4): 265-273.

Vilain, E., McCabe, R.B. (1998). Mammalian Sex Determination: From Gonads to brain. *Mol Genet Metab* 65: 74-84.

Viger, R.S., Mertineit, C., Trasler, K.M., Temer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development* 125: 2665-2675.

Visser, J.A., McLuskey, A., Verhoef-Post, M., Kramer, P., Grootegoed, J.A., Themmen, A.P.N. (1998). Effects of prenatal exposure to diethylstilbestrol on Müllerian duct development in fetal male mice. *Endocrinology*. 139: 4244-4251.

Visser, J.A., Themmen, A.P.N. (2005). Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 234: 81-86.

Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M.J., Combes, A.N., Beverdam, A .N, Bowles, J., Mizusaki, H., Koopman, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* 287: 111-124.

Wilhelm, D., Palmer, S., Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev*. 87: 1-28.

Yang, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F.J., Elvin, J.A., Carino, C., Prasad, S.V., Skinner, S.S., Dunbar, B.S., Dube, J.L., Celeste, A.J., Matzuk, M.M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 15: 854-866.

Yao, H.H., Aardema, J., Holthusen, K. (2006). Sexually dimorphic regulation of inhibin beta B in establishing gonadal vasculature in mice. *Biol Reprod* 74(5): 978-983.

Yao, H.H., Matzuk, M.M., Jorgez, C. J., Menke, D.B., Page, D.C., Swain, A. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230(2): 210-215.