



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**INTERACCIONES CELULARES INVOLUCRADAS EN
LA DETERMINACION Y DIFERENCIACION
GONADAL DEL CONEJO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

P R E S E N T A

BIOL. VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

MÉXICO D.F.

2009



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 A INSTITUCIONES Y AL COMITÉ TUTORAL

Agradezco al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por su apoyo y facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su apoyo y facilidades para la elaboración de este proyecto.

Al apoyo financiero de DGAPA-PAPIIT al proyecto “Determinación sexual de la línea germinal en los mamíferos” (IN212507).

A la supervisión de los miembros del Comité Tutorial: Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Alfonso León del Río y la Dra. Diana María Escalante Alcalante.

APOYOS ECONOMICOS

Este proyecto de doctorado, fue realizado por el apoyo financiero otorgado por la DGAPA-PAPIIT al proyecto “Determinación sexual de la línea germinal en los mamíferos” con número de registro (IN212507). Del laboratorio del Dr. Horacio Merchant Larios en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los estudios de doctorado fueron realizados gracias a la beca para estudiantes de doctorado otorgada por CONACYT (número de becario 186551) y la beca complementaria para estudios de doctorado otorgada por la DGEP-UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios su invaluable enseñanza, instrucción y apoyo durante mi desarrollo académico en su laboratorio.

Agradezco al Dr. Alfonso León del Río por su asesoría durante el proceso de formación de mi doctorado y desarrollo del proyecto.

A los sinodales y revisores de tesis: Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dr. Jesús Chimal Monroy, Dr. Horacio Merchant Larios, Dr. Miguel Betancourt Rule, y la Dra. Gabriela Morali de la Brena.

Agradezco de manera especial la ayuda y asesoría otorgada por la M.C. Claudia Garay Canales del Departamento de Inmunología del IIB-UNAM. A quien debo la generación y purificación del anticuerpo policlonal Sox9. El cual ha sido una herramienta fundamental para el desarrollo de experimentos en el laboratorio donde realicé mi proyecto de Doctorado. Por lo que su ayuda y asesoría va más allá de este proyecto.

Al Técnico de laboratorio José Guadalupe Baltazar García por el procesamiento de muestras en epón y la obtención de cortes finos y semifinos utilizados en mi proyecto de Doctorado

Agradezco el apoyo técnico del M.C. Alejandro Marmolejo Valencia en el manejo de animales y preparación de material utilizado durante la realización de este proyecto.

A la M.C. Patricia de la Torre por su asesoría y apoyo en la realización de las secuenciaciones de material genético.

Al M.C. Rafael Cervantes por su asesoría técnica en Biología Molecular.

A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera responsable del Bioterio del IIB, por su invaluable apoyo e instrucción sobre el manejo de animales de laboratorio. Los cuales fueron necesarios para la realización de este proyecto de Doctorado.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por permitirme el acceso a material y equipo de su laboratorio. Extiendo este agradecimiento a los miembros que son o formaron parte de su laboratorio: LIBB Eduardo Martínez, Dra. Julieta Mendoza, LIBB Miguel Tapia y LIIB Brenda Toscano.

A la Técnico Académico Carolina Rojas por su apoyo e instrucción en el manejo de conejos los cuales fueron aportados por el laboratorio de la Dra. Robin Hudson del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A la Dra. Robin Hudson por haber otorgado conejos hembra para iniciar el estudio del desarrollo gonadal del conejo.

A la M.C. Magdalena Zamora de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por apoyarnos con la venta de conejos chinchilla utilizados en gran parte de este proyecto Doctoral

A la Dra. Norma Bobadilla, la Dra. Victoria Ramírez y la M.C. Joyce Trujillo del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por permitirme realizar los experimentos de PCR en Tiempo Real en su laboratorio.

DEDICATORIAS

A mi Familia, por su invaluable amor y ayuda:

A mi padre el Sr. Miguel Díaz Aguilar y mi madre Silvia Hernández.

A mis hermanos: Miguel, Betty, Blanca, Silvia, Judit, Mariana y Silvestre

A mis sobrinos: Miguel, Juan Carlos, Luis Ángel, Juan Manuel, Montse y Fernanda.

Para Hugo con un cariño muy especial ya que siempre serás de mi Familia.

ÍNDICE

	PÁGINA
ÍNDICE.....	4
AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES Y AL COMITÉ TUTORAL.....	6
APOYOS ECONÓMICOS.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	6
DEDICATORIAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
Establecimiento de la cresta gonadal.....	14
Genes implicados en el establecimiento de la gónada bipotencial.....	17
Los genes determinantes de testículo SRY y SOX9.....	18
Regulación epigenética de la expresión del <i>Sry</i>	20
Genes implicados en la determinación sexual gonadal en mamíferos.....	21
A) Expresión de WT-1.....	22
B) Expresión de SF1.....	23
C) Expresión de Wnt4.....	27
D) Expresión de la familia de receptores a insulina tirosina-cinasa.....	28
E) Expresión de Gata-4 y Fog2.....	28
Reguladores del mantenimiento de la expresión de <i>Sox9</i> en el testículo.....	29
A) Factor de crecimiento fibroblástico 9 (Fgf9).....	29
B) Prostaglandina D2 (Pgd2).....	31
C) Desert Hedgehog (Dhh).....	31
D) Hormona anti-mulleriana (AMH por sus siglas en inglés).....	32
Genes involucrados en el mantenimiento de la diferenciación ovárica.....	32
A) Wnt4 y Foxl2.....	32
B) Folistatina (Fst).....	33
C) Dax-1 [dosage-sensitive sex reverssal (DSS)-adrenal hipoplasiacongenital critical (AHC) region on the chromosome X, gene 1 (NR0B1)].....	33
D) R-spondin 1.....	33
Integración preliminar de las vías de expresión, involucradas en la determinación sexual.....	34

Diferenciación sexual de las células germinales: arresto mitótico o inicio de meiosis.....	40
El ácido retinoico y el inicio de la meiosis.....	41
El arresto mitótico de las células germinales en el testículo fetal.....	44
Las células germinales del testículo fetal también inician la meiosis.....	44
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	46
HIPOTESIS.....	47
OBJETIVO GENERAL.....	47
OBJETIVOS PARTICULARES.....	47
MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
Animales.....	48
Sexado de los embriones.....	48
Microscopía de luz y electrónica.....	48
Extracción de RNA y transcriptasa reversa.....	49
PCR en tiempo real.....	49
Hibridación <i>in situ</i> en montaje completo (mCHIS) y en cortes por congelación (cgHIS).....	50
Administración intraperitoneal de BrdU.....	51
Procesamiento de muestras para congelación.....	52
Inmunofluorescencia SOX9, AMH y BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridine).....	52
Reacción de fosfatasa alcalina para detección de células germinales.....	52
RESULTADOS.....	54
Sexado de los embriones.....	54
El desarrollo gonadal como proceso estructural.....	55
Niveles de expresión de SRY y SOX9 en gónadas de conejo por PCR en tiempo real.....	61
Localización de SRY y SOX9 dentro de los cordones seminíferos (Hibridación <i>in situ</i>).....	63
Inmunolocalización de SOX9 y AMH en los cordones seminíferos.....	74
El ciclo celular de las células germinales XX y XY.....	76
Expresión del Aldh1a2 y Cyp26b1 en gónadas de conejo posnatal.....	79
DISCUSIÓN.....	83
CONCLUSIONES.....	93
REFERENCIAS.....	94

APÉNDICES.....105
Apéndice 1.....105
Apéndice 2.....107

INTRODUCCIÓN

La determinación sexual involucra procesos moleculares que establecen vías alternas de expresión de genes previos a la diferenciación sexual morfológica de la gónada embrionaria. Si bien, en mamíferos placentados el sexo se establece al fusionarse los pronucleos del espermatozoide (X ó Y) y el ovocito (X) formando el núcleo del cigoto, la “determinación sexual gonadal” representa el establecimiento y estabilización de vías dimórficas de expresión génica conducentes a la diferenciación de ovarios o testículos. La tercera etapa de la determinación sexual es la que Alfred Jost denominó “determinación sexual somática” (Jost, 1971) y se refiere a la diferenciación sexual de los conductos de Wolff, Müller y seno urogenital, precursores embrionarios de los órganos genitales internos y externos respectivamente. El proceso de desarrollo conducente al dimorfismo sexual del individuo continúa después del nacimiento cuando entran en juego los mecanismos neuroendócrinos responsables de las características sexuales secundarias. Por último, el establecimiento de un patrón de comportamiento sexual dimórfico encaminado a facilitar en última instancia la unión del espermatozoide con el ovocito, completan el ciclo de reproducción sexual.

Los experimentos clásicos de Alfred Jost (1947) demostraron que al castrar fetos de conejo en etapas previas a la diferenciación sexual somática, los conductos y el seno urogenital siguen la vía feminizante de manera independiente a su sexo genético. Jost descubrió que los testículos fetales producen dos factores necesarios para la diferenciación somática del macho, la testosterona (T) y la hormona antimülleriana (AMH). En su ausencia, los conductos de Müller formarán oviductos, útero, el tercio superior de la vagina y el seno urogenital formará clítoris y vulva en el feto macho castrado. Si por el contrario, se implantan testículos a una hembra castrada, los conductos de Müller involucionan y los conductos de Wolff formarán epidídimo y conductos deferentes y el seno urogenital dará origen al glande, pene y bolsas escrotales.

De manera que el establecimiento del sexo somático depende de la determinación y diferenciación de los testículos fetales.

En el ratón, el establecimiento de la cresta gonadal ocurre entre los 10 y 12 días post coito (dpc) y el período que corresponde a los 10.5-11.5dpc se considera crítico para la determinación sexual a nivel molecular. A los 12.5dpc se inicia la diferenciación sexual morfológica en los machos genéticos (XY), caracterizada por el inicio de la formación de los cordones seminíferos. En las hembras, los ovarios no muestran diferencias morfológicas a los 12.5dpc con respecto a la gónada indiferenciada, sólo se observa crecimiento gonadal debido a la proliferación de las células germinales y somáticas. Es decir, en alrededor de 48 horas se establecen un par de vías de expresión genética en la gónada morfológicamente indiferenciada que conducen a la diferenciación de un testículo o de un ovario en los embriones con genotipo XY o XX respectivamente.

Establecimiento de la cresta gonadal

La gónada del ratón se origina a partir de la cresta genital, ubicada en la región ventral del mesonefros. Aquí, entre los 9.5 y 10.5 dpc, la proliferación de células del epitelio celómico coincide con la llegada de las primeras células germinales primordiales (CGPs), cuya presencia demarca la extensión donde se establecerá la cresta genital. A los 11.5 dpc, la cresta genital sobresale hacia la cavidad celómica como una formación alargada de color y textura diferente del mesonefros adyacente. Hasta este estadio del desarrollo, la composición histológica de la gónada es similar en ambos sexos. Dos incipientes compartimentos tisulares: el epitelial y el estromático, forman el sustrato histológico de la gónada indiferenciada. El compartimento epitelial se forma esencialmente por la proliferación de las células del epitelio celómico. Asociadas entre sí y con las CGPs, las células epiteliales gradualmente inician el depósito de una lámina basal que llevará a la demarcación del compartimento epitelial de

la gónada. En los machos, las células epiteliales son precursoras de las células de Sertoli, en tanto que en las hembras son precursoras de las células foliculares. Las CGPs incluidas en este compartimento, darán origen a las espermatogonias o a los ovocitos en los embriones XY o XX, respectivamente. Por otra parte, el compartimento estromático lo forman vasos sanguíneos, células mesenquimáticas, fibroblastos y una matriz extracelular que incluye fibras de colágena y fibronectina. Inicialmente (9.5-10.5 dpc), en el ratón, el compartimento estromático se distribuye a lo largo de la cresta genital entre el mesonefros y el engrosamiento del epitelio celómico. Para el día 11.5 pc, los vasos sanguíneos penetran y se distribuyen entre las células epiteliales, de manera que simultáneamente al depósito de una lámina basal, los vasos hacen evidente la presencia de un incipiente tejido epitelial. A partir de esta etapa, se inicia la transformación de la gónada indiferenciada que llevará al dimorfismo sexual de la misma, evidente a los 12.5 dpc (Figura 1).

Dos procesos morfogenéticos ocurren en los embriones XY que hacen evidente la formación de un testículo: la separación del compartimento epitelial del epitelio celómico y la penetración de abundante tejido estromático desde la región mesonéfrica. Ambos eventos resaltan la presencia de un transitorio retículo epitelial que dará origen a los cordones seminíferos precursores de los cordones testiculares.

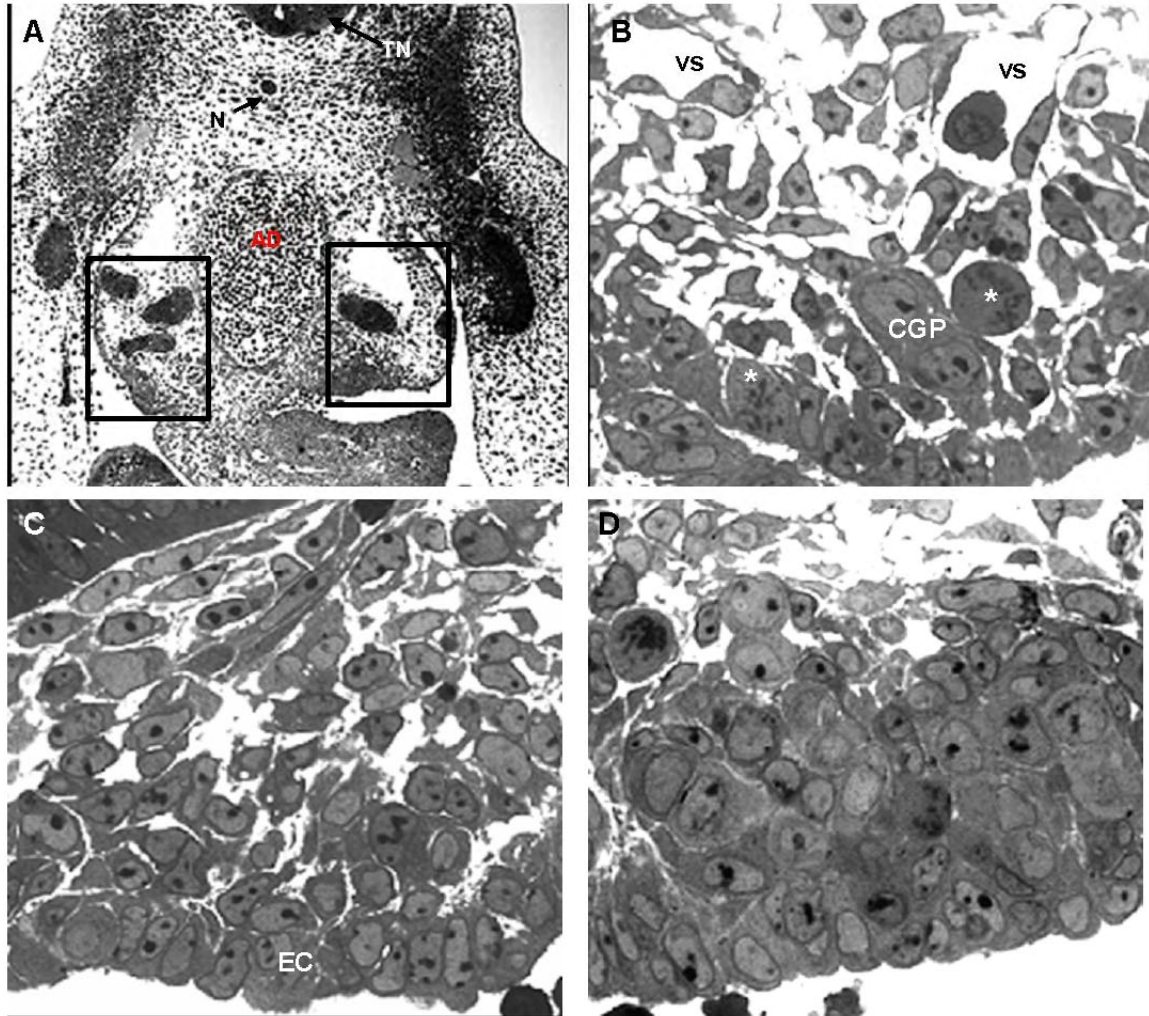


Figura 1. Corte transversal de la región media caudal de un embrión de ratón de 10.5dpc. En **A**, se muestran las crestas urogenitales (rectángulos) a cada lado de la aorta dorsal (AD). La notocorda (N) y parte del tubo neural son evidentes. **B** Región caudal de la cresta genital mostrando dos células germinales primordiales (CGP) recién llegando a la cresta genital donde todavía no hay condensación de células somáticas. Mitosis (*) y vasos sanguíneos (vs) están presentes. **C** Región anterior de la cresta genital mostrando el inicio de la condensación de células somáticas sobre el epitelio celómico (EC). **D** Se muestra la región intermedia de la cresta genital donde la formación del compartimento epitelial es evidente.

En el estroma aparecen las células precursoras de Leydig y posteriormente las células mioides que consolidarán la estructuración de los cordones seminíferos. En cuanto a los embriones XX del ratón, a los 12.5 dpc, ocurren pocos cambios respecto a la histología de la gónada indiferenciada. Sin

embargo, en contraste con los machos que entran en arresto mitótico, las CGPs inician la profase I de la meiosis a partir de los 13.5 dpc.

Genes implicados en el establecimiento de la gónada bipotencial

Diferentes genes se han involucrado con la formación de la gónada morfológicamente indiferenciada considerada bipotencial por su capacidad para transformarse en ovario o testículo. Entre ellos se encuentran *Wt1* y *Sf1*, que en un principio se postularon como genes clave para el establecimiento de la cresta gonadal. Sin embargo, estudios más detallados de ratones nulos permitieron determinar su papel como genes importantes para el mantenimiento de la cresta gonadal (Luo et al., 1994; Kreidberg et al., 1993 y Gao et al., 2006) y, como se verá más adelante, tanto *Wt1* como *Sf1* son genes clave en los procesos de determinación y diferenciación sexual de la gónada.

El gen *Lhx9* es miembro de la familia de genes homeobox Lim. El fenotipo del ratón *Lhx9*^{-/-} es similar al de los ratones *Wt1*^{-/-} y *Sf1*^{-/-} es decir, no se mantiene la cresta genital (Luo et al., 1994). Otro gen cuya expresión es previa a la determinación sexual gonadal es *Emx2*. Ratones con este gen nulificado también inician la formación de la cresta genital pero no logran mantenerla (Miyamoto et al., 1997). Los ratones XY *M33*^{-/-} desarrollan reversión sexual macho a hembra además de no mantener las crestas genitales (Katoh-Fukui et al., 1998). Recientemente el grupo de Peter Koopman ha estudiado la expresión del gen *Tmem 184a*, el cual codifica para una proteína cuya función pudiera ser de una cinasa durante la embriogénesis de la gónada del ratón (Svingen et al., 2007).

Estudios realizados con ayuda de microarreglos durante el periodo crítico de la determinación sexual del ratón, muestran que varias decenas de genes se expresan de manera dimórfica entre los dos sexos (Nef et al., 2005; Beverdam and Koopman, 2006). Sin embargo, el papel que juegan estos genes en la determinación sexual es todavía desconocido. Es así que las vías de expresión

génica hasta ahora propuestas para explicar la determinación sexual en ambos sexos, son, en el mejor de los escenarios incompletas.

Los genes determinantes de testículo: SRY y SOX9

El gen Sry (**S**ex determining **R**egion of the **Y** chromosome) se ubica en el brazo corto del cromosoma Y de los mamíferos. El producto del gen *SRY/Sry* se ha descrito como un factor de transcripción. La región codificante del gen *SRY* del humano corresponde a un solo exón que codifica para una proteína de 204 aminoácidos. La proteína SRY se encuentra caracterizada por tres regiones: la región central, único dominio que se encuentra ampliamente conservado entre las especies, corresponde a la caja HMG (High Mobility Group). Se han encontrado varias mutaciones en la caja HMG en mujeres XY que desarrollan disgenesia gonadal. El dominio N-terminal no posee una región conservada cuya función sea deducida, sin embargo, es susceptible de fosforilación, lo cual podría aumentar la afinidad de Sox9 a su ADN blanco. En cuanto a su estructura en el ratón posee una región rica en glutamina, la cual no se encuentra en SRY humano ni en la proteína de otras especies de mamífero (Harley et al., 1992) (Figura 2A).

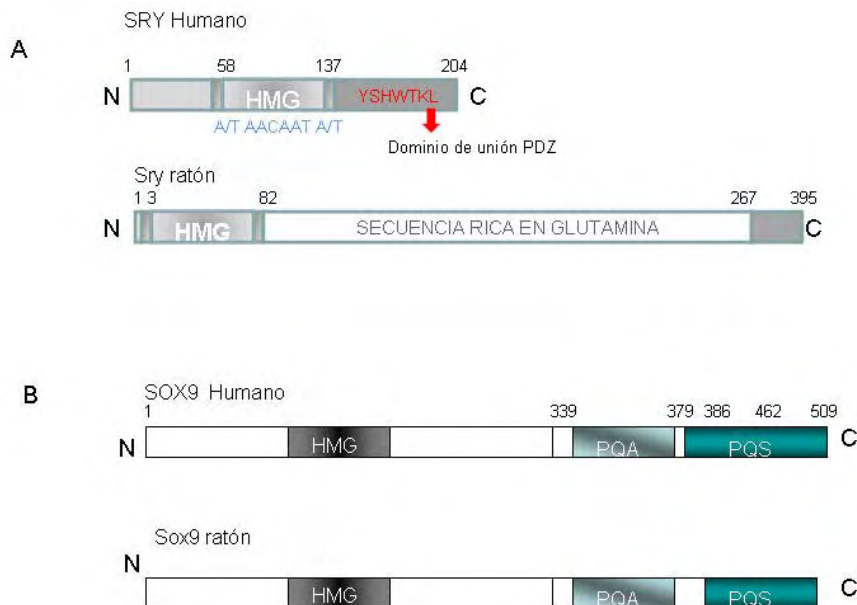


Figura 2. Comparación de las proteínas Sry y Sox9 humano y ratón. En **A** se muestran los dominios de las proteínas Sry de ratón y humano: caja HMG, los 7 aminoácidos conservados en el dominio C-terminal y la región rica en glutamina presente únicamente en la proteína Sry de ratón. En **B** se muestran los dominios conservados de las proteínas de Sox9 de humano y ratón (Modificada de Harley et al., 2003).

El gen *Sry* se expresa en el testículo durante el periodo crítico de la determinación sexual. En el modelo murino los transcritos de *Sry* se detectan a los 10.5dpc, observándose el pico de expresión a los 11.5dpc y la expresión es abatida a los 12.5dpc (Hacker et al., 1995). En ratones transgénicos, fragmentos de 14 Kbs de ADN genómico conteniendo la secuencia del *Sry*, fueron suficientes para dirigir la diferenciación testicular generando la reversión sexual en ratones XX (Koopman et al., 1991). Este experimento demostró de manera concluyente que el gen *Sry* correspondía al factor determinante de testículo (FDT) previamente postulado.

El *Sox9* (**Sry-like HMG box 9**) es un gen autosómico de la familia de *Sry*. La proteína SOX9 posee dos dominios de activación transcripcional ubicados, río abajo de la caja HMG. Uno de los dominios es rico en residuos prolina-glutamina-serina (dominio PQS). El cual es indispensable para la actividad transcripcional. El dominio adyacente rico en prolina-glutamina-alanina (dominio PQA) es necesario para mantener la actividad de transcripción al máximo, ya que mutaciones en este dominio disminuyen la capacidad de transactivación de *Sox9* (Harley et al., 2003). (Figura 2B). En embriones de ratón de 10.5 dpc, se detectan bajos niveles de *Sox9* a lo largo de la cresta urogenital en ambos sexos. Sin embargo, esta baja expresión es difusa a lo largo de las crestas urogenitales, ya que no se localiza de manera específica en las células de preSertoli del testículo o bien, en las células equivalentes en el ovario, las células de la granulosa. A los 11.5dpc el dimorfismo de expresión es evidente ya que se observa una fuerte expresión en la cresta urogenital del macho, la cual no es detectada en el ovario de la misma edad. A los 12.5 y 13.5 dpc la expresión de *Sox9* en el testículo se restringe a los cordones seminíferos (Kent et al., 1996; Morais da Silva et al., 1996; Wilhelm et al., 2005).

Por mucho tiempo se propuso a SRY como un regulador positivo de la expresión de Sox9 debido al patrón espacio temporal que presentan ambos genes. Las células preSertoli regulan positivamente la expresión de Sox9, cuatro horas después de haberse iniciado la expresión de Sry. (Kent et al., 1996; Bullejos and Koopman, 2001; Kidokoro et al., 2005 y Wilhelm et al., 2005). Sin embargo 18 años después de su descubrimiento no había sido posible demostrar de manera concluyente si SRY actúa como activador transcripcional, represor, o como cofactor para regular positivamente los niveles de Sox9. Sekido y Lovell-Badge (2008) recién encontraron un elemento que actúa como un “enhancer” involucrado en la regulación de la expresión de Sox9 en la gónada del ratón. Se trata de una secuencia de 1.4 Kb conservada en mamíferos placentados incluido el humano que denominaron “TESCO” (**testis-specific enhancer of Sox9 core**). Encontraron además, que SRY interactúa de manera sinérgica con SF1 activando TESCO y regulando positivamente la expresión de Sox9.

Regulación epigenética de la expresión del Sry

La metilación del ADN es sinónimo de silenciamiento transcripcional de un gen de forma permanente o reversible durante el desarrollo. El ADN es metilado al incorporarse un grupo metilo a la posición 5' de la citosina cuando se encuentra en un contexto dinucleótido CpG. Las regiones blanco de metilación son los promotores de los genes, los cuales al ser metilados mantendrán un contexto de cromatina compacta, lo cual le impide ser accesible a la maquinaria de transcripción. Se ha propuesto que la expresión del gen Sry en el ratón, puede ser mediada por hipometilación de la región reguladora en la etapa crítica de determinación sexual. Ensayos de bisulfito de sodio y secuenciación específica de regiones metiladas revelaron que la región reguladora que flanquea la región 5' del gen Sry se encuentra hipermetilada en los embriones de ratón de 8.5 dpc, lo cual corresponde a la ausencia de expresión de Sry. A los 11.5 dpc la región flanqueante 5' cambia su estado hipermetilado por un estado hipometilado, coincidiendo con el pico de expresión de Sry. Los tejidos que no

expresan *Sry* mantienen su estado hipermetilado de forma permanente a los 8.5 y 11.5dpc. (Nishino et al., 2004) (Figura 3). De esta manera, un proceso de regulación epigenética como es la metilación del ADN, podría estar controlando la ventana espacio-temporal de la expresión de *Sry* para iniciar la cascada génica de determinación sexual.

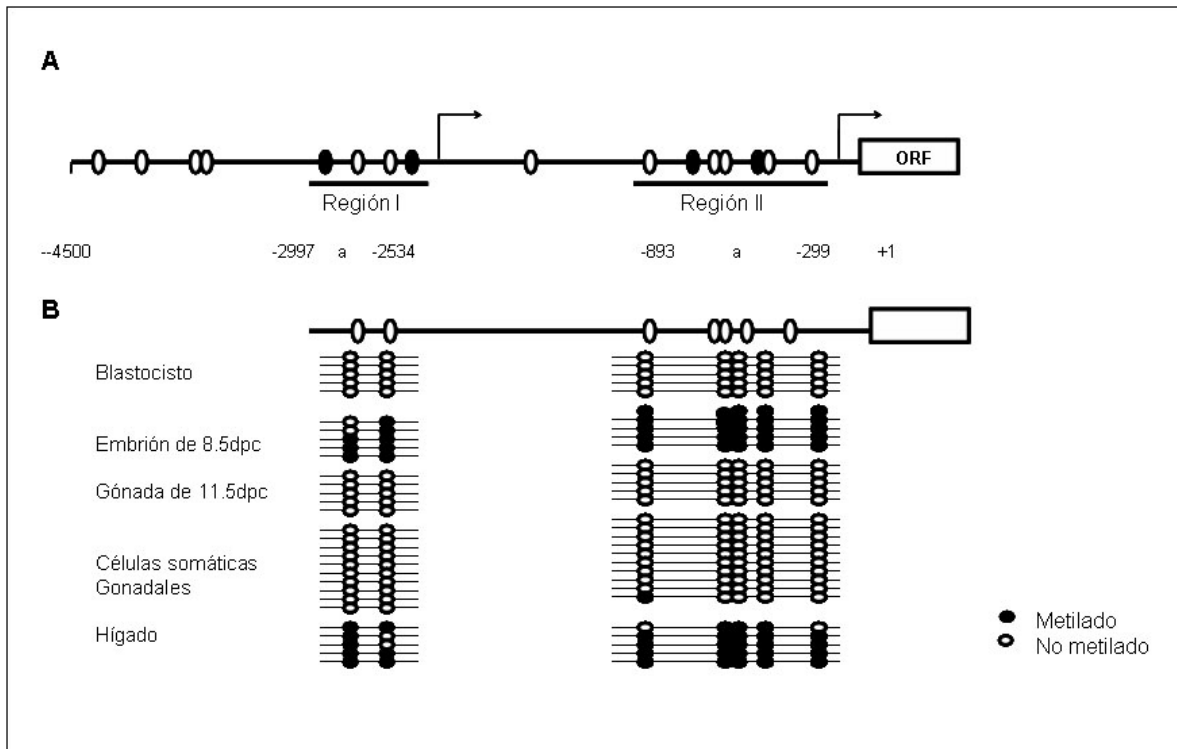


Figura 3. Esquema representativo de las regiones reguladoras del gen *Sry* de ratón susceptibles a metilación. **A** Se distinguen 2 regiones (Región I Región II) arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Sry*, los cuales son susceptibles de metilación. **B** Nivel de metilación de las regiones I y II determinado por la secuenciación del ADN después del tratamiento con bisulfito de sodio (Modificada de Nishino, et al., 2004).

Genes implicados en la determinación sexual gonadal

Varios de los genes que se revisan a continuación, fueron identificados mediante el análisis cromosómico de humanos con reversión sexual. Su identificación ha permitido desarrollar ratones “knockout” con los que se ha podido generar información para dilucidar el proceso de determinación sexual de los mamíferos en general.

Los genes cuya expresión precede (upstream) a la de Sry y Sox9 pueden actuar como sus factores reguladores. Mediante esta premisa, se han podido desarrollar diferentes estrategias, que en la actualidad nos permiten vincular la expresión de Sf1, Wt1, Wnt4, y los receptores tirosina cinasa, con la regulación positiva de Sry y Sox9 que conlleva a la diferenciación del testículo.

A) *Expresión de WT-1*

Las primeras evidencias de que este gen es importante en el desarrollo testicular, fueron en pacientes XY con reversión sexual o anomalías en el tracto genital, quienes presentan mutaciones heterocigotas de *WT1*. Pacientes con una misma mutación, presentan una variable expresión de *WT1*, sugiriendo que niveles normales de la proteína WT1 silvestre son requeridos para la determinación testicular. El ratón knockout de *WT1* ha sido muy difícil de estudiar. Esto se debe a que *WT1* es requerido para la sobrevivencia y proliferación de las células en la cresta genital. Los ratones *WT1*^{-/-} presentan agenesia gonadal severa, mientras que los ratones *WT1*^{+/-} no exhiben ninguna alteración testicular (Kreidberg et al., 1993).

Gao y colaboradores (2006) originaron una cepa de ratones Knockout alelo condicional de *WT1* que expresan una proteína *WT1* pequeña sin los dedos de zinc 2 y 3. Como resultado, los túbulos seminíferos no se desarrollan debido a la muerte progresiva de células de Sertoli y germinales. Los testículos de éstos no expresan *Sox9*, *Sox8* y *AMH*, lo cual sugiere que *WT1* regula la expresión de *Sox9* y *Sox8*.

En los mamíferos se observan 4 principales isoformas de *WT1*, las cuales dependen de la inserción del tripeptido KTS entre los dedos de zinc 3 y 4. La inserción se origina mediante corte y empalme de un segmento de 17 aminoácidos codificados por el exón 5. *WT1* (-KTS) es requerido para iniciar la expresión de *Sf1*, los testículos de los ratones nulos para *WT1* no expresan *Sf1*.

Ensayos in vitro han demostrado que WT1 (-KTS) es capaz de unirse y activar al promotor de *Sf1* (Wilhelm and Englert, 2002)

Se ha determinado que la isoforma que no posee el tripeptido KTS (*WT1-KTS*) es la única isoforma capaz de unirse y activar al promotor de *Sry* (Shimamura, et al., 1997, Hossain and Saunders, 2001) y reprimir los promotores de *AMH* y del Receptor de Andr6genos (RA). Se ha propuesto que la funci3n de *WT1* es dependiente del contexto celular. As3, durante la determinaci3n sexual *WT1* induce la diferenciaci3n testicular al activar la expresi3n de *Sry*; despu3s favorece la formaci3n del ovario a trav3s de la represi3n de la expresi3n de *AMH* y RA (Shimamura et al., 1997)

B) Expresi3n de SF1

SF1 es miembro de la superfamilia de receptores hu3rfanos NHR (se asigna este nombre porque no se conoce un ligando end3geno para dicho receptor) y actúa como un importante regulador neuroendocrino. *SF1* est3 involucrado en la regulaci3n de la v3a hipot3lamo-hip3fisis-g3nada y la corteza adrenal. El rat3n nulo para *Sf1* muestra agenesia adrenal y gonadal (Luo et al., 2004)

Para conocer el papel de *Sf1* se utiliz3 el sistema CreloxP para inactivar de manera selectiva la expresi3n de *Sf1* durante el desarrollo de la g3nada. Los test3culos nulos *Sf1* g3nada espec3ficos no producen la enzima Cyp11a (cytochrome p450 side-chain cleavage enzyme). Esta enzima cataliza la primera reacci3n en la producci3n de testosterona. No es posible detectar a la prote3na StAR (steroidogenic acute regulatory protein) la cual es otro componente importante en la esteroidog3nesis. Sin embargo, la expresi3n de *AMH* en las c3lulas de Sertoli es normal (Jeyasuria et al., 2004)

Adem3s de su papel en la esteroidog3nesis, el *Sf-1* participa en la cascada de genes involucrados en la determinaci3n sexual y como un regulador de la expresi3n de *Sry*. Mediante ensayos de retardo electrofor3tico y de

cotransfección, se pudo conocer que Sf-1 se une al sitio NHR1 del promotor de *Sry* humano y es capaz de activarlo *in vitro* (De Santa Barbara et al., 2001).

La generación de una línea celular de cresta urogenital de cerdo que mantiene la expresión de *Sry*, permitió clonar un fragmento de 4.5 Kilobases que flanquea la región 5' de *Sry*. Se identificaron 2 sitios de transactivación a *Sf1*, ubicados a -1369 y -290pb del sitio de inicio de la transcripción (Pilon et al., 2003).

Lovell-Badge y Sekido (2008), proponen que SF1 juega un papel central en la determinación y diferenciación del testículo durante tres etapas del desarrollo. En la primera su presencia en la gónada bipotencial “sensibiliza” al “enhancer” de *Sox9* facilitando la interacción con SRY. Los autores, especulan sobre el posible mecanismo de dicha “sensibilización”. Así, el posible cambio en la estructura de la cromatina y la remoción de represores propician un acercamiento físico del enhancer al promotor y generan una plataforma para que otros coactivadores interaccionen con SRY y con sus sitios de unión al ADN. En la segunda etapa SRY y SF1 se unen a sus secuencias blanco en TESCO incrementando la actividad del “enhancer” y los niveles de expresión de *Sox9*. Finalmente, la tercera etapa ocurre al acumularse SOX9 por encima de un umbral crítico en el que se disparan varias asas (loops) independientes de retroalimentación positiva que incrementan la expresión de *Sox9* y la mantienen después que se apagó el *Sry* (Figura 4). Las asas de retroalimentación positiva incluyen la interacción proteína-proteína de SOX9 y SF1 y su unión directa a TESCO para incrementar su actividad. Otras asas de retroalimentación positiva podrían ser las vías de señalización de FGF9 y FGFR2 (Kim et al., 2006). La regulación de la localización intracelular de SOX9 vía prostaglandina D2 (Malki et al., 2005) y la activación de Ptgd2 por SOX9 (Wilhelm et al., 2005).

Por otra parte, la expresión de *Sf1* a los 9.5-10.5 dpc en las crestas genitales de ambos sexos sugiere su participación en el establecimiento de la gónada bipotencial. Los ratones transgénicos *Sf1* nulos inician la formación de la cresta genital pero desaparece alrededor de los 11.5 dpc (Luo et al., 1994) de

manera similar a lo que ocurre en los ratones *Wt1* nulos (Kreidberg et al., 1993). En las crestas genitales XY de ratones silvestres es probable que SF1 interactuó con WT1 para activar la expresión de *Sry* durante el establecimiento de la cresta genital (Hossain y Saunders, 2001; De Santa Barbara et al., 2001 y Pilon et al., 2003). Entre los 10.5-11.5 dpc la interacción de SF1 con SRY incrementan la expresión de SOX9 en las células precursoras de Sertoli preparándolas para su diferenciación fisiológica. Para esto, SF1 interacciona con SOX9, activa la expresión de *Amh* entre los 11.5 y 15.5 dpc para inhibir el desarrollo de los conductos müllerianos, aspecto indispensable para la diferenciación sexual somática del macho.

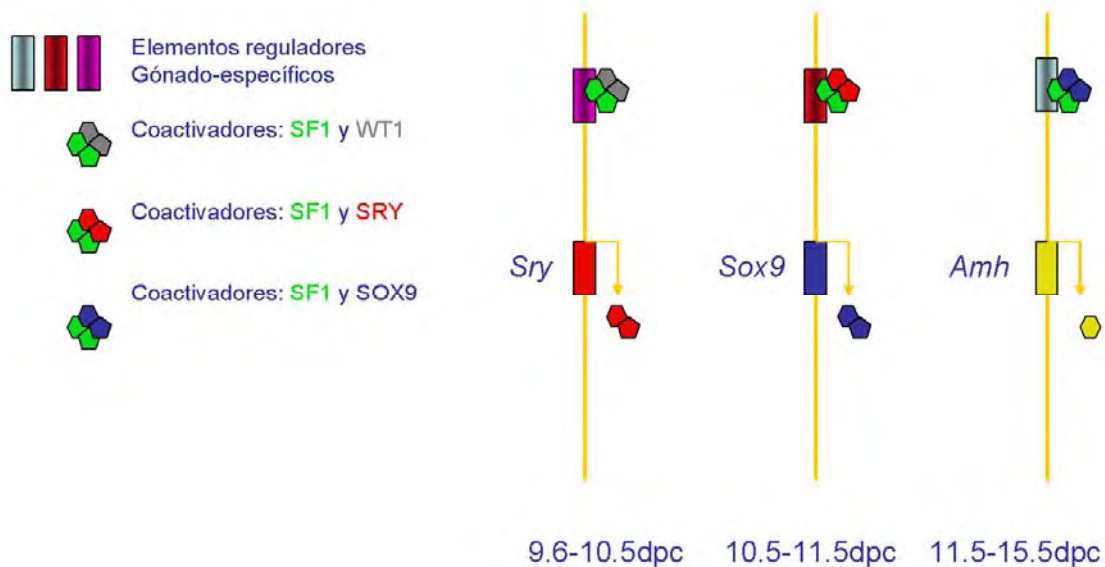


Figura 4. Representación esquemática de los papeles que juegan WT1, SF1, SRY y SOX9 en la determinación y diferenciación sexual del testículo. SF1 y WT1 regulan positivamente la expresión de *Sry*. Mientras que la interacción sinérgica de SF1 con SRY, regula positivamente la expresión de *Sox9*. Así mismo, SF1 interacciona con SOX9 para activar la expresión de AMH, la cual inhibe el desarrollo de los conductos Müllerianos, característica de la diferenciación fenotípica de los machos.

Como en todo proceso de desarrollo, la expresión de genes en el tiempo ocurre simultáneamente a la proliferación y reubicación de las células en el

espacio. En la Figura 5 se representa de manera esquemática la posición de las células considerando un corte transversal de la región central de las crestas genitales. A los 9.5 dpc se inicia el engrosamiento del epitelio celómico cuyas células expresan SF1 y WT1 entre otros factores de transcripción comunes a los dos sexos. Al proliferar, las células epiteliales desintegran la membrana basal que las separaba de las células mesenquimáticas (no mostradas). Después las células hijas se acumulan manteniendo una estrecha asociación y son las llamadas “células de soporte” en torno a las células germinales primordiales (no mostradas). En embriones XY las células de soporte mantienen la expresión de SF1 e inician la expresión de SRY. Posteriormente, es posible detectar el inicio de la expresión de SOX9. Es importante enfatizar que la secuencia de expresión génica es asincrónica, de manera que en la gónada indiferenciada (9.5-11.5 dpc) coexisten células expresando SF1 en colocalización con SRY y/o SOX9. A estas células de pre-Sertoli se suman las que de manera precoz expresan *Amh* iniciando la diferenciación fisiológica de las células de Sertoli. Por último, a los 12.5 dpc se hace evidente la diferenciación morfológica del testículo con la formación de los cordones seminíferos.

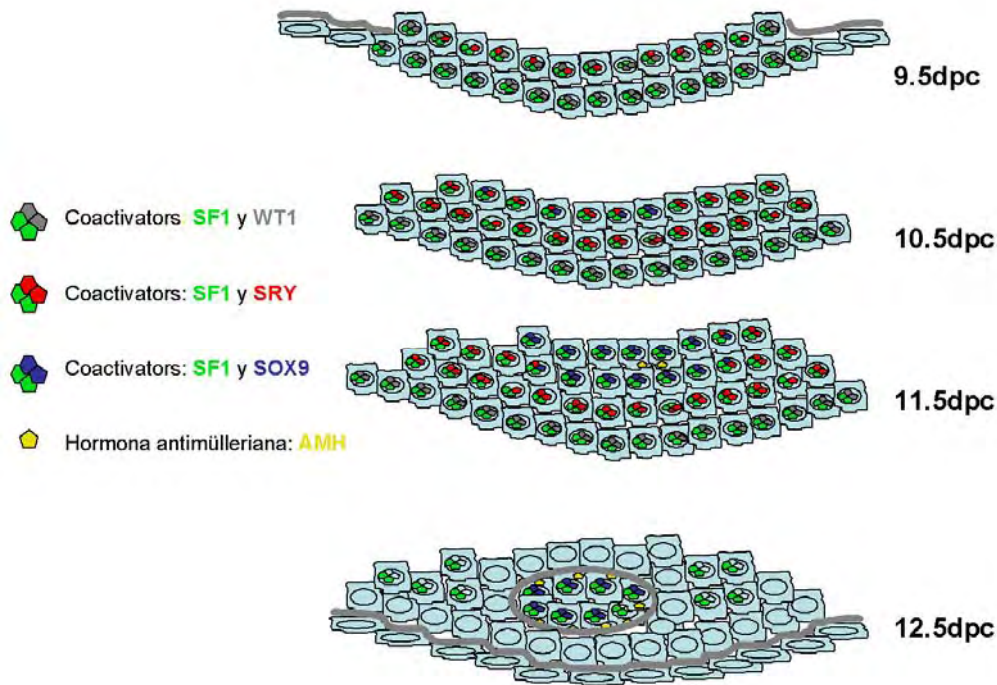


Figura 5. Representación esquemática de un corte transversal de la región central de una cresta gonadal. En embriones XY, a 10.5dpc, las células epiteliales que mantienen la expresión de *Sf1* inician la expresión de *Sry* y posteriormente se observa la expresión de *Sox9*.

C) Expresión de *Wnt4*

El gen *Wnt4* (wingless-related MMTV integration site 4) fue identificado en pacientes con carga cromosómica 46 XY que presentan reversión sexual de macho a hembra con duplicación de parte del cromosoma 1p (Jordan et al., 2003). Mediante hibridación in situ se observa la expresión de *Wnt4* a los 10.5dpc en las células mesenquimáticas en el mesonefros y en las crestas gonadales de ambos sexos. Sin embargo, a los 11.5dpc se observa la regulación negativa de *Wnt4* en el testículo mientras que en el ovario la expresión se mantiene (Vainio et al., 1999)

El análisis de la expresión de gónadas XY *Sox9*^{-/-} reveló que la expresión de *Wnt4* se mantiene de los 12.5 a los 15.5 dpc, aun en presencia de *Sry*. La sobre expresión de *Sox9* en gónadas XX regula negativamente la expresión de *Wnt4*. Por ello en el ratón la regulación negativa de la expresión de *Wnt4* en los testículos es regulada directa o indirectamente por el mantenimiento de la expresión de *Sox9* (Barrionuevo et al., 2006). Los ratones XX *Wnt4*^{-/-} presentan conductos de Wolf, de manera que presentan reversión sexual fenotípica de hembra a macho. Esto se debe a que los ratones XX *Wnt4*^{-/-} producen 3β-HSD favoreciendo la producción de andrógenos (Vainio et al., 1999) y aunque al nacimiento no se detectan células germinales, las células somáticas se organizan en estructuras similares a cordones testiculares (Heikkilä et al., 2005). Debido a que las gónadas XX *Wnt4*^{-/-} muestran una invasión de células endoteliales del mesonefros similar a la invasión que sufren las gónadas XY de los ratones control, se ha propuesto que la función de *Wnt4* es reprimir la vía de señalización de macho, bloqueando la migración de las células endoteliales a las gónadas XX (Yao et al., 2004). Sin embargo, los embriones ovarios *Wnt4*^{-/-} no son positivos a marcadores de células de Sertoli, y al nacimiento no hay formación de tejido testicular. Así mismo la sobre expresión de *Wnt4* no lleva hacia la reversión de macho a hembra, por lo que *Wnt4* no es un gen primario en la vía de determinación sexual del ratón.

En los embriones XY *Wnt4*^{-/-} la expresión de *Sry* no se ve afectada, sin embargo; muestran un decremento de la expresión de *Sox9* y *Dhh* a los 11.5dpc por lo que se sugiere que la acción y función de *Sry* se debilita al reprimirse la esteroidogénesis (Jeays-Ward et al., 2004). Una vez que los niveles de *Sox9* son lo suficientemente altos para mantener la diferenciación testicular (regulando positivamente la expresión de sus genes blanco), *Sox9* regula negativamente la expresión de *Wnt4*, lo que permite que el testículo desarrolle la actividad esteriodogénica requerida para adquirir el fenotipo masculino.

D) Expresión de la familia de receptores a insulina tirosina-cinasa

El triple “knockout” de los receptores a insulina tirosina-cinasa: *Igf1r/ Irr/Ir* (insulin-like growth factor 1 receptor/ insulin receptor related/ insulin receptor) demuestra que esta familia de genes es esencial en la vía de señalización que lleva a la determinación del testículo. Los animales homocigotos triple-negativos, desarrollan reversión sexual fenotípica de macho a hembra. A nivel molecular, los niveles de expresión de *Sry* se ven significativamente reducidos y no son capaces de estimular la expresión de *Sox9*. Además, es posible observar mediante hibridación in situ marcadores específicos de ovario como *Wnt4* y *Figα*. Es posible también observar una reducción notable del tamaño de las gónadas XY debido a que la proliferación de las células somáticas disminuye un 28% con respecto a los controles. La familia de receptores a insulina también participa en la regulación de la proliferación de la cresta genital. Por ello, la familia de receptores nucleares son esenciales en la vía de determinación testicular actuando, directa o indirectamente por arriba de *Sry* y en la proliferación celular del testículo (Nef et al., 2003).

E) Expresión de Gata-4 y Fog2

Gata 4 es un miembro de la familia de factores de transcripción con dedos de zinc. Esta familia de genes recibe dicho nombre debido a que sus proteínas presentan sitios de unión *GATA* en su ADN blanco (la secuencia consenso a la cual se unen las proteínas *GATA* es (A/T)GATA (A/G). A través de ensayos de retardo electroforético se demostró que *Gata4* interacciona con el promotor de AMH. Por lo que *Gata-4* podría ser un importante regulador de la expresión de AMH (Viger et al., 1998). A pesar de ello, el patrón de expresión de *Gata-4* en el desarrollo de la gónada de ratón, humano y cerdo no muestra una expresión dimórfica. Es posible detectar a la proteína *Gata4* por inmunohistoquímica en las crestas urogenitales bipotenciales (10.5dp) de ratón en ambos sexos. Dicha expresión se mantiene en los ovarios y testículos tanto fetales como posnatales (Anttonen et al, 2003).

Las proteínas *Fog* (Friend of *GATA*) interactúan con miembros *GATA*. En especial *Fog2* interactúa con *Gata-4* durante el desarrollo de la gónada

(Revisado en Anttonen et al., 2003). Se observa a *Fog2* en las crestas bipotenciales de ambos sexos, y posteriormente se regula negativamente en el testículo al formarse los cordones testiculares (solo algunas células de la túnica albugínea y del intersticio expresan a *Fog2*), en tanto que su expresión persiste en el ovario. Se propone que *Fog2* funciona como represor en el ovario fetal al contrarrestar el efecto de *Gata-4* sobre la expresión de AMH (Anttonen et al., 2003). Aunque no se detectan marcadores de células de Sertoli (*Sox9*, *Mis*, *Dhh*) ni de Leydig (*p450ssc*, *3βHSD* y *p450c17*), es posible detectar *Wt1* y *Sf1*, cuya expresión es previa a la de *Sry*. Como la activación de la esteroidogénesis en el testículo requiere la regulación negativa de *Wnt4*, las gónadas XY *Fog2*^{-/-} mantienen su expresión de manera similar a los ovarios normales (Tevosian, et al. 2002).

Reguladores del mantenimiento de la expresión de Sox9 en el testículo

Como la expresión de *Sry* en el ratón presenta una ventana temporal muy limitada y la expresión de *Sox9* se mantiene en las células de Sertoli, se han identificado varios genes involucrados en la retroalimentación para mantener la expresión de *Sox9* y las vías de señalización testicular. A continuación menciono algunos de ellos:

A) Factor de crecimiento fibroblástico 9 (Fgf9)

La expresión del gen *Fgf9* (fibroblast growth factor 9) se puede observar en las gónadas de ambos sexos a los 11.5 dpc, pero se restringe al testículo después de abatirse la expresión de *Sry* a los 12.5dpc. La expresión de *Fgf9* en el testículo se restringe a las células de preSertoli en los cordones testiculares. Los ratones XY *Fgf9*^{-/-} presentan reversión sexual de macho a hembra, aunque no se afecta la expresión de *Sry*, ni el inicio de la expresión de *Sox9*. Sin embargo; la expresión de *Sox9* no se mantiene, por lo que la diferenciación testicular es abortada (Schmahal et al., 2004, Kim et al., 2006). Por lo que se asume que *Fgf9* participa en el mantenimiento de la expresión de *Sox9* y del testículo en desarrollo. Al analizar la expresión de *Fgf9* en gónadas *Sox9*^{Δ/Δ} se

observó una reducción de la expresión de *Fgf9*. Mientras que la expresión de *Sry* no se vió afectada. De esta manera es posible pensar, que una vez abatida la expresión de *Sry*, la expresión de *Sox9* es esencial para mantener la expresión de *Fgf9*. De esta manera se genera una retroalimentación positiva entre la expresión *Sox9* y *Fgf9* para el mantenimiento de la diferenciación testicular (Kim et al., 2006). En las gónadas XY *Fgf9*^{-/-} de 12.5 -13.5 dpc es imposible observar la estructura característica del testículo. La lámina basal que delimita los cordones testiculares no se observa, y las células germinales se encuentran dispersas en la gónada. La expresión de *Sf-1* se detecta en un reducido número de células ubicadas en la superficie de la gónada siguiendo un patrón similar al de los ovarios silvestres. Las gónadas XX *Fgf9*^{-/-} se desarrollan de manera normal. Lo que indica que *Fgf9* es esencial para el desarrollo temprano del testículo pero no del ovario. Así mismo, *Fgf9* se encuentra involucrado en la proliferación de las células del testículo. En las gónadas XY *Fgf9*^{-/-} de 11.2dpc mantienen una reducida proliferación celular, similar a la observada en los ovarios silvestres. Es importante señalar que el receptor FGFR2 emigra del citoplasma al núcleo en las células somáticas a los 11.5dpc, coincidiendo con la de expresión de *Sry* y *Sox9*. Mientras que en el ovario se detecta a FGFR2 en el citoplasma de las células somáticas de la misma edad. Existe una relación entre la expresión de *Fgf9* con la localización de FGFR2 en el núcleo de las células, ya que en los testículos XY *Fgf9*^{-/-}, FGFR2 se observa en el citoplasma de las células somáticas al igual que en los ovarios silvestres. (Schmahl et al., 2004).

B) Prostaglandina D2 (*Pgd2*)

Pgd2 es una molécula de señalización, que al ser agregada al cultivo de gónadas XX, induce la expresión de *Sox9*. Se propuso que *Pgd2* actúa como un factor parácrino capaz de inducir la diferenciación de las células de Sertoli

(Adams and McLaren, 2002, y Wilhelm et al., 2005). Experimentos donde se mezclan células de ambos sexos demostraron que Pgd2 producida por las células de Sertoli es suficiente para inducir la expresión de Sox9 en células que no expresan a Sry (células XX). La enzima PGD2 sintetasa responsable de la síntesis de Pgd2 se restringe al testículo, puesto que no es detectada en el ovario fetal (Wilhelm et al., 2007). Se ha demostrado que Pgd2 sintetasa se expresa en las células de Sertoli inmediatamente después del inicio de expresión de Sox9. Así mismo, la proteína Sox9 es capaz de unirse y transactivar al promotor del gen *pgd2 sintetasa in vivo* (Wilhelm et al., 2007).

C) *Desert Hedgehog (Dhh)*

Es una molécula de señalización celular muy conservada; en el ratón, se detectan sus transcritos en las células de Sertoli de a partir de 11.5dpc y se mantienen en el ratón adulto (Bitgood et al., 1996., Yao et al., 2002). El receptor PTCH1 para *Dhh* se expresa en las células de Leydig. No se distinguen diferencias en el fenotipo testicular entre los ratones *Dhh* nulos con respecto a los controles entre los 11.5 a 12.5dpc. Sin embargo, a los 13.5dpc la lámina basal que delimita a los cordones testiculares, se encuentra ausente en algunas regiones. Lo que provoca que muchas células germinales se ubiquen fuera de los cordones testiculares (Pierucci-Alves et al., 2001).

Aunque los testículos de los ratones *Dhh*^{-/-} no presentan cambios en la expresión de *Sf1*, si muestran defectos en la diferenciación de las células de Leydig. Lo cual sugiere el papel mediador de *Dhh* como inductor requerido para la diferenciación de las células de Leydig. Las células precursoras de Sertoli que expresan Sry y Sox9, no producen *Dhh* (Yao et al, 2002).

D) *Hormona Antimülleriana (AMH por sus siglas en inglés)*

En el ratón la expresión del gen *Amh*, responsable de la producción de la hormona AMH es detectado a los 11.5dpc incrementándose hasta los 19.5dpc.

Posteriormente se observa un decremento después del nacimiento (Munsterberg et al., 1991 Hacker et al., 1995). AMH, también conocida como MIS (Müllerian Inhibiting Substance) es un miembro de la familia TGF β . Contribuye a la diferenciación del fenotipo masculino al inducir la regresión de los conductos Müllerianos. Es producido en los machos poco después de que las células de preSertoli expresen *Sry* y *Sox9*, por lo que la expresión de *AMH* es considerada marcadora de diferenciación de células de Sertoli. Mediante ensayos *in vitro*, e *in vivo*, se demostró que *Sox9* participa en la activación de la expresión de *Amh*. (De Santa Barbara et al., 2000, Arango et al., 1999).

Genes involucrados en el mantenimiento de la diferenciación ovárica

Wnt4 y *Dax1* son dos genes que se encuentran involucrados en la determinación del ovario. A través de su estudio se han identificado otros genes cuyos productos también participan en la vía de determinación del ovario.

A) Wnt4 y Foxl2

La expresión de *Wnt4* es regulada negativamente por los altos niveles *Sox9* en el testículo. En el caso del ovario, la ausencia de *Sry/Sox9* permite que *Wnt4* junto con otros genes activen la cascada molecular involucrada en la determinación del ovario. Recientemente se reportó que el doble “knockout” para *Wnt4* y *Foxl2* presenta reversión sexual de hembra a macho. (Ottolenghi et al., 2007). Las gónadas XX del recién nacido, desarrollan una corteza ovárica donde los ovocitos semejan una profase tardía y expresan marcadores de meiosis como *Sycp3* y γ H2AX. Sin embargo, la médula desarrolla estructuras que parecen a cordones testiculares con Sertoli que expresan *Sox9* y *Amh* y células germinales que se diferencian como espermatogonias. Por otra parte, la sobreexpresión de *Foxl2* en gónadas XY lleva a la desorganización de los cordones testiculares y una regulación negativa de la expresión de *Amh* en los polos de la gónada. Aunque no se ha encontrado un gen determinante de ovario similar al *Sry* del testículo, el desarrollo del doble knockout *Wnt4* y *Foxl2* es el primer modelo experimental de reversión sexual de hembra a macho que

permite proponer que ambos genes forman parte un “organizador ovárico” (Ottolenghi et al., 2007).

B) *Foliatina (Fst)*.

Es un efector río abajo de *Wnt4* para la vía de formación de los vasos sanguíneos ya que las hembras *Wnt4^{-/-}* no expresan *Fst*. Los ratones XY *Fst^{-/-}* muestran un fenotipo gonadal idéntico a las hembras *Wnt4^{-/-}* (Yao et al., 2004).

C) *Dax-1*[(dosage-sensitive sex reversal (DSS)-adrenal hipoplasia congenital critical (AHC) region on the chromosome X, gene 1 (NR0B1)]

Dax-1 es un miembro de los receptores nucleares huérfanos. Aunque fue propuesto como el factor determinante del ovario, los ratones nulos indicaron que también es necesario para el desarrollo testicular. La expresión de *Dax1* es regulada por *Sf1* a través de varios sitios de unión en su región promotora. *Sf1* coopera con β -catenina para activar la transcripción de *Dax1* e inhibe la interacción sinérgica de *Sf1* con *Wt1*, por lo que funciona como un antagonista de la producción de AMH. *Wnt4* también regula positivamente a *Dax1*, ya que en los ovarios *Wnt4^{-/-}* decrecientan significativamente la expresión de *Dax1* (Mizusaki et al., 2003).

D) R-spondin 1

La familia de proteínas R-spondin (RSPO) tiene 4 miembros en el humano. Las proteínas *Rspo* son moléculas de secreción que se unen a un receptor que activa β -catenina. Individuos que acarrean deleciones en el gen *RSPO1* desarrollan reversión sexual de hembra a macho. Probablemente, *Rspo1* sea requerido para bloquear la cascada de la vía testicular y regule la cascada de determinación en el ovario (Parma et al., 2006)

Integración preliminar de las vías de expresión, involucradas en la determinación sexual

La figura 6 muestra una posible cascada molecular de determinación del testículo. La presencia del gen *Sry* en los machos es la clave que inicia la regulación. Primero, la hipometilación de la región reguladora de *Sry*, es un factor importante para el acceso a factores de transcripción y coactivadores que junto con la maquinaria de transcripción regulan positivamente la expresión de *Sry* (Nishino et al., 2004). Después, *Wt1* y *Sf1* se unen específicamente a elementos reguladores del promotor de *Sry* y son capaces de regular positivamente su expresión (Hossain and Saunders 2001; De Santa Barbara et al., 2001 y Pilon et al., 2003). Otros componentes de la cascada de determinación sexual son *Gata-4* y su cofactor *Fog2*. La interacción de estos factores es necesaria para alcanzar el pico de expresión de *Sry* a los 11.5dpc en el ratón (Tevosian et al., 2002). Los diferentes miembros de la familia de receptores a insulina tirosina-cinasa (*Ir*, *Irr*, *Igf1r*) cooperan para regular positivamente la expresión de *Sry*, ya que el triple knockout para los receptores a insulina tirosina-cinasa (*Ir*^{-/-}, *Irr*^{-/-}, *Igf1r*^{-/-}) muestra reversión sexual de macho a hembra (Nef et al., 2003). La accesibilidad de la región reguladora de *Sry* por parte *Wt1*, *Sf1*, *Gata-4/Fog2* y los receptores a insulina del tipo tirosina cinasa (*Ir*, *Irr*, *Igf1r*) llevan al incremento de los niveles de los transcritos de *Sry* observándose su máxima expresión a los 11.5dpc. Se ha propuesto que *Wnt4* actúa con *Sry* para diferenciar a las células de Sertoli. Es importante señalar que la ausencia de expresión de *Wnt4* afecta el desarrollo de las gónadas de ambos sexos (Jeans-Ward et al., 2004).

La expresión de *Sox9* se regula positivamente en el testículo cuatro horas después de iniciarse la expresión de *Sry*, de manera que la expresión de ambos genes ocurre durante el proceso de determinación testicular (Kent et al., 1996; Bullejos and Koopman, 2001; Kidokoro et al., 2005 y Wilhelm et al., 2005). La unión directa y la activación sinérgica de *Sf1* y *Sry* sobre el TESCO de *Sox9* lleva al aumento de la expresión de *Sox9* en el testículo (Sekido y Lovell-Badge, 2008). Cuando los niveles de *Sry* han decaído, *Wt1* podría ser importante para mantener directa o indirectamente la expresión de *Sox9* y por lo tanto, mantener la diferenciación de las células de Sertoli (Gao et al., 2006). *Sox9* puede

autoregular su expresión al unirse a sitios de su propio enhancer (Sekido y Lovell-Badge, 2008). La expresión de *Fgf9* es determinante para el mantenimiento de la expresión de *Sox9* al establecerse un “loop” de retroalimentación positiva entre ambos genes. Con ello se asegura el mantenimiento del testículo diferenciado como lo demuestran los ratones knockout *Fgf9*^{-/-} (Kim et al., 2006). Una vez que los niveles de *Sox9* han aumentado lo suficiente, *Sox9* inhibe la expresión de *Wnt4* promoviendo la esteroidogénesis. *Fgf9* reprime al gen promotor de ovario *Wnt4* (Kim et al., 2006). La molécula de señalización *Pgd2* está involucrada en la diferenciación de células de Sertoli al inducir la expresión de *Sox9* en células que no expresaron *Sry* (Wilhelm et al., 2007., Adams y McLaren, 2002) e inducir la translocación nuclear de *Sox9* (Malki et al., 2005). En experimentos *in vitro*, *Sox9* es capaz de unirse y transactivar al promotor de prostaglandina D sintasa (*Pgds*), involucrada en la producción de *Pgd2* (Wilhelm et al., 2007). El único gen blanco de *Sox9* demostrado *in vivo* e *in vitro* es *Amh* (De Santa Barbara et al., 1998; Arango et al., 1999). Experimentos *in vitro* demuestran la interacción de *Sox9* con *Sf1* sobre el promotor de *Amh* (De Santa Barbara et al., 1998).

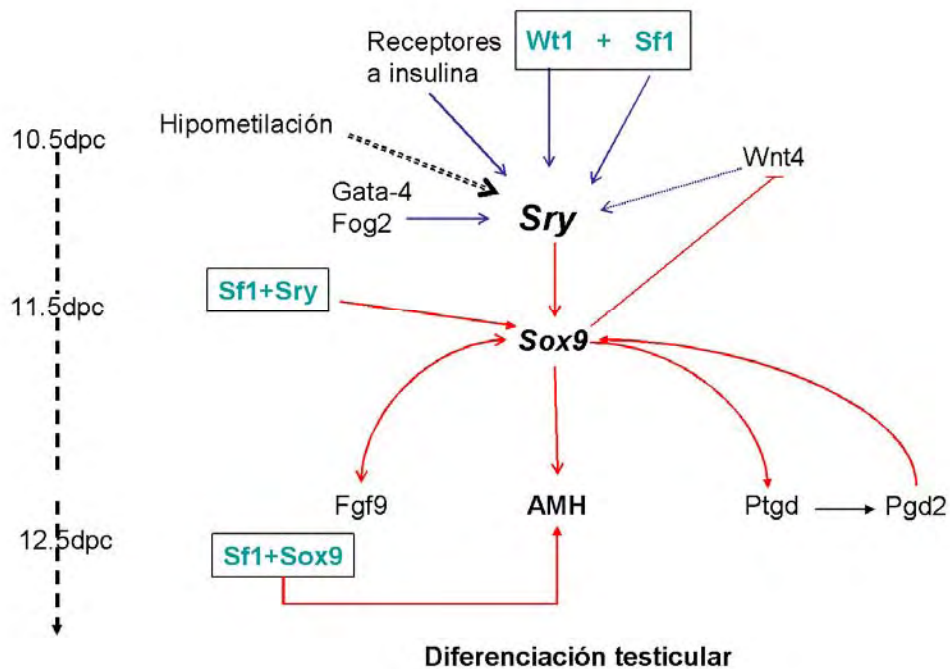


Figura 6. Red hipotética de eventos moleculares de la determinación sexual del testículo.

La figura 7 muestra una hipotética red de eventos moleculares que podría estar implicada en la determinación y diferenciación del ovario. Es importante tener claro el papel de estos genes en el desarrollo del ovario ya que para cumplir el papel de determinante ovárico (*Od*), el gen propuesto debe ser capaz de dirigir la vía molecular que lleva a la determinación ovárica. Es decir un gen o genes que cumplan una función homóloga a la que cumple *Sry* en la determinación del testículo. Los genes *Wnt4*, *Foxl2*, *Dax1* y *Rspo1* han sido propuestos como determinantes de ovario, ya que mutaciones en cada uno de ellos, producen reversión sexual de hembra a macho en humanos. Sin embargo, la reversión sexual es incompleta y no es reproducible de manera similar al humano en ratones nulos. Además, no queda claro si el papel determinante de esos genes se ubica en la vía inhibidora del testículo (genes *Z*) o en la organizadora del ovario (genes *Od*). En gónadas indiferenciadas XX, se detectan niveles bajos de

Sox9. Sin embargo, la regulación positiva de *Sox9* no alcanza el umbral requerido para iniciar la determinación y diferenciación de las células de Sertoli y en consecuencia, la organización del testículo. Como en la cresta genital bipotencial XX no se encuentra el *Sry* los niveles de *Sox9* son muy bajos y por lo tanto no se inhibe la expresión de *Wnt4*. Los niveles de *Wnt4* aumentan y junto con *Sf1* mantienen bajos los niveles de *Sox9* (Vainio et al., 1999). Debido a que las gónadas XX *Wnt4*^{-/-} muestran una invasión de células endoteliales del mesonefros similar a la invasión que sufren las gónadas XY de los ratones control, se ha propuesto que la función de *Wnt4* es al reprimir la vía de señalización de macho al bloquear la migración de las células endoteliales a las gónadas XX (Yao et al., 2004).

En un principio se postuló a *Dax1* como factor determinante del ovario, basado en el fenotipo de reversión sexual en individuos XY con doble copia de *Dax1* (Bardoni et al., 1994). Sin embargo la generación del ratón Knockout reveló que también es necesario para el desarrollo testicular (Yu et al., 1998). Se ha reportado que *Dax1* inhibe la interacción sinérgica de *Sf1* con *Wt1*, por lo que funciona como un antagonista de la producción de *Amh*, considerado marcador de diferenciación de Sertoli (Niakan and McCabe 2005, para revisión).

El gen *Foxl2* muestra expresión específica durante la determinación sexual en las gónadas de hembras en ratón, pollo, tortuga y peces (revisado en Yao, 2005). El dimorfismo de expresión llevó a postular al *Foxl2* como un factor importante en la vía de determinación del ovario. Experimentos con el ratón XX *Foxl2*^{-/-} mostraron reversión sexual parcial al nacimiento y su sobre expresión en gónadas XY llevó a la desorganización de los cordones testiculares. Tales resultados concuerdan con una función de anti-testículo del *Foxl2*. Por otra parte, la expresión de *Fog2* en el ovario inhibe la función de *Gata-4* necesaria para la regulación positiva de *Amh*. La ausencia de *Amh* en las hembras permite la diferenciación de las trompas de Falopio, útero, cuello uterino y el tercio superior de la vagina (Anttonen et al., 2003) como era de esperarse según el paradigma de Alfred Jost. Recientemente se reportó que el doble Knockout

para *Wnt4* y *Foxl2* presenta reversión sexual parcial de hembra a macho y desarrollan ovotestis (Ottolengui et al., 2007).

De esta manera la expresión de ambos genes en el ovario es necesaria para inhibir algunos aspectos de la diferenciación del macho, al menos en la etapa posnatal. Como sólo se ha reportado una descripción parcial del fenotipo desarrollado por los ratones XX *Wnt4*^{-/-}*Foxl2*^{-/-} es necesario todavía conocer la descripción de gónadas XX *Wnt4*^{-/-}*Foxl2*^{-/-} embrionarios, lo cual ayudará a discernir el papel de ambos genes en la determinación sexual gonadal.

Por otra parte, Parma y colaboradores (2006) describieron reversión sexual de hembra a macho en pacientes que presentan una mutación en el gen *R-spondin1* (*RSPO1*). Como en las mutaciones arriba descritas, se propuso a *RSPO1* como el “organizador ovarico”. *RSPO1* es parte de una familia de proteínas ligando huérfanas, que actúan mediante la activación de las vías de señalización Wnt y β -catenina. En el caso de los condrocitos la vía de señalización a través de β -catenina lleva a la degradación de Sox9 (Akiyama et al., 2004). Asumiendo que este hecho pueda pasar en el desarrollo de la gónada, se postuló a *RSPO1* como el *gen Z*, al reprimir la vía de determinación testicular al degradar a Sox9 mediante la vía β -catenina (Capel 2006). Sin embargo, recientemente Tomizuka y colaboradores, (2008) encontraron que las hembras *Rspo*^{-/-} presentan pseudo-hermafroditismo al retener derivados tanto de los conductos de Wolf como Müller y no se detecta la expresión de Sox9. Además, a los 14.5dpc las gónadas XX de *Rspo*^{-/-} tienen la forma normal de un ovario silvestre de la misma etapa. Queda claro así, que la ausencia de *Rspo1* no provoca una reversión sexual primaria. Se trata de un proceso secundario de desdiferenciación ovárica debido a la muerte de las células germinales.

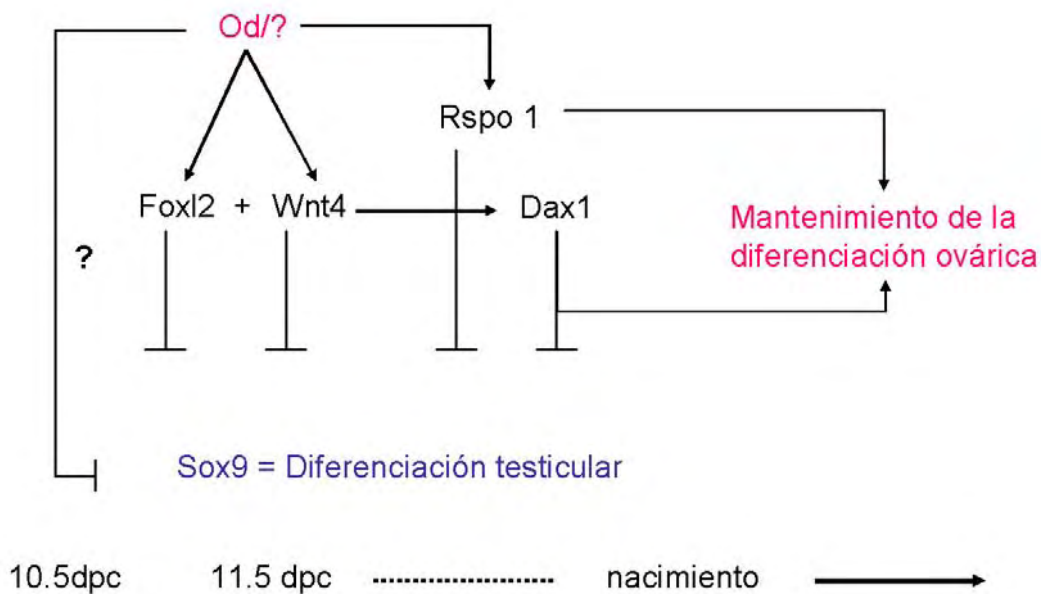


Figura 7. Red hipotética de los eventos moleculares implicados en la determinación y mantenimiento del ovario diferenciado.

Sabemos que el proceso de determinación sexual en los mamíferos (incluido el humano) se inicia a nivel de la gónada embrionaria. Para elucidar el mecanismo bajo el cual se inicia el proceso molecular de determinación sexual, se ha utilizado al ratón como sistema modelo para identificar los genes que se expresan antes y después de la diferenciación morfológica de la gónada. La correlación entre los patrones de expresión de genes clave y la morfogénesis de la gónada ha sido abundante en el ratón; sin embargo, pocos estudios similares existen en otras especies de mamíferos. Los pocos estudios realizados, han demostrado que existen diferencias importantes en cuanto a la estructura de los genes involucrados en la determinación sexual, así como en sus patrones de expresión, con respecto al ratón. Por otra parte, el aspecto histológico y la duración del desarrollo embrionario de la gónada difieren de manera considerable entre los mamíferos. Lo anterior sugiere que los genes que

controlan la morfogénesis y la diferenciación celular han adquirido modificaciones evolutivas importantes en diferentes especies.

Diferenciación sexual de las células germinales: arresto mitótico o inicio de meiosis

Las células germinales son las precursoras de los espermatozoides y ovocito. En el ratón, la expresión de las proteínas morfogenéticas de hueso 4 y 8b (BMP4/8b) en el ectodermo extraembrionario y de BMP2 en el endodermo extraembrionario induce a un grupo de células con un linaje no restringido a iniciar una competencia para su determinación como células germinales (revisado en Molyneaux and Wylie 2004). A los 7.5E, la región donde se ubican las futuras células germinales en el epiblasto posterior comienza a expresar *Fragilis* (miembro de la familia de genes inducibles por interferón). Un grupo de estas células inician la expresión de *Stella* cuya función es suprimir la expresión de genes homeobox, con lo que evitan su diferenciación hacia linajes somáticos. Las células germinales migran primero de forma pasiva acarreadas por el endodermo del intestino posterior y después de manera activa a través del mesenterio intestinal para invadir a la cresta gonadal. En el caso del ovario, la presencia de las células germinales es determinante para la formación del ovario, ya que su ausencia no ocurre la diferenciación del ovario. Mientras que la diferenciación morfológica del testículo se lleva a cabo en ausencia de células germinales (Merchant 1975).

Secuencial al establecimiento del sexo gonadal, se da la diferenciación sexual de las células germinales (CGs). Con el fin de diferenciarse como ovocitos u espermatozoides, las CGs reducen su número cromosómico a la mitad a través del proceso de meiosis. Las células germinales inician su diferenciación según el ambiente gonadal en el cual se encuentran (McLaren 1995, McLaren 2003), en el ovario inician la meiosis en la vida fetal o perinatal, pero se detiene en el diploteno de la primera división meiotica. Poco antes de la ovulación se reinicia la meiosis y completa la primera división meiotica.

Comienza la segunda división meiótica seguida de un segundo arresto, el cual culmina solo si el ovocito es fertilizado.

Las células germinales del testículo fetal entran en arresto mitótico G0/G1. Reanundan la mitosis después del nacimiento para iniciar la meiosis en el día 5 después del nacimiento. En el humano las células germinales inician la meiosis en la pubertad (Hilscher et al., 1974). En el testículo se mantienen espermatogonas en proliferación y oleadas de células en meiosis, de manera que se mantiene la producción de espermatozoides a lo largo de la vida reproductiva del macho.

La diferencia en el tiempo en que se inicia la meiosis llevó a proponer la existencia de un factor promotor de la meiosis producido en la rete ovari y el mesonefros adyacente (Byskov and Saxen., 1976). Sin embargo, la observación de que células germinales ectópicas XY en ratones machos inician la meiosis al mismo tiempo que las células germinales XX en el ovario, llevó a postular que las células germinales poseen un programa autónomo para iniciar la meiosis independientemente del sexo cromosómico y que el testículo produce un factor inhibidor de la meiosis (Zamboni and Upadhyay, 1983).

En el caso del humano, las células germinales del ovario inician la meiosis en la semana 10 de gestación, mientras que las células germinales de los machos continúan sus divisiones hasta su arresto mitótico durante las semanas 16 a 18 de gestación (revisado en Goto et al., 1999).

El ácido retinoico y el inicio de la meiosis

El ácido retinoico (AR) es un potente morfógeno involucrado en diversos procesos en la organogénesis de los vertebrados (Chambon 1996). AR es un derivado del metabolismo de la vitamina A, su acción en las células es ubicua y su mecanismo principal de acción es la regulación transcripcional de genes blanco uniéndose a sus receptores intracelulares. En el caso del AR sus receptores intracelulares son los receptores de ácido retinoico (RAR). Existen

tres isoformas de los RAR: RAR α , RAR β , RAR γ (Chambon 1996; Pennimpede et al., 2006)

La vitamina A (retinol) es oxidada a retinaldehído por acción de la familia de enzimas alcohol deshidrogenasas: ALDH1A1, ALDH1A2 Y ALDH1A3, todas importantes para el desarrollo normal del embrión (Niederreither and Dollé 2006; Niederreither et al., 2002). Usando al ratón RARE-*lacZ* en el cual el gen LacZ es dirigido por RARE (elementos de respuesta para ácido retinoico), se demostró que los túbulos del mesonefros en ambos sexos producen AR ya que es posible detectar la expresión de *Aldh1a2* el cual codifica para la enzima RALDH2 involucrada en la síntesis del AR. El AR difunde desde el mesonefros y llega a la gónada para inducir la meiosis en las CGs del ovario (Bowles et al., 2006). En los ratones machos, las células germinales no inician la meiosis en la vida fetal debido a la protección de CYP26B1, enzima encargada de degradar al AR. La expresión de *Cyp26b1* se detecta principalmente dentro de los cordones testiculares fetales (Bowles et al., 2006). Las células germinales de los ratones XY *Cyp26b1*^{-/-} entran prematuramente en meiosis en el día 13.5dpc y parecen arrestarse en la etapa de paquiteno, debido al incremento de los niveles de AR. Posteriormente hay un decremento de las células germinales por apoptosis (MacLean et al., 2007). El cultivo del testículo fetal con inhibidores de la familia de enzimas P450 y *Cyp26b1*, lleva al inicio de la meiosis de las células germinales (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006.). El hecho de que las células germinales XX *Cyp26b1*^{-/-} inician la meiosis antes de los ratones XX silvestres, se ha propuesto que *Cyp26b1* puede ser importante en el ovario fetal para controlar el tiempo en que inicia la meiosis (Bowles and Koopman 2007).

Es importante señalar que en el ratón la presencia del mesonefros es necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación de los cordones seminíferos y, como se demostró de recientemente, es fundamental para la diferenciación del comportamiento meiótico de las células germinales al ser la fuente de producción del AR. Sin embargo, en mamíferos de mayor talla con períodos largos de gestación como el humano, el mesonefros se separa de la gónada y

sufre un proceso de regresión antes del inicio de la meiosis. De manera que se desconoce la fuente de AR e incluso se desconoce el mecanismo de acción en especies diferentes al modelo del ratón.

En el ratón, el AR induce la expresión del gen *Stra8* (stimulated by retinoic acid gene 8) el cual parece regular el inicio de la meiosis tanto en la ovogénesis como en la espermatogénesis. Específicamente, está involucrado en la formación de los complejos sinaptonémicos, la cohesión y recombinación de cromosomas homólogos característicos de la Profase I de la meiosis (Baltus et al., 2006; Anderson et al., 2008). Además, en la ovogénesis la expresión es requerida para la replicación de DNA previa al inicio de la meiosis. Sin embargo, no es requerida para la replicación de DNA previa al preleptoteno de las células germinales en los testículos juveniles (Baltus et al., 2006; Anderson et al., 2008). El análisis del fenotipo de un ratón nulo *Stra8* concluyeron que STRA8 no es indispensable para en el inicio de la meiosis en los macho sino que participa como un regulador positivo comprometiendo a los espermatoцитos a la meiosis (Mark, et al., 2008). Las diferencias en los resultados obtenidos por los dos grupos de puede deberse a las diversas mezclas del fondo genético de los ratones utilizados. Existen variaciones en el progreso de la meiosis en los espermatoцитos de la mezcla genética de los ratones C57BL/6 con 129/Sv reportada por Mark y colaboradores, (2008). Aunque dichas variaciones también fueron observadas por el grupo de Anderson et al., debido a la irreproducibilidad en los resultados deciden utilizar como fondo genético la cepa C57/BL6. Las diferencias en los fenotipos de los ratones *Stra8*^{-/-} según la cepa de fondo genético y de cruza es de gran interés ya que nos permite cuestionarnos acerca de la participación de *Stra8* en el inicio y progreso de la meiosis en las células germinales del macho en los mamíferos. Por lo que es importante considerar que los resultados obtenidos en el ratón son difíciles de extrapolar a otras especies de mamíferos.

En el caso de embriones de pollo, la meiosis del ovario inicia durante la embriogénesis en el día 15.5, aproximadamente 9 días después de la

diferenciación sexual gonadal. La entrada en meiosis se da como un evento asincrónico y gradual sin tener un patrón rostro caudal y de corta duración como sucede en el ratón. La expresión *Aldh2* es evidente en las gónadas de ambos sexos previo y durante el inicio de la meiosis del ovario, mientras que el mesonefros no muestra expresión de esta enzima. La enzima CYP26B1 implicada en la degradación de retinoico se expresa en las células somáticas de ambas gónadas, pero llega a restringirse progresivamente en las células de la corteza del ovario, donde se ubican las células germinales que inician meiosis en el ovario. Mientras que en el testículo la expresión de Cyp26B1 se mantiene en los cordones del testículo. La abundancia de expresión de *Aldh2* coincide con la expresión del gen *Stra8* el cual aumenta su expresión previo al día del inicio de la meiosis (Smith et al., 2008).

El arresto mitótico de las células germinales en el testículo fetal

En el ratón, al mismo tiempo que las células germinales inician la meiosis, las células germinales en el macho dejan de dividirse manteniéndose en arresto mitótico (G1/G0) hasta la pubertad. En el ratón, el arresto mitótico de las células germinales es un proceso asincrónico y gradual que ocurre durante E12.5-E14.5 (Western et al., 2007).

La expresión de *Nanos2* es crítica en la diferenciación de las células germinales. Durante la embriogénesis de ratón *Nanos2* se expresa específicamente en las células germinales del testículo. Los ratones XY *Nanos2*^{-/-} entran en arresto mitótico a los 14.5 dpc, pero reanudan la mitosis a los 15.5 dpc. La expresión de *Nanos2* se incrementa cuando se reducen los niveles de *cyp26b1*. La inhibición de la señalización de AR es requerida para inhibir la expresión *Stra8* e inducir la expresión de *Nanos2*. Una vez que se induce la expresión de *Nanos2* se inicia el programa de diferenciación de las células germinales del macho (Suzuki and Saga, 2008). Así mismo la expresión de *Cyp26b1* por si mismo no es suficiente para prevenir el inicio de la meiosis en las células germinales del macho por lo que *Nanos2* puede ser parte del mecanismo que lleva al arresto mitótico a las células germinales del macho.

Las células germinales del testículo fetal también inician la meiosis

A pesar de que las células germinales del macho entran en arresto mitótico durante la vida fetal, se ha observado la presencia de cuerpos preleptoténicos en células germinales dentro de los cordones seminíferos de fetos de humano (Luciani et al., 1977) y conejo (Gondos and Byskov, 1981, Hayashi et al., 2000) sin embargo no avanzan hacia las etapas sucesivas de la profase meiótica (leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno).

Aunado a ello, en el ratón es posible detectar a la proteína Scp3 (Di Carlo et al., 2000, Chuma and Nakatsuji 2001) y los transcritos de Dmc1 (Chuma y Nakatsuji 2001) implicados en la formación de los complejos sinaptonémicos y recombinación respectivamente. Es posible que algunas células germinales del testículo fetal entren en meiosis y posteriormente sufran apoptosis.

RESUMEN

La determinación sexual de los mamíferos depende de la acción de *SRY* y *SOX9* en las gónadas al inicio del establecimiento de la cresta genital embrionaria. Aunque los mayores avances en el conocimiento se han logrado empleado al ratón como modelo, la diversidad biológica hace necesario estudiar otros mamíferos para establecer sus alcances explicativos.

En el presente trabajo realizamos una correlación entre los patrones de expresión de *SRY/SOX9* y el proceso de morfogénesis durante el desarrollo de la gónada del conejo, especie en la que Alfred Jost estableció el paradigma de la diferenciación sexual en 1947. Encontramos que en el macho, el inicio de la expresión de *SRY/SOX9* sigue muy de cerca el establecimiento de la cresta genital indiferenciada entre los 13 y 14 días post-coito (dpc). En contraste con el ratón, encontramos que los niveles de *SRY/SOX9* del conejo aumentan después de la diferenciación sexual morfológica. Además, en el conejo se mantienen niveles bajos de expresión de *SRY* y *SOX9* en las gónadas de macho y hembra respectivamente, en tanto que en el ratón, dicha expresión desaparece.

En el ratón las células de Sertoli provienen del epitelio celómico, en tanto que en el conejo hay una contribución de células epiteliales provenientes de las cápsulas de Bowman del mesonefros adyacente. Dichas células no expresan *SRY* y son inducidas a expresar *SOX9* e integrarse a los cordones seminíferos como células de Sertoli. Los presentes resultados indican que el patrón de expresión de *SRY/SOX9*, su correlación con el proceso de morfogénesis gonadal y la etapa del desarrollo en que se establece la cresta genital del conejo difieren del ratón y son similares a otros mamíferos de mayor talla incluyendo al humano.

En contraste con el ratón, el inicio de la meiosis de las ovogonias, no coincide con el inicio del arresto mitótico en las proespermatogonias. Así mismo, aunque en el ratón el mesonefros adyacente produce el ácido retinóico (AR) responsable del inicio de la meiosis, en el conejo, los transcritos de la enzima

Aldh1a2 involucrada en el último paso de la síntesis del AR están presentes en las células pre-foliculares del ovario y de Sertoli en los testículos. Nuestro estudio muestra al conejo como una buena alternativa para elucidar algunos mecanismos del desarrollo normal y sus alteraciones en la gónada del humano.

ABSTRACT

Sex determination in mammalian gonads depends on the concerted action of *SRY* and *SOX* at the genital ridge. Although most research on the mechanisms involved in sex determination has been done in mice, the study of non-model organisms may indicate the extent of the generalizations currently based on model systems. The present study investigated the correlation between the *SRY/SOX* patterns of expression and the process of morphogenesis in the developing gonad of the rabbit. In males, the onset of *SRY/SOX9* expression closely followed the establishment of undifferentiated genital ridges at 13 to 14 dpc. In contrast with the mouse, the rabbit real-time PCR revealed that levels of *SRY/SOX9* peak after the onset of seminiferous cord formation, while in mice this occurs before. Furthermore, rabbit gonads maintain low levels of expression of *SRY* and *SOX9* in male and female gonads respectively. In situ hybridization suggests that cells of the mesonephric Bowman capsules, which do not express *SRY*, may become *SOX9*-expressing, pre-Sertoli cells during the long period of seminiferous cord formation in the rabbit. In contrast to mouse, current results indicate that the patterns of *SRY/SOX9* expression associated to the process of gonadal morphogenesis in rabbit, appears similar to those of other mammals. Finally, retinoic acid required for the onset of meiosis in mammalian fetal ovaries is produced in the adjacent mesonephros in the fast growing mouse, we found however, that *Aldh1a2* (encoding the major enzyme of retinoic acid synthesis) is expressed within the gonad, in pre-granulosa and Sertoli cells in ovary and testis respectively. In conclusion, this study shows that the rabbit is a useful model to analyze the normal and abnormal gonadal morphogenesis in large mammalian species, including humans.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque el ratón es hasta ahora el sistema modelo más empleado para estudiar el desarrollo gonadal de los mamíferos, es cada vez más evidente su carácter excepcional debido a la brevedad de su gestación. La embriología clásica establece la formación de dos territorios, la corteza y la médula, a partir de los cuales ocurre la diferenciación del ovario o el testículo, respectivamente. Sin embargo, en el ratón ambos territorios no son distinguibles y los mecanismos de acción de los genes rara vez son expresados en términos de morfogénesis. En el primordio gonadal del conejo hay un claro establecimiento territorial de corteza y médula como ocurre en la mayoría de los mamíferos incluyendo al humano. El conejo fue el modelo empleado por Alfred Jost al que le debemos el paradigma de la diferenciación sexual en los mamíferos. Sabemos que las diferencias fenotípicas entre los sexos dependen de la formación de los testículos fetales cuya actividad endócrina inhibe la expresión de un programa genético establecido como “feminizante constitutivo” en los mamíferos.

De manera que consideramos de interés analizar los perfiles de expresión de los genes *SRY* y *SOX9* responsables de la determinación del testículo y correlacionarlos con el patrón de desarrollo estructural de las gónadas. Así mismo, llevamos a cabo la identificación de las células que expresan *Aldh1a2* y *Cyp26b1* involucrados en el balance de los niveles del ácido retinóico con el propósito de conocer las interacciones celulares encargadas de regular el inicio de la meiosis fetal.

OBJETIVO GENERAL

Correlacionar la organogénesis de la gónada con los perfiles de expresión de genes clave para la determinación sexual y el inicio de la meiosis empleando al conejo como modelo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer el perfil de expresión de los genes *SRY* y *SOX9* durante la determinación y la diferenciación sexual de las gónadas del conejo.
2. Determinar el patrón de desarrollo estructural de las gónadas del conejo y correlacionarlo con el perfil de expresión de los genes *SRY* y *SOX9*.
3. Determinar el patrón de expresión de *SCP3* (marcador de meiosis), de *ALDH1a2* (cuyo producto participa en la síntesis de RA) y *CYP26b1* (factor inhibidor de la meiosis) en ovarios y testículos del conejo.
4. Comparar nuestros resultados con los reportados en ratón y en otras especies de mamíferos incluyendo al humano.

HIPÓTESIS

El patrón de expresión de los genes *SRY* y *SOX9*, los procesos celulares conducentes a la diferenciación de los cordones seminíferos y las interacciones celulares que regulan el inicio de la meiosis varían en espacio y tiempo entre especies de mamíferos con diferentes patrones de desarrollo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron hembras preñadas en diferentes días de gestación y conejos recién nacidos. Los animales fueron sacrificados de acuerdo a los lineamientos éticos del Instituto. Las hembras preñadas y los recién nacidos fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico. El día del coito fue tomado como el día cero de la gestación y los complejos urogenitales (CU) o gónadas fueron obtenidos en los 13, 14, 15, 16, 18, 20, 26, 30 días post-coito (dpc) , 31 dpc (recién nacido) y a los 1, 5, 7 y 10 días post-parto (dpp). El número de embriones utilizados en cada técnica, se muestra en la tabla 1 del apéndice 1.

Sexado de los embriones

Como antes del día 21 pc no es posible distinguir el sexo de los embriones a simple vista, el sexado se hizo mediante la amplificación de un fragmento del gen *Sry* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El DNA genómico se obtuvo de las cabezas de los embriones. Se diseñaron oligonucleótidos, de acuerdo a la secuencia de *SRY* de conejo reportada por Sinclair et al. (1990). Cada reacción de PCR consistió de DNA genómico, 1X buffer de reacción, 1.5mM MgCl₂, 0.3μM de cada primer, 0.3mM de dNTPs y 2.5 UI de amplificasa (Biogenica) en un volumen final de 30μl. Después de día 20pc, el sexado se realizó de manera visual.

Microscopía de luz y electrónica

Las gónadas fueron procesadas para microscopía de alta resolución. Brevemente, las muestras se fijaron en buffer karnovsky, se posfijaron en 1% de OsO₄ en buffer de Zetterqvist y se incluyeron en Epon 812. Los cortes semifinos (1μm) y finos (60nm) se tiñeron con azul de toluidina y acetato de uranilo, respectivamente.

Extracción de RNA y transcripción reversa

Los embriones fueron colocados en PBS a 4°C. Se realizó la microdissección de los complejos urogenitales o gónadas, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Se realizó la extracción del RNA total usando Trizol reagent (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA). Para evitar la contaminación con DNA genómico, el RNA fue tratado con 1µl de DNase1 and 2µl 10X DNase1 reaction buffer (DNA-free, Ambion Inc.) durante 30 min a 37°C. La calidad del RNA fue analizada con la relación de absorbancia $^{260}/_{280} = 2.0 \pm .15$. La reacción de transcripción reversa, se hizo utilizando 1µg de RNA total, y se incubó durante 60min a 42°C con 100UI de Superscript II RNase H reverse transcriptase reagent (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA). En estudios preeliminarios, se realizó RT-PCR para definir el rango de edad, en cual se expresan *Sry* y *Sox9* en complejos urogenitales y gónadas del conejo. Los oligonucleótidos diseñados se muestran en la tabla 2 del apéndice 2. Los productos de las reacciones de PCR fueron cargados en un gel de agarosa 1%/TAE, y las imágenes fueron capturadas digitalmente. Las reacciones de amplificación se hicieron incubando 1µl de cDNA en un volumen de 30 µl de PCR (1X reaction buffer, 1.5mM MgCl₂, 0.3µM de cada primer, 0.3mM de cada dNTP y 2.5UI de amplificasa (Biogenica).

PCR en tiempo real

Sondas marcadas con FAM fueron diseñadas por Applied Biosystems de secuencias específicas de *SRY* y *SOX9* de conejo. Se realizaron reacciones de 15µl para PCR en tiempo real (Taqman, Applied Biosystems ABI, Foster City, CA, USA). Se utilizó como control endógeno una sonda prediseñada por Applied Biosystems 18S rRNA eucariótico (VIC dye-labeled probe 18S rRNA), La expresión de *SRY* y *SOX9* fue cuantificada por el método de comparación relativa de Ct. Para ello, se calculó la fase exponencial de la amplificación de la fluorescencia del reportero. Se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para calcular los cambios

relativos en la expresión de cada gen. Las condiciones de amplificación fueron: 50°C durante 2min, 95°C por 10min, 50 ciclos a 95°C por 15seg, 60°C por 1min. Cada ensayo se hizo por duplicado o triplicado. Los datos fueron obtenidos utilizando el programa del ABI PRISM 7300 SDS analytical thermal cycler (Applied Biosystems).

Hibridación in situ en montaje completo (mCHIS) y en cortes por congelación (cgHIS)

Se amplificaron fragmentos de 202pb para *SRY* y de 303pb para *SOX9* por PCR de cDNA obtenido de gónadas de embriones macho de 16dpc. Se utilizaron ovarios y testículos de 7dpp para estandarizar la expresión de *Aldh1a2* (implicado en la producción y liberación de ácido retinoico) y *Cyp26b1* (enzima encargada de degradar ácido retinoico) y *Scp3* (proteína que forma parte de los complejos sinaptonémicos). Los fragmentos obtenidos fueron secuenciados en ambos sentidos. Dichas secuencias se analizaron con el programa BLAST de NCBI con el fin de corroborar la identidad de los genes mediante la homología del gen con otras especies de mamífero.

Las reacciones de PCR fueron clonadas en los plásmidos comerciales TOPOII, Invitrogen y pGEM-T-easy, Promega. La identidad y el sentido de inserción de los fragmentos fue verificada por secuenciación. Los plásmidos que contenían los insertos de *SRY*, *SOX9*, *SCP3*, *ALDH1A2* Y *CYP26B1* se linearizaron mediante reacciones de restricción y se utilizaron como templado para las RNA polimerasas SP6 o T7 (Promega, Madison, WI). Mediante reacciones in vitro se generaron sondas sentido y antisentido marcadas con digoxigenina-UTP (DIG RNA labeling mix, Boehringer Mannheim). Los nucleótidos no incorporados, fueron eliminados con las columnas spin column (DyeEx 2.0 Spinkit QIAGEN). Diferentes muestras fueron hibridadas con la sonda sentido y antisentido. Las muestras asignadas para cgHIS se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS toda la noche, se lavaron con PBS y se deshidrataron con series ascendentes de sacarosa (10%, 20%, 30%) y 1:1 OCT, 30% sacarosa, toda la noche a 4°C. Las muestras fueron embebidas en OCT y

se congelaron en hielo seco para ser almacenadas a -70°C . Se obtuvieron cortes de $10\mu\text{m}$, se pre-hibridaron durante dos horas a 66°C (*SOX9*, *ALDH1A2* y *CYP26B1*)/ 68°C (*SRY*) en solución de hibridación (50% formamida, 1.3% SSC pH 5, 5mM EDTA pH 8, 0.2% Tween 20, 0.5% CHAPS, 100 $\mu\text{g/ml}$ heparina y 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNA de levadura). Se reemplazó la solución anterior, por solución de hibridación fresca que contenía 1 μg de ribosonda. Se bloquearon con 1% de blocking reagent (ROCHE) y se incubaron con el anticuerpo preabsorbido (Anti-digoxigenin-AP Fab fragment, Boehringer Mannheim). El revelado de la reacción se obtuvo incubando con BM Purple AP Substrate, precipitating (ROCHE).

Las muestras para *mCHIS* se fijaron toda la noche con 4% de paraformaldehído en PBS, se lavaron 2 veces con PBT y se deshidrataron con series ascendentes de metanol/PBT y se almacenaron en 100% de metanol. Se hidrataron y trataron con 10 $\mu\text{g/ml}$ proteinasa K in PBT durante 10-30 min (según el tamaño de la muestra). Las muestras se prehibridaron durante 3h con la solución de hibridación (50% formamida, 5XSSC, 50 $\mu\text{g/ml}$ heparina, 0.1% Tween 20, and 50 $\mu\text{g/ml}$ de RNA de levadura a 70°C). La ribosonda fue agregada e hibridada toda la noche a 70°C . Al día siguiente se lavaron y bloquearon con 15% de suero de cabra, 2% de albúmina de suero bovino (BSA). La señal fue inmunolocalizada usando un anticuerpo pre-absorbido anti-digoxigenina-AP Fab fragment (Boehringer Mannheim). El revelado de color fue obtenido incubando las muestras con BM Purple AP Substrate, precipitating (ROCHE).

Administración intraperitoneal de BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)

La BrdU se administró por vía intraperitoneal a conejos hembras y machos de 30dpc 31dpc estos recién nacidos, 1 y 10dpp. La dosis utilizada fue de 50 μg de BrdU/g peso del animal, disuelta en 0.007N NaOH en 0.9% NaCl. Los animales fueron sacrificados una hora después de la inyección. Los ovarios o testículos fueron disectados y se fijaron en PFA 4% durante toda la noche a 4°C .

Procesamiento de muestras para congelación

Los complejos urogenitales, ovarios y testículos disectados se lavaron con PBS frío y se fijaron con 4% de paraformaldehído toda la noche. Las muestras se deshidrataron en series ascendentes de sacarosa: 10, 20, 30%, y se mantuvieron toda la noche en una solución 1:1 30% sacaraosa-OCT. Las muestras se incluyeron en OCT y se congelaron a -70°C . Se realizaron criosecciones de $10\mu\text{m}$ y se montaron en laminillas silanizadas.

Inmunofluorescencia: SOX9, AMH y BrdU (5-Bromo-2-deoxyuridine)

Criosecciones de $10\mu\text{m}$ fueron lavadas con 1% PBT (1% Tritón en PBS), se bloquearon con 2% BSA en PBT durante 2h. Las criosecciones se incubaron con los anticuerpos primarios generados en cabra, anti-AMH (anti-MIS, C-20 Santa Cruz) diluido 1:250 o anti-SOX9 (P-20 Santa Cruz) diluido 1:200 a 4°C . Al día siguiente se lavaron con PBT y se incubaron con el anticuerpo secundario generado en burro anti-cabra conjugado al fluorógeno Cy5 (Chemicon) durante 1 h a temperatura ambiente. Controles negativos sin anticuerpo primario fueron incluidos en la estandarización de las reacciones. Para detectar BrdU se obtuvieron criosecciones de 10μ que se permeabilizan con 0.3% Tritón/PBS durante 30 minutos. Las laminillas se colocaron en 2N HCl a 37°C durante 30 minutos. Se restauró el pH con 100mM de Borato de sodio pH 8.5. Los cortes fueron bloqueados con 3% de suero de caballo en 0.3% Tritón/PBS durante una hora. Las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario monoclonal ratón anti-BrdU (1:500) toda la noche a 4°C . Los cortes fueron lavados con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario burro anti-ratón FITC (1:100) durante una hora a temperatura ambiente. Los cortes fueron lavados con PBS y se montaron con el medio de montaje DAKO. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal Pascal LSM.

Reacción de fosfataza alcalina para detección de células germinales

Criosecciones de 10µm fueron permeabilizadas con 0.3% de Tritón/PBS durante 10min. Se lavaron con buffer NTMT durante 10 minutos y se incubaron con Fast Red durante 10 minutos, (se disuelve una pastilla de Fast Red en el buffer proporcionado por el proveedor, DAKO). Los cortes se lavaron con PBS durante 10 minutos. Se continuó con la inmunofluorescencia para BrdU.

RESULTADOS

Sexado de los embriones

El sexo de los embriones se determinó mediante PCR utilizando oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen *Sry*, presente únicamente en los machos, por lo que no fue detectado en hembras ni en el control negativo sin templado (Figura 8). A partir de los 20dpc en adelante, el sexado se realizó de manera visual. En los testículos a diferencia de los ovarios es posible observar conspícuos vasos sanguíneos que recorren longitudinalmente a este (Figura 9).

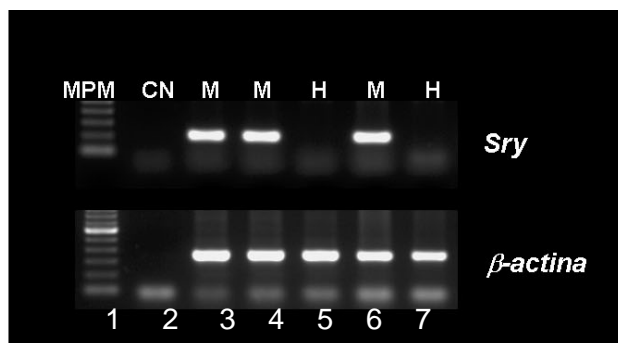


Figura 8. Sexado de embriones de conejo amplificando un fragmento del gen *Sry*. Carril 1- marcador de peso molecular, carril 2- control sin templado; carriles 3-7 muestras de 5 diferentes embriones M=macho H=hembra.

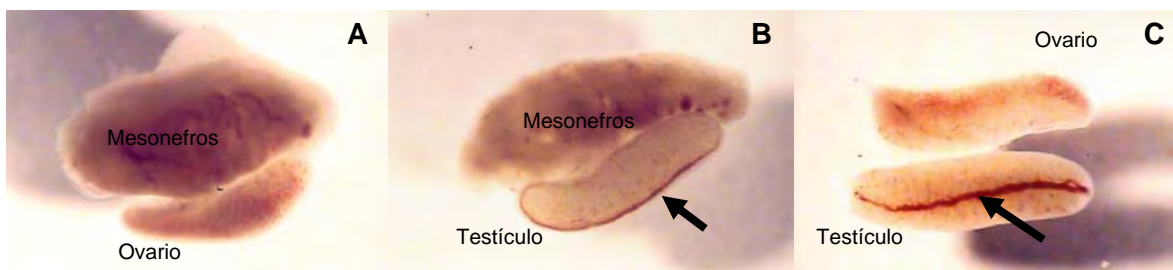


Figura 9. Complejos urogenitales de conejo de 20dpc. En **A** y **B** se muestran los complejos urogenitales de hembra y macho respectivamente. En **C** se muestra un ovario y un testículo separados del mesonefros. Las flechas hacen referencia a los vasos sanguíneos que caracterizan al testículo diferenciado.

El desarrollo gonadal como proceso estructural

A los 13-14 dpc la cresta genital de los embriones de conejo, es evidente como un borde distinto, formado por el engrosamiento del epitelio celómico en ambos sexos (Figura 10). Placas metafásicas de células mitóticas en el epitelio celómico, aparecen orientadas de manera tangencial, sugiriendo que la proliferación de éstas células contribuye al engrosamiento de la gónada (Figura 10B). Además, cortes seriados muestran que células epiteliales de la capsula de Bowman de corpúsculos mesonéfricos de la región craneal, también contribuyen al engrosamiento de la cresta gonadal emergente en los embriones de ambos sexos (Figura 10).

La diferenciación histológica que permite distinguir entre las gónadas de macho y hembra es evidente a los 15 dpc (Figuras 11A y B) correspondiente a la etapa 19 de la tabla Carnegie de desarrollo (Carnegie Stage CS=19) (ver inserción Figura 11A). En los machos genéticos identificados por la presencia del gen *SRY*, cortes seriados revelan la integración de una red epitelial formada inicialmente por la separación del epitelio celómico y las células que formaban la cresta genital indiferenciada (Figura 10A). La red epitelial que representa al tejido precursor de los cordones seminíferos no se organiza simultáneamente a lo largo de la gónada, sino que muestra un gradiente regional de organización a lo largo de la gónada en desarrollo. Subdividiendo a la gónada en tres partes: caudal, central craneal. El proceso de formación de la red epitelial se inicia en las dos primeras (Figura 11A) y continua en la región craneal durante varios días. A los 15 dpc, el tercio craneal aún exhibe un estado indiferenciado, como el

que se observa en la cresta gonadal completa a los 14dpc en ambos sexos (Figura 11C y D).

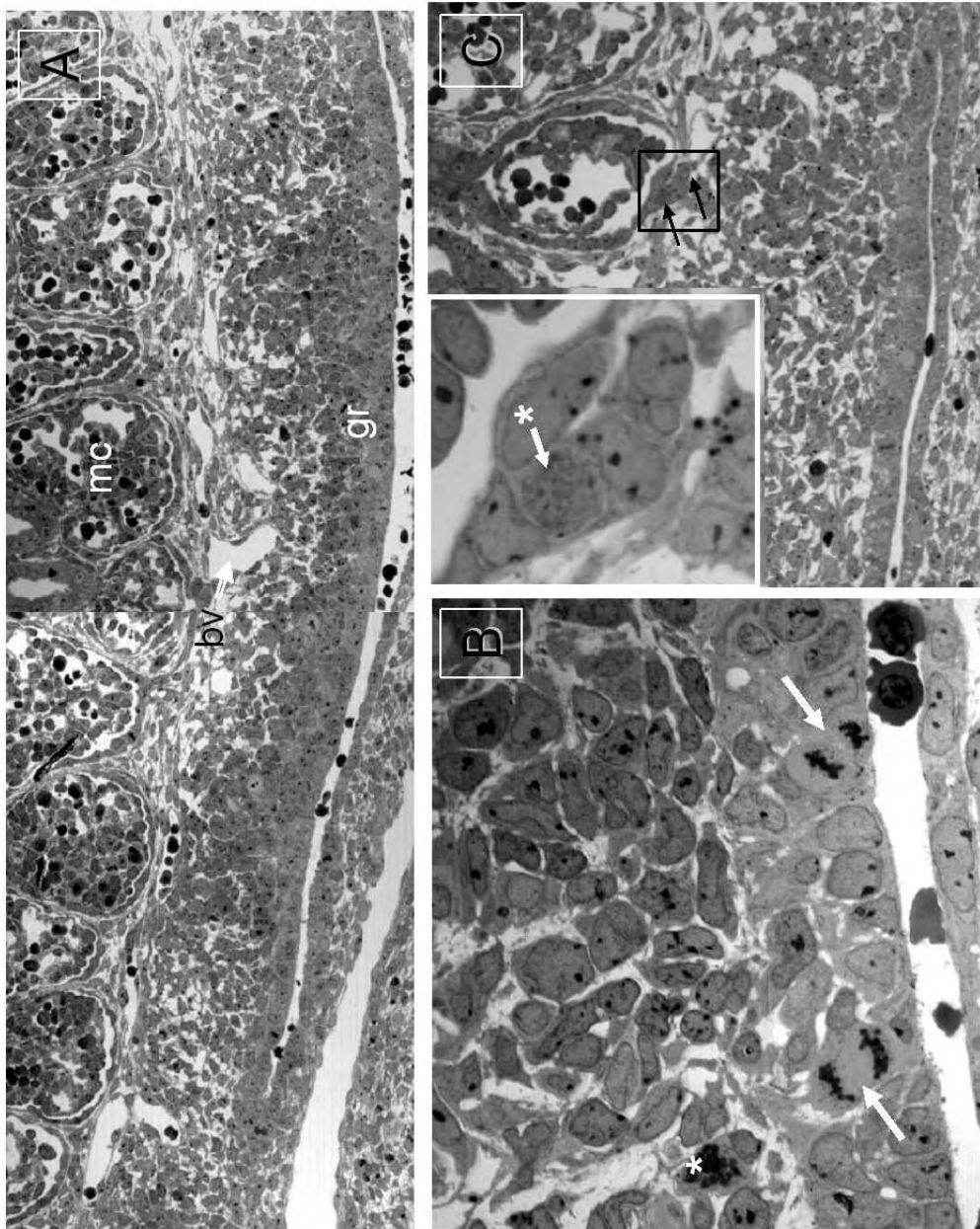


Figura 10. Cortes de crestas urogenitales de 13 y 14 dpc. **A** Varios corpúsculos mesonéfricos (mc) aparecen separados del engrosamiento del epitelio celómico de la cresta genital (gr) por el mesénquima laxo y los vasos sanguíneos (bv). **B** Dos células en anafase de la mitosis, su orientación indica que al dividirse, la célula hija contribuye al engrosamiento de la cresta genital

(flechas). Se observan dos células germinales dentro de la red epitelial (gc). La célula en mitosis separada de la superficie del epitelio (*) muestra que la actividad proliferativa ocurre a lo largo de la cresta indiferenciada. **C** Contribución de células de las cápsulas de Bowman (Bc) a la cresta genital (flechas). La inserción corresponde a una amplificación del área marcada en el cuadro. Muestra una célula de la cápsula de Bowman en profase mitótica (*).

Los resultados morfológicos sugieren, que además de la proliferación del epitelio celómico, la red epitelial precursora de los cordones seminíferos, se forma tanto por agregación de células epiteliales de corpúsculos mesonéfricos como por condensación de células mesenquimáticas en proliferación (Figuras 11B y 11C). La red epitelial es separada de las células del estroma (vasos sanguíneos, células mesenquimáticas y fibroblastos) y por el depósito gradual de una lámina basal entre los dos tejidos (Figura 12). Con el microscopio electrónico se detecta el depósito de una delgada (60-80nm) e incompleta lámina basal (Figura 12A), sobre la superficie de la red epitelial que dará origen primero a los cordones seminíferos (Figura 12A). El espesor de la lámina basal se incrementa que indican la final diferenciación de los cordones seminíferos (Figura 13B), con la adición de fibras de colágeno (Figura 12B). En torno a la membrana basal, se observa células mioideas que indican la diferenciación final de los cordones seminíferos (Figura 13B). Los primeros cordones seminíferos aparecen en las regiones central y caudal siendo la región craneal donde se forman los últimos.

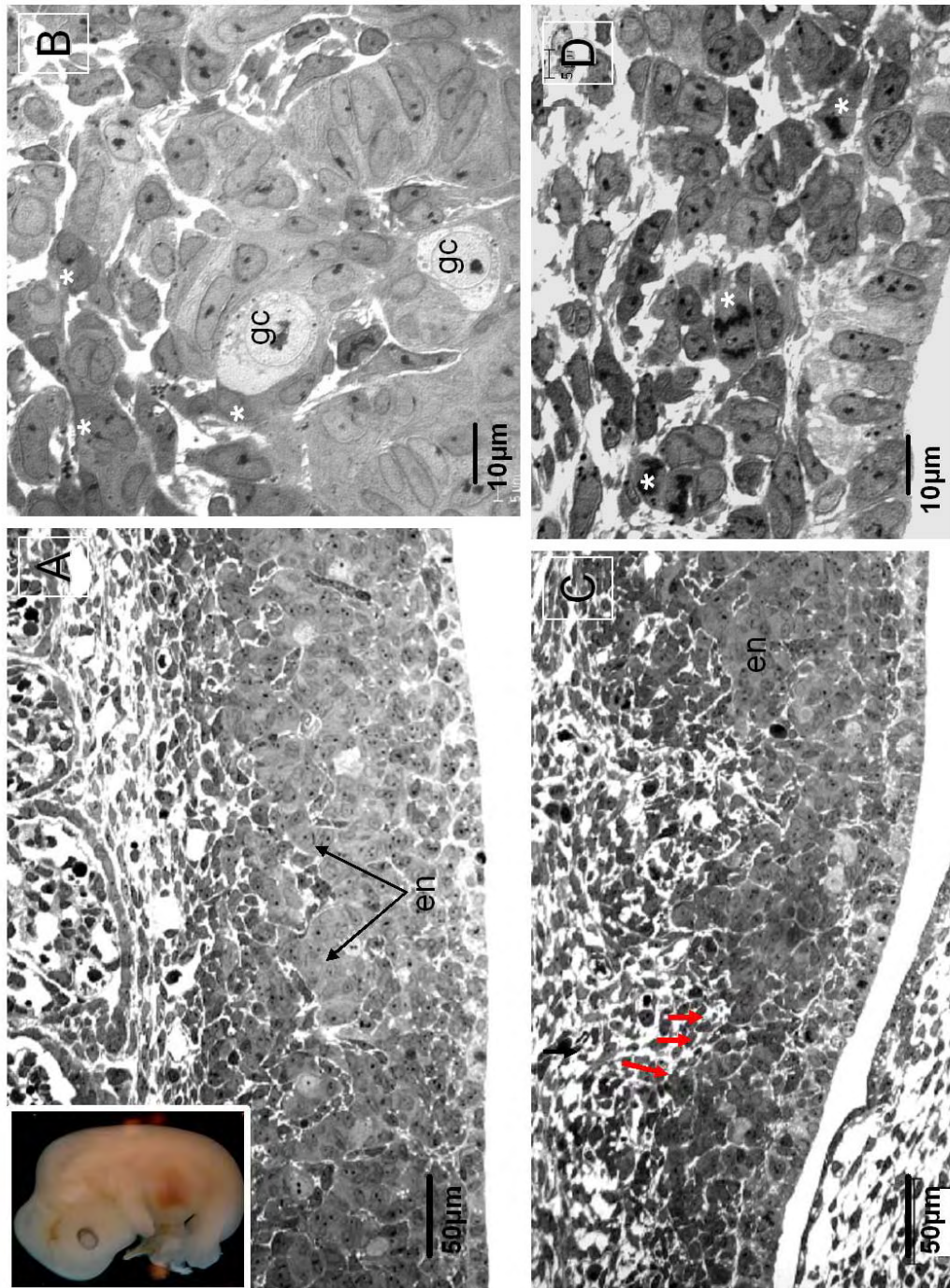


Figura 11. Embrión de conejo de 15 dpc al inicio de la diferenciación morfológica del testículo. **A** La red epitelial (en), precursora de los cordones seminíferos inicia su formación simultáneamente en la parte central y caudal de la cresta genital. **B** Células más densas, provenientes probablemente de las capsulas de Bowman son agregadas a la cadena epitelial del lado

mesonéfrico de la cresta genital (*) **C** Extremo craneal de la cresta genital que muestra la formación de la red epitelial tanto por condensación celular (flechas rojas) como por **D** proliferación celular (*).

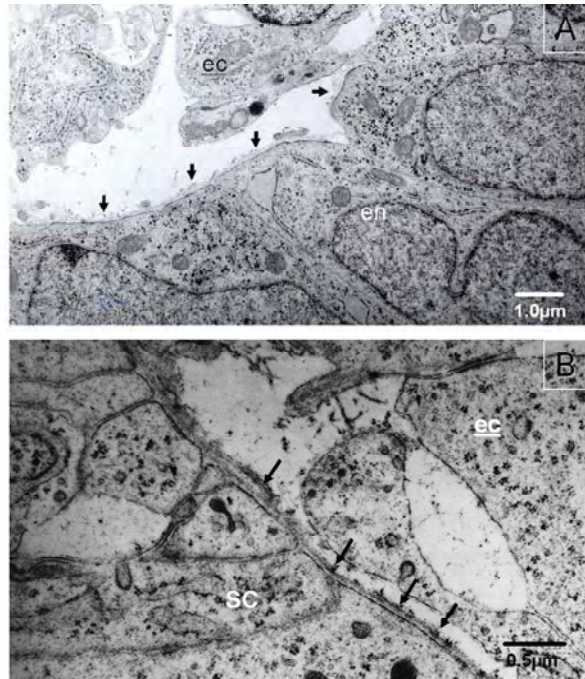


Figura 12. Micrografías electrónicas mostrando la formación de la membrana basal que segrega al tejido epitelial (en) del tejido estromático (ec) durante la organogénesis del testículo. **A** El depósito de una delgada lámina basal sobre la superficie de la red epitelial (en) a los 15 dpc (flechas) precede a la diferenciación de los cordones seminíferos. **B** El depósito de fibras de colágena sobre la lámina basal (flechas) incrementa el espesor de la lámina basal al avanzar el proceso de diferenciación de los cordones seminíferos (sc).

Este proceso sigue el mismo patrón regional que su precursor histológico, la red epitelial. Los primeros cordones seminíferos aparecen en las regiones central y caudal, siendo la región craneal donde se forman los últimos. Sin embargo, en el área dorsal de la región central ubicada a lo largo del mesonefros, el proceso de diferenciación de los cordones seminíferos prosigue durante varios días como en el extremo craneal del testículo (Figuras 13A, B). La continuidad estructural entre cordones seminíferos, red epitelial y corpúsculos mesonefricos craneales, sugiere un proceso espacio-temporal dinámico de reclutamiento celular involucrado en el crecimiento de los cordones seminíferos del conejo (Figuras 13A, C).

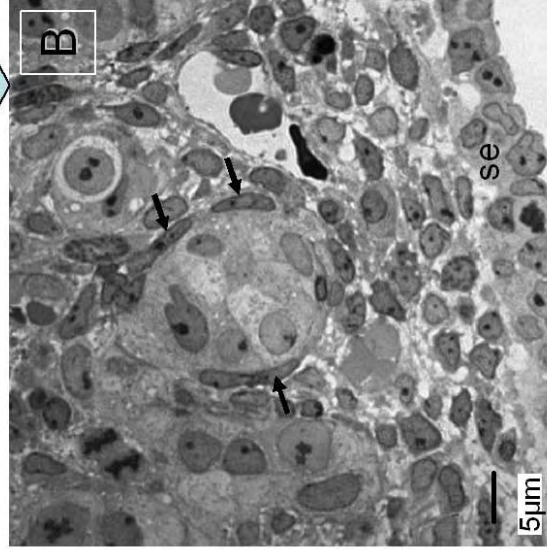
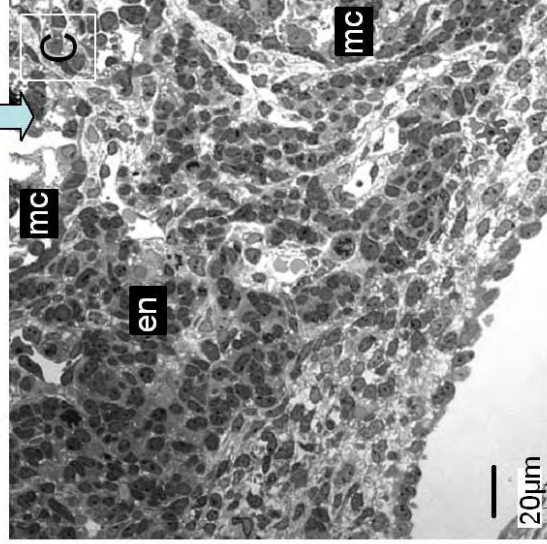
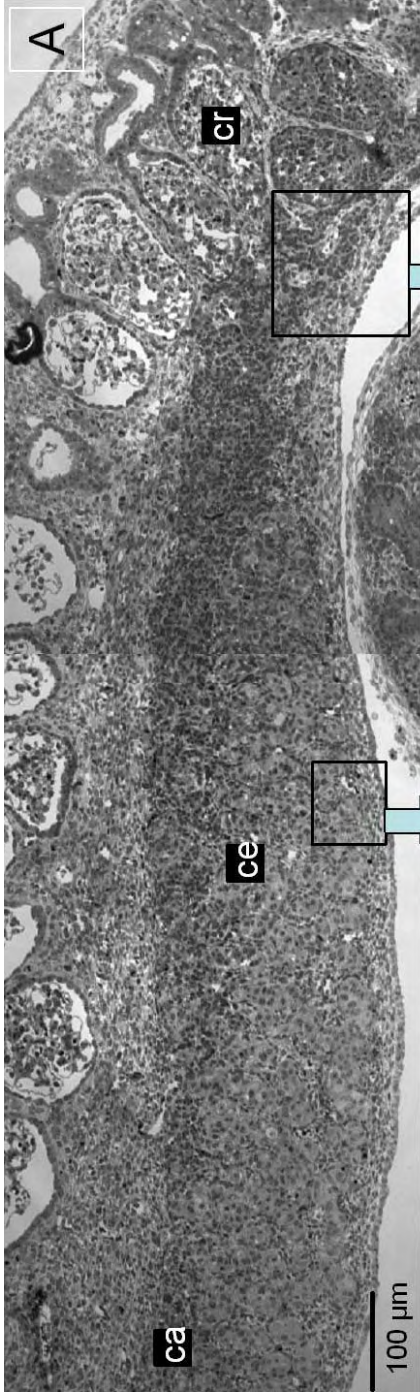


Figura 13. Cortes longitudinales de los complejos urogenitales de 18dpc. **A** La formación de los cordones seminíferos a partir de la red epitelial sigue un patrón que se inicia en la región caudal (ca) y se retrasa en la región craneal (cr) mostrada en el lado derecho de la figura. **B** Los cordones seminíferos envueltos por las células mioideas (mc) aparecen primero en el lado vecino a la superficie del epitelio. **C** Amplificación del extremo craneal del testículo que muestra conexiones epiteliales entre los corpúsculos mesonéfricos en regresión y la red epitelial en crecimiento.

Niveles de expresión de SRY y SOX9 en gónadas de conejo por PCR en tiempo real.

Para obtener el patrón de expresión de *SRY* durante el desarrollo de la gónada del conejo, se analizaron crestas genitales de 14 dpc y gónadas de 15-28 dpc y de 1-7 dpp. Ya que las crestas urogenitales de 13 dpc son principalmente tejido mesonéfrico y adrenal, mientras que las células de la cresta genital representan una parte mínima, esta edad fue omitida del análisis. Por ello, se inició el análisis con las crestas urogenitales de 14 dpc, cuando la cresta gonadal se encuentra todavía morfológicamente indiferenciada. Como la separación física de la cresta gonadal y el mesonefros adyacente es técnicamente imposible a los 14 dpc, se utilizaron los complejos urogenitales completos (sin primordios adrenales). Sin embargo de los 15 dpc en adelante, las gónadas fueron aisladas y analizadas por pares de embriones individuales. La figura 14 muestra el perfil de expresión de *SRY* obtenido por PCR en tiempo real. La expresión de *SRY*, fue detectada desde los 14 dpc y su mayor expresión ocurrió a los 15-16 dpc. Posteriormente, los niveles permanecieron similares de los 14 dpc a los 18dpc en adelante.

Se determinó el patrón de expresión de *SOX9* comparando gónadas de hembra y macho de manera similar al *SRY* en etapas del desarrollo equivalentes. Los resultados se muestran en la figura 15. Al igual que con *SRY*, los niveles más altos de expresión de *SOX9*, fueron evidentes a los 15dpc. Posteriormente niveles tienden a disminuir habiendo un cierto incremento después del nacimiento. Por otra parte, aunque a bajos niveles, se detectó la expresión de *SOX9* también en las gónadas de hembra en todas las edades estudiadas. La mayor expresión de *SOX9* en ovarios, fue detectada a los 15 dpc, como lo observado en el perfil del macho. Sin embargo, los machos

exhibieron un incremento de 13.98 unidades arbitrarias con respecto a la hembra, enfatizando su importante papel en la determinación sexual del testículo

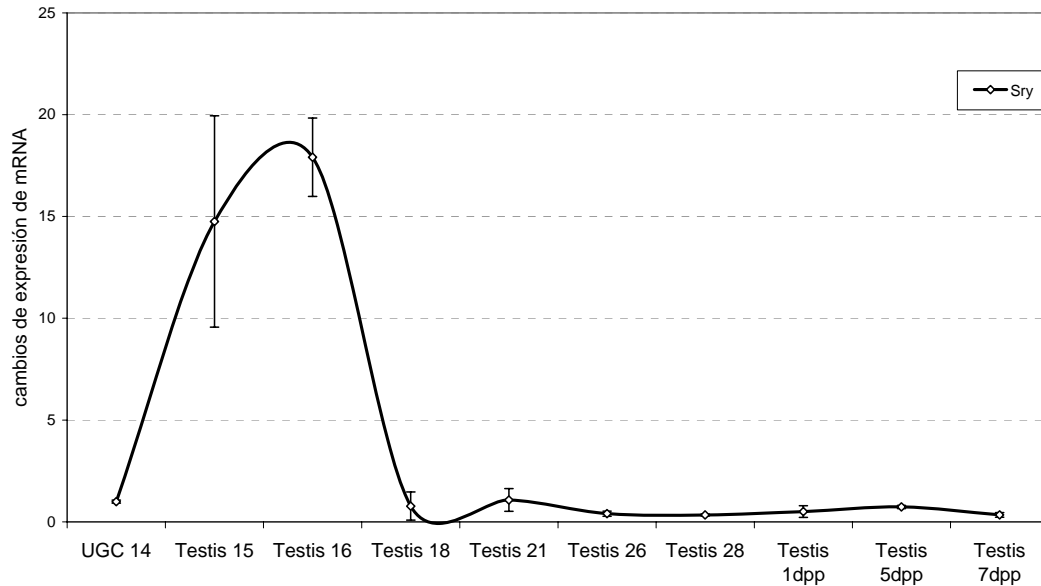


Figura 14. Patrón de expresión de *SRY* en crestas genitales (UGC) y gónadas de conejo macho. Se observa un aumento de la expresión de *SRY* a los 15-16 dpc, lo cual coincide con la diferenciación morfológica del testículo. Las barras de error indican la desviación estándar (d.s.).

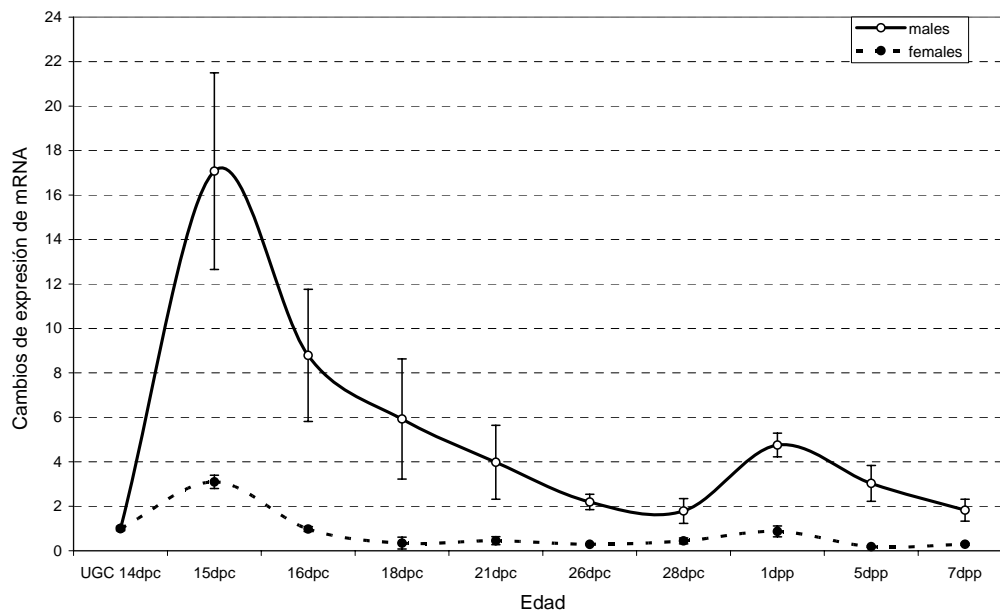


Figura 15. Patrón de expresión de *SOX9* en crestas genitales y gónadas de macho (línea) y hembra (punteado). Las barras de error indican d.s.

*Localización de SRY y SOX9 dentro de los cordones seminíferos
(Hibridación in situ)*

La expresión de *SRY* y *SOX9* fue analizada por dos técnicas complementarias de hibridación *in situ*: en montaje completo (mcHIS) y en cortes por congelación (cgHIS). Se emplearon sondas antisentido y sentido para *SRY* y *SOX9* con un tamaño de 202 y 306 pb, respectivamente. Las gónadas de macho hibridadas con la sonda sentido se utilizaron como controles negativos. Como controles negativos de *SRY* se emplearon crestas genitales de hembra de 13 dpc hibridadas con la respectiva sonda antisentido, con la cual no se detectó la señal colorida que revela la expresión del gen en el tejido. En las crestas genitales de macho de 13 dpc, el revelado de color, fue evidente en el tercio central de la cresta genital, mientras que los tercios anterior (craneal) y posterior (caudal), parecen débilmente marcados (Figura 16A). Como se observó en el estudio morfológico de las muestras incluidas en plástico, a los 13 dpc, las crestas genitales de conejo están formadas por unas cuantas capas de células engrosando el epitelio celómico a lo largo de la incipiente cresta genital. Encontrar la expresión de *SRY* en etapas tan tempranas, pone en duda la existencia de una etapa de gónada indiferenciada a nivel molecular en el conejo. A los 14 dpc, la reacción positiva de *SRY* aparece incrementada en intensidad y extensión en la parte central de la cresta genital, sin embargo, tanto los extremos anterior como posterior permanecen sin reacción (Figura 16B). La hibridación *in situ* en cortes por congelación a los 14 dpc muestra que las células positivas a *SRY* son células adosadas al epitelio celómico proliferativo del cual provienen (Figura 17A,B).

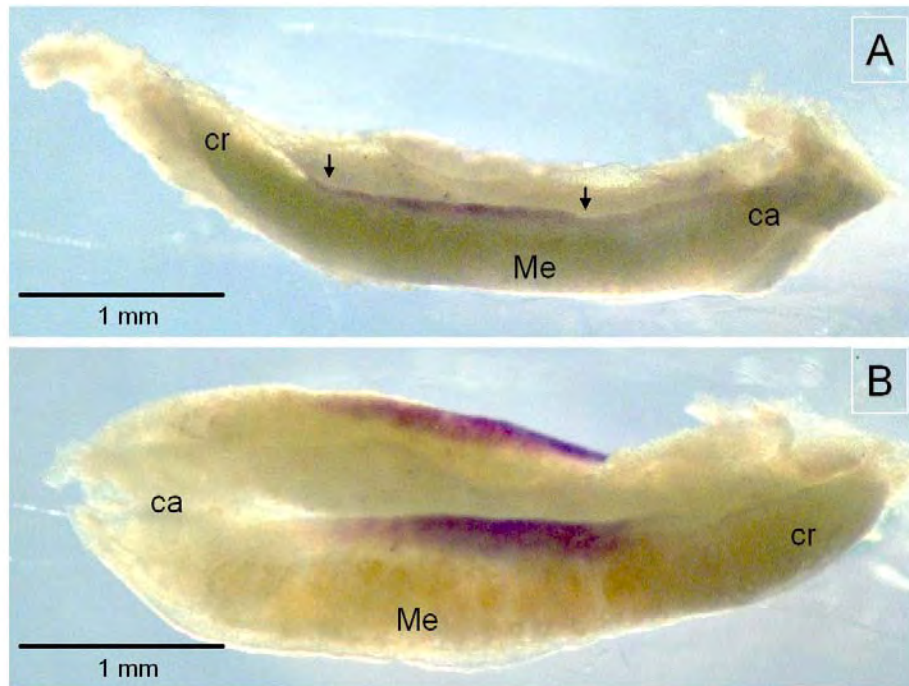


Figura 16. Hibridación en montaje completo (mCHIS) de *SRY* en complejos urogenitales de conejo antes de la diferenciación sexual histológica. **A** En el día 13 pc la delgada cresta genital se extiende desde el extremo caudal (ca) hacia el extremo craneal (cr) a lo largo de los mesonefros (Me). La expresión de *SRY* es detectada en el tercio central de la cresta genital (flechas). **B** Muestra la expresión de *SRY* en un par de complejos urogenitales de 14 dpc. La expresión cubre un área mayor a lo ancho de la cresta genital, sin embargo; la expresión a lo largo es similar a la observada en las crestas genitales de 13 dpc.

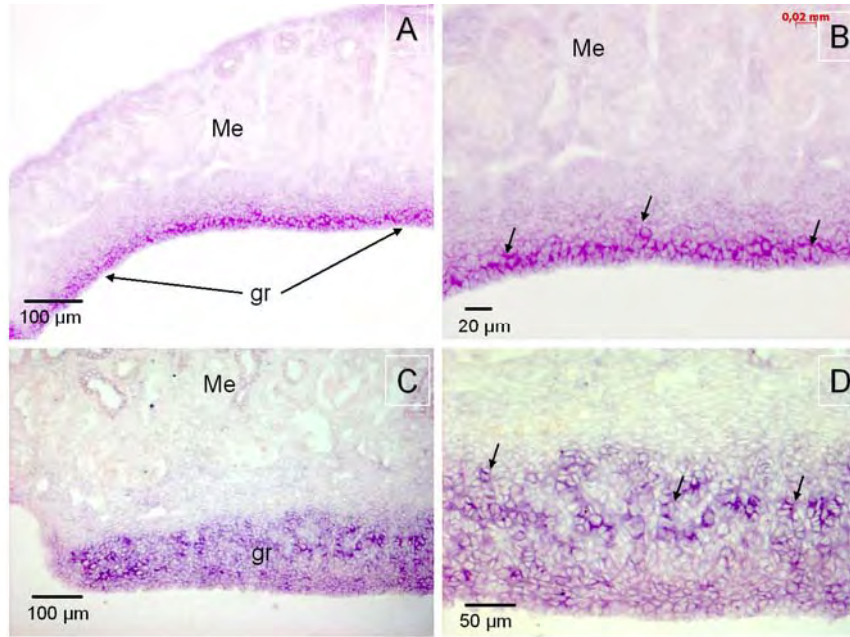


Figura 17. Expresión de *SRY* en cortes por congelación (cgHIS) de crestas urogenitales antes del inicio de la diferenciación histológica del testículo. **A** Baja amplificación mostrando la expresión de *SRY* a lo largo del epitelio celómico (flechas) en un complejo urogenital de 14dpc. **B** Amplificación de una pequeña área del corte correspondiente a la Fig. A. Se indican detalles celulares del depósito coloreado de expresión de *SRY* en las células subyacentes al epitelio celómico (flechas). El mesonefros (Me) aparece en la parte superior de las dos figuras. **C** Parte de un complejo urogenital de 15 dpc muestra la reacción positiva de *SRY* en la región que ocupa la cresta genital al inicio de la diferenciación morfológica del testículo. **D** Amplificación que permite observar la expresión de *SRY* en la red epitelial precursora de los cordones seminíferos (flechas).

Aunque la diferenciación morfológica de las gónadas de macho fue evidente a nivel histológico desde los 15 dpc (Figura11), la distinción externa entre gónadas de macho y hembra no fue posible al inicio de la diferenciación histológica en el conejo (Figura 18A). Esta es una distinción importante a lo observado en el ratón, donde el dimorfismo sexual en términos de tamaño y forma de la gónada, coinciden con la diferenciación histológica.

Complejos urogenitales procesados para mchIS mostraron una tinción heterogénea a lo largo de la cresta genital de 15 dpc. Se puso en evidencia un gradiente de densidad, siendo más denso en el extremo caudal y débil hacia el

extremo craneal de la cresta genital (Figuras. 18A y B). Este resultado puede indicar que el aumento de expresión de *SRY* detectado por PCR en tiempo real no ocurre por igual a lo largo de la cresta genital. La diferencia regional observada guarda relación con la diferenciación de los cordones seminíferos observada en el estudio histológico. Hay que mencionar, que la distribución regional de la expresión de *SRY* no fue idéntica entre embriones de la misma camada. Lo cual puede explicarse por la conocida asincronía relativa entre embriones debido a diferencias en el momento de la fertilización e implantación.

Empleando la técnica de cgHIS se encontró que las células que expresan *SRY* corresponden primero a las células que engrosan el epitelio celómico y posteriormente son las que organizan la red epitelial precursora de los cordones seminíferos (Figura 17). En contraste con la técnica de mcHIS, en la que no fue posible detectar transcritos de *SRY* de los 18 dpc en adelante, los transcritos de *SRY* fueron débilmente detectados en los cordones seminíferos a los 18dpc y 1dpp mediante cgHIS (Figuras 19A y B). Estos resultados indican que la técnica de cgHIS tiene mayor sensibilidad que la mcHIS y apoyan los actuales resultados obtenidos por PCR en tiempo real.

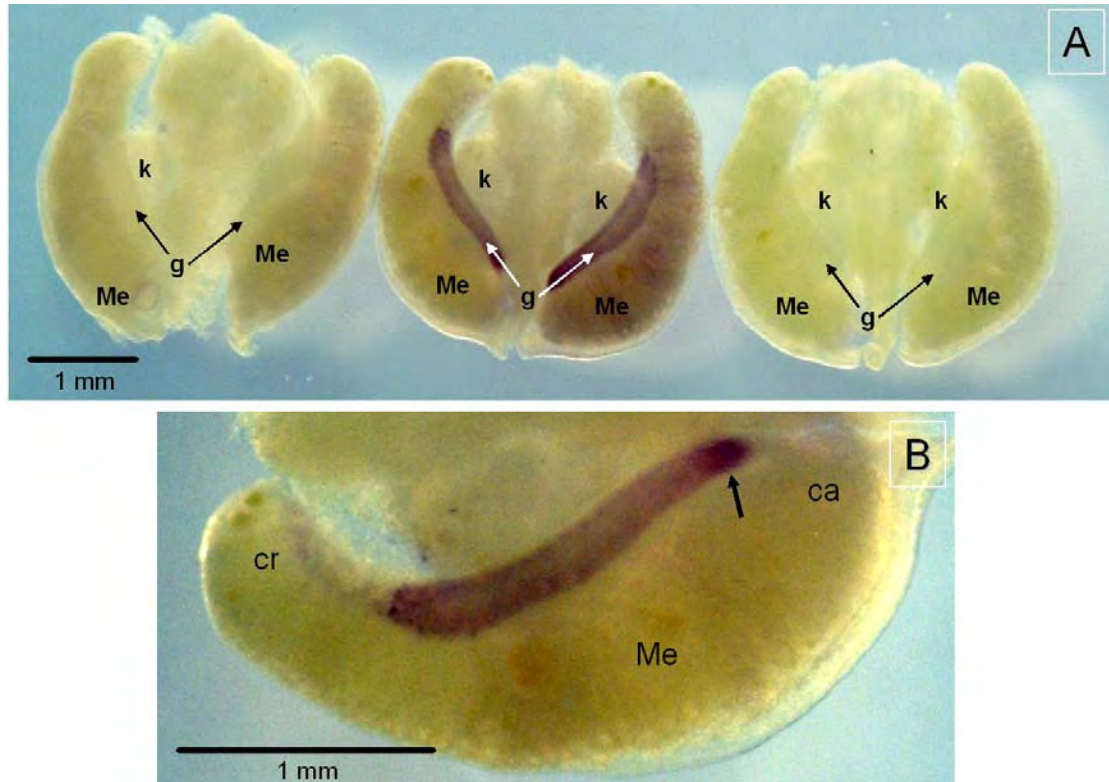


Figura 18. Complejos urogenitales de conejo de 15 dpc. **A** Las sondas sentido y antisentido de *SRY* fueron utilizadas para las hibridaciones *in situ* en los complejos urogenitales completos (mCHIS): izquierda, macho sentido, al centro macho antisentido y a la derecha hembra antisentido. **B** Amplificación de la cresta urogenital mostrada en la Fig. A. *SRY* presenta un patrón de expresión con mayor densidad en el extremo caudal (ca) (flecha) y ausente en el extremo craneal (cr). Mesonefros (Me), metanefros (k), gónada (g).

Por otro lado, una débil tinción positiva para *SOX9* fue observada en ambos sexos a los 13 dpc por mCHIS (Figura 20A). Un día después, a los 14 dpc, se reveló una fuerte reacción positiva para *SOX9* en las crestas genitales del macho en tanto que en la hembra la señal se mantuvo débil (Figura 20 B y C). Con la técnica de cgHIS se puso en evidencia que la débil reacción de *SOX9* en las hembras de 14 y 15 dpc, corresponde a las células de la cresta genital indiferenciada (Figuras 20 D y E).

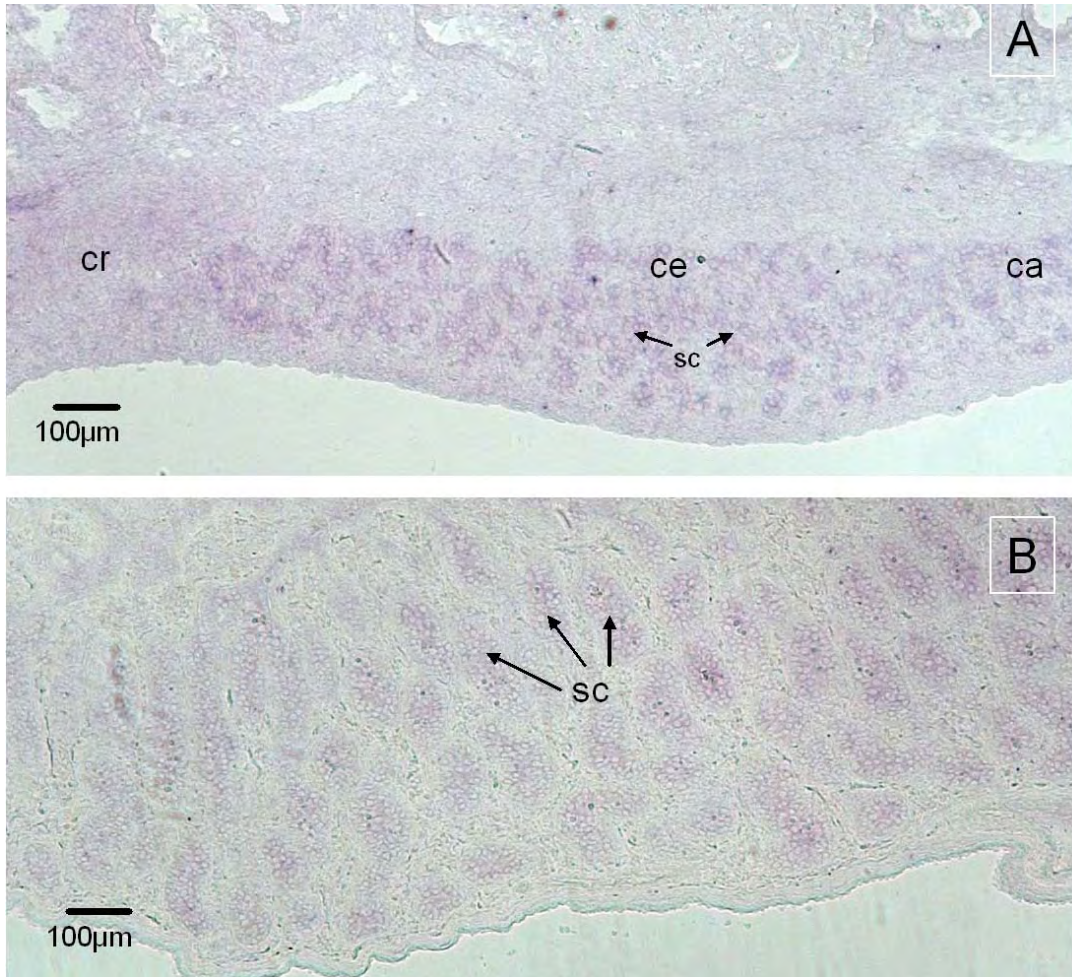


Figura 19. Expresión de *SRY* en cortes longitudinales de testículos. **A** A los 18 dpc una débil pero detectable expresión de *SRY* se aprecia en los cordones seminíferos (cs) en los tercios caudal (ca) y central (ce) del testículo. Sin embargo la detección es negativa en la red epitelial de la región craneal (cr). **B** Corte de testículo de un conejo recién nacido (1 dpp) donde todavía es detectable la expresión de *SRY* en los cordones seminíferos (cs).

A los 15 dpc la mCHIS puso en evidencia la elevada densidad de la expresión del *SOX9* en los machos, en tanto que en las hembras dicha expresión fue apenas detectable (Figuras 21A-C). Una cuidadosa observación mostró un patrón de distribución de la expresión de *SOX9* a lo largo y ancho de la cresta genital. El extremo caudal fue el de mayor densidad y el craneal apareció con poca densidad. En vista lateral, en uno de los lados la tinción cubrió casi todo el espesor en tanto que en el lado opuesto, la mitad del espesor no estuvo teñida (Figuras 21B y C). Con la técnica de cgHIS se puso en evidencia que las células

SOX9 positivas están en los cordones seminíferos y que en la región craneal las formaciones epiteliales preceden a la elevación de la expresión del SOX9 (Figuras 21D y E).

Tres días después del inicio de la diferenciación morfológica, a los 18 dpc, las gónadas de ambos sexos, permanecieron similares en su apariencia externa (Figura 22A) por lo que no fue posible identificarlas sin recurrir al sexado por PCR. Los ovarios mantienen la leve tinción de SOX9 detectada desde los 14 dpc en tanto que en los testículos de 18 dpc el proceso de formación regional de los cordones seminíferos fue enfatizado por el patrón de expresión del SOX9 en términos de la densidad local de la tinción. El tercio caudal y parte del central muestran la mayor densidad, en tanto que la otra parte del tercio central y el extremo craneal mostraron poca densidad (Figura 22B). Existe correlación con la formación de los cordones seminíferos ya que de acuerdo con las observaciones histológicas, la formación de los cordones seminíferos continúa hasta los 18 dpc en las regiones de menor expresión de SOX9. Los cordones seminíferos diferenciados (con una envoltura formada por la membrana basal y células miodes) están en el extremo caudal y la parte central-ventral, mientras que en el tercio central del lado mesonéfrico los cordones seminíferos continúan creciendo por el reclutamiento de células probablemente originadas en las cápsulas de Bowman. La mayor resolución brindada por la técnica de cglISH apoya esta interpretación (Figuras 23A-C).

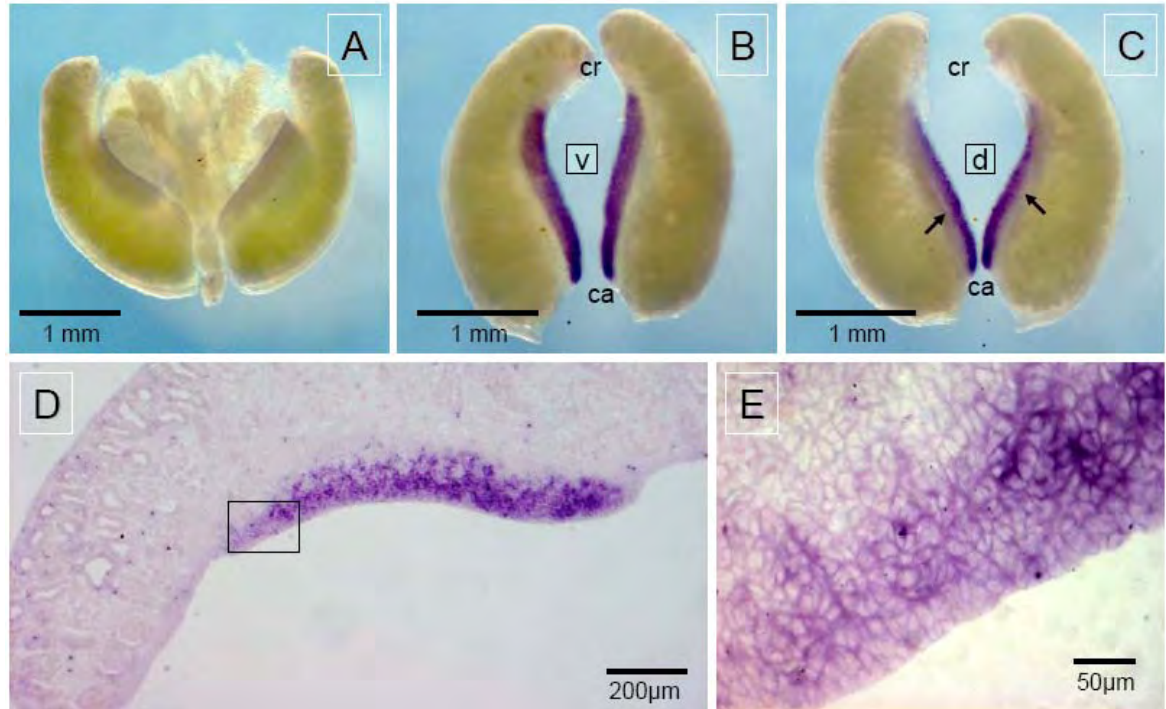


Figura 20. Expresión de SOX9 en gónadas de 15 dpc. **A** Par de complejos urogenitales de hembra (gr) donde se aprecia una tenue tinción con la sonda antisentido de SOX9. **B** y **C** muestran el mismo par de complejos urogenitales de macho en colocados en posiciones ventral (v) y dorsal (d). La tinción que revela la expresión del SOX9 tiene un patrón de distribución regional. La mayor densidad está en el extremo caudal (ca) y la menor en el extremo craneal (cr). En **C** es evidente que la mitad del espesor de la gónada todavía no expresa SOX9 (flechas). **D** Crio-sección de una cresta urogenital donde se muestra una mayor densidad en la región craneal, mientras que en la región caudal (recuadro) se observa una menor densidad. **E** Amplificación de la región caudal mostrada en D.

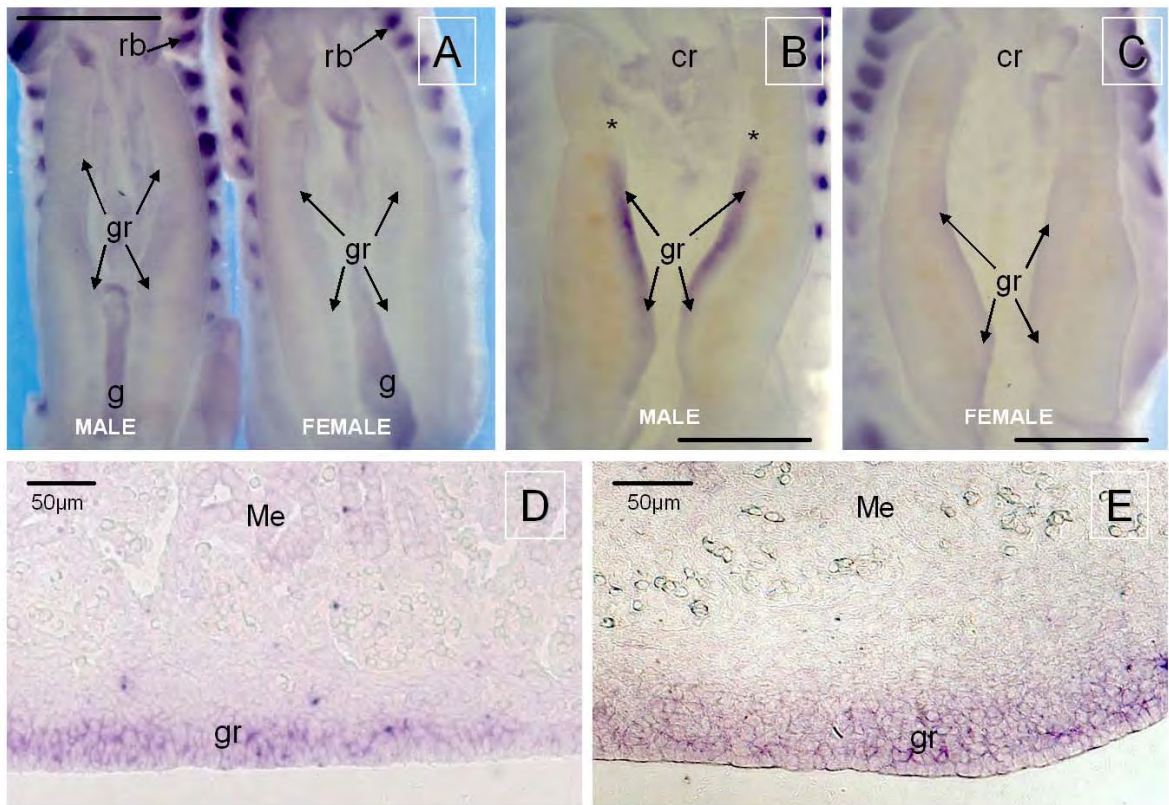


Figura 21. Expresión de SOX9 en embriones de conejo a los 13 y 14 dpc. **A** Detección de SOX9 en regiones caudales de macho (izquierda) y hembra (derecha) de 13 dpc. Mientras las crestas genitales (gr) en ambos sexos están ligeramente marcadas, los remanentes del intestino (g) y costillas (rb), presentan una marca intensa. **B** Embrión macho de 14 dpc, SOX9 se expresa fuertemente en los tercios central y caudal de las crestas genitales (gr) sin embargo, está ausente en el tercio craneal (*). Barra= 1 mm **C** SOX9 es apenas detectado en las crestas genitales de hembra (gr) a los 14 dpc. Barra = 1 mm. **D** y **E** Muestran la débil expresión de SOX9 en crestas genitales (gr) en cortes de embriones de 14 y 15 dpc, respectivamente. El mesonefros (Me) ocupa la mayor parte de la cresta urogenital.

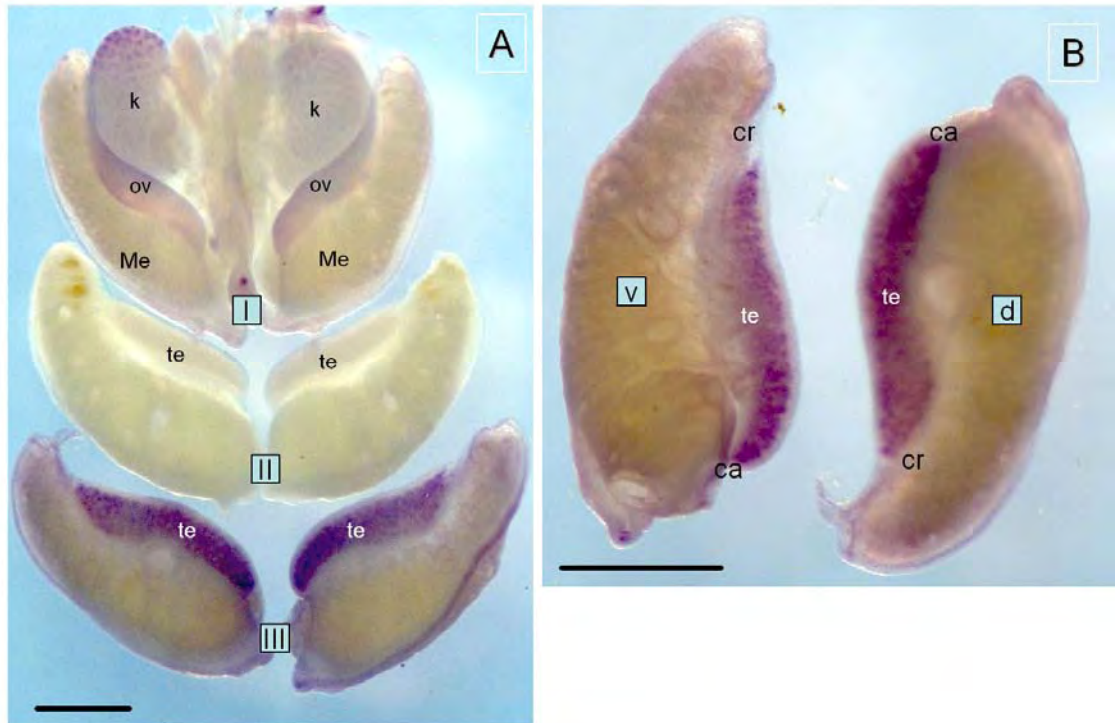


Figura 22. Detección de la expresión de SOX9 en complejos urogenitales de embriones de conejo de 18dpc. **A I)** Hibridación en montaje completo con sonda SOX9 antisentido. Ligera detección de SOX9 en los ovarios (ov) y parte del riñón (k). **II)** Complejo urogenital de macho hibridado con sonda sentido, no hay ninguna tinción demostrando la especificidad del método de hibridación empleado. **III)** Complejo urogenital de macho, hibridado con sonda antisentido. El testículo aparece fuertemente marcado. **B** Mayor amplificación de los dos complejos urogenitales mostrados en III de la Figura A. SOX9 muestra un gradiente de intensidad de marcaje que se observa en vistas ventral (v) y dorsal (d) de los testículos: mayor densidad en el extremo caudal (ca) y más tenue en el extremo craneal (cr), lo cual corresponde a cordones seminíferos más y menos diferenciados, respectivamente. Mesonefros (Me). Barra en A y B= 1mm.

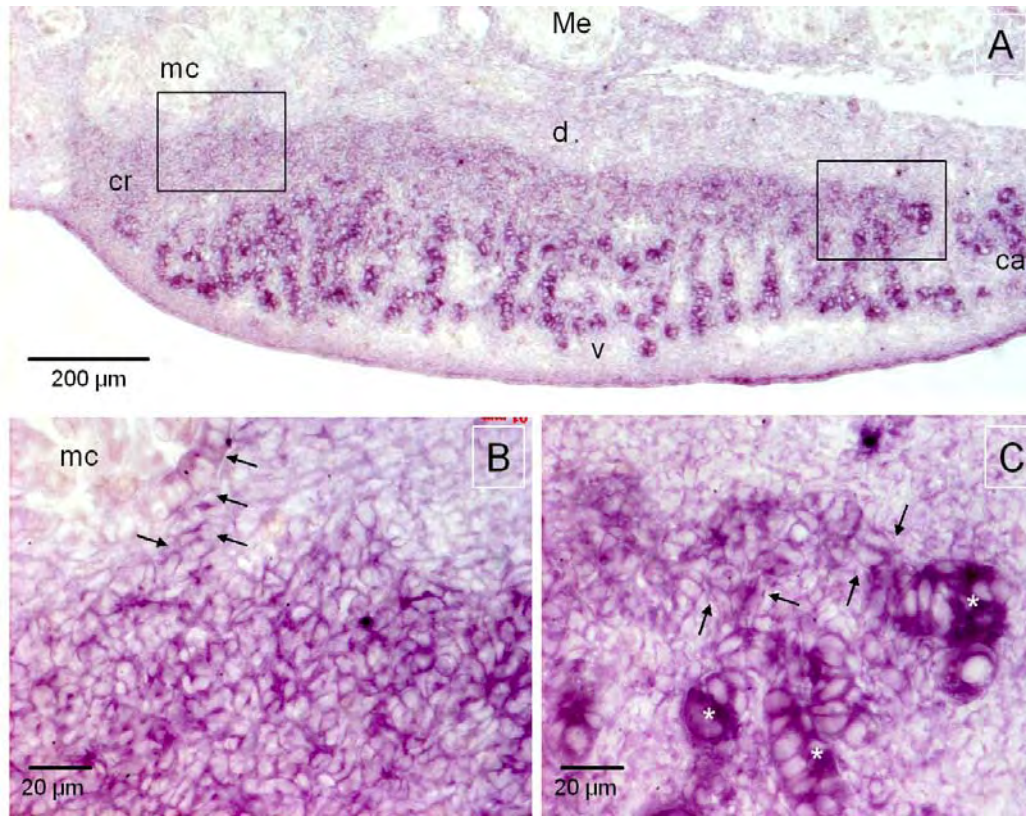


Figura 23. Expresión de SOX9 en cortes por congelación de testículos de conejo de 18dpc. **A** Corte longitudinal que muestra una elevada densidad de la marca de SOX9 en los cordones seminíferos localizados en las regiones caudal (ca) y ventral (v) del testículo. En la región dorsal (d) del mesonefros (Me) y el extremo craneal (cr), las células de la red epitelial muestran una tinción difusa de menor densidad. **B** Mayor amplificación del área marcada en el rectángulo izquierdo de la figura A, muestra parte del corpúsculo mesonéfrico (mc) relacionado con las células en condensación de la red epitelial en el extremo craneal del testículo (flechas). **C** Esta figura corresponde al área delimitada en el rectángulo derecho de la figura A. Las células de los cordones seminíferos diferenciados muestran una fuerte tinción con la sonda antisentido SOX9 (*) están en continuidad con células de la red epitelial menos marcada (flechas).

Inmunolocalización de SOX9 y AMH en los cordones seminíferos

La proteína SOX9 fue detectada por inmunofluorescencia en cortes por congelación a los 14 dpc en las gónadas de los machos. Con el anticuerpo utilizado la señal que revela la presencia de la proteína fue débilmente detectada en la cresta genital (datos no mostrados). Sin embargo, a los 15 dpc, la presencia de SOX9 fue evidente en la células de la red epitelial precursora de los cordones seminíferos (Figura 24A). A nivel celular la distribución de la proteína SOX9 mostró una tendencia a concentrarse en el núcleo de las células (Figura 24A inserción). Por otra parte, la producción de la hormona antimulleriana (AMH) usada como marcador de diferenciación de las células de Sertoli, fue detectada simultáneamente a la proteína SOX9 en los red epitelial (Figura. 24B). Como era de esperarse por tratarse de un factor destinado a ser secretado, AMH fue localizado en el citoplasma de las células de Sertoli (Figura 24B inserción).

A los 18 dpc, la proteína SOX9 apareció claramente concentrada en los núcleos de las células de los cordones seminíferos emergiendo de la red epitelial (Figura 25A). En la región craneal sin embargo, la ubicación de SOX9 fue todavía difusa sin localización nuclear en las células derivadas de los corpúsculos mesonéfricos (Figura 25B). La AMH fue detectada en los cordones seminíferos correspondientes a las regiones donde las células de Sertoli concentraron SOX9 en sus núcleos (Figura 25C).

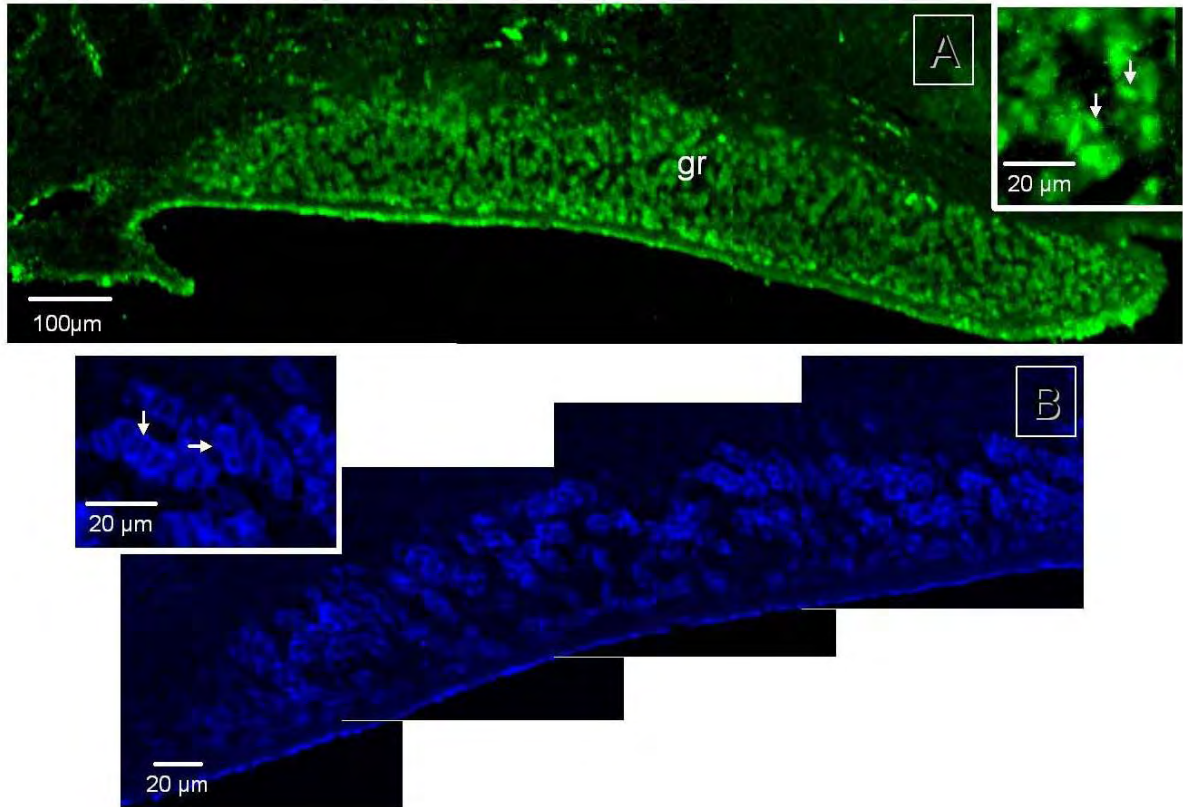


Figura 24. Detección de las proteínas SOX9 y AMH por inmunofluorescencia en cortes por congelación de complejos urogenitales de 15 dpc. **A** El anticuerpo contra SOX9 se localiza en la red epitelial a lo largo de la cresta genital (gr). Se observa un marcaje inespecífico sobre la superficie del epitelio. La inserción muestra que SOX9 está concentrado en el núcleo de las células epiteliales (flechas). **B** El anticuerpo contra AMH se localiza en las células de Sertoli diferenciadas, emergiendo de la cadena epitelial. El inserto muestra la localización citoplásmica de AMH en las células de la red epitelial (flechas).

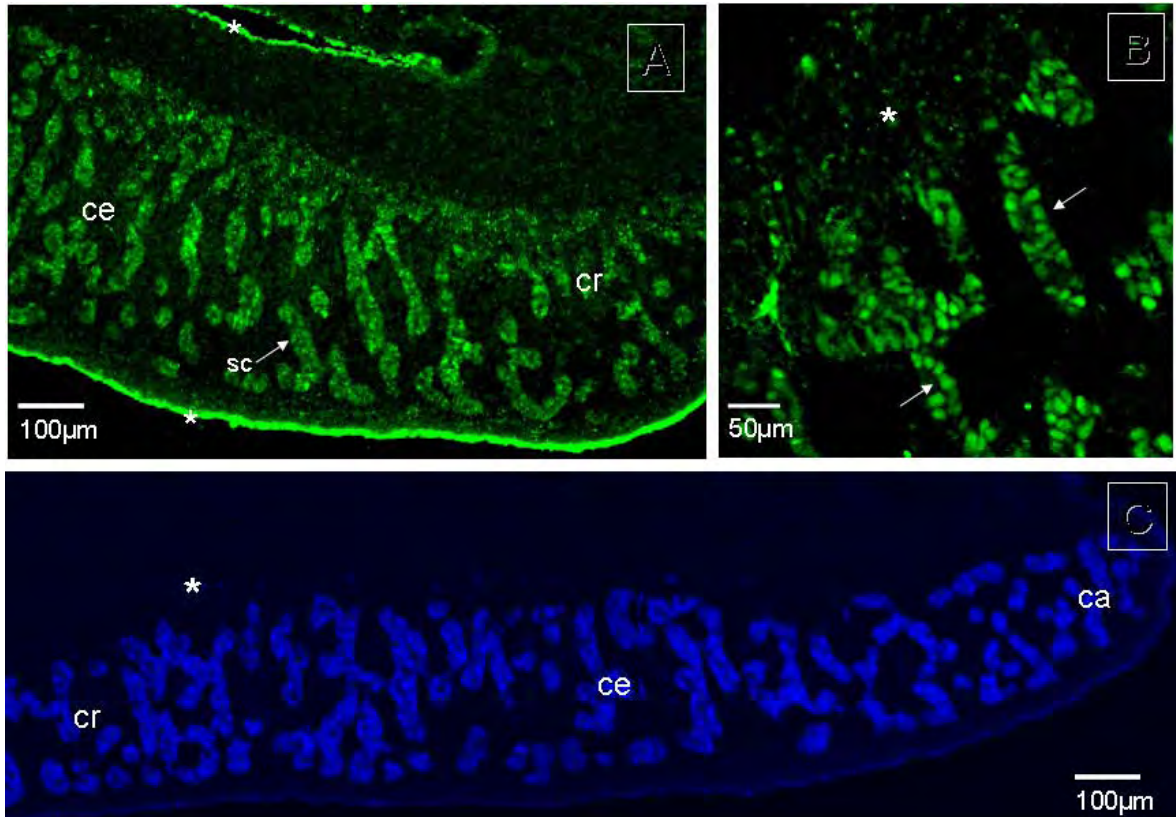


Figura 25. Inmunofluorescencia de SOX9 y AMH en cortes de testículo de conejo a los 18 dpc. **A** Corte longitudinal que muestra parte del tercio central (ce) y extremo craneal (cr) de la cresta genital. La inmunolocalización de SOX9 se ubica dentro de los cordones seminíferos (sc). La tinción en el borde del tejido es inespecífica. **B** Mayor amplificación mostrando el marcaje de SOX9 en el núcleo de las células de los cordones seminíferos diferenciados (flechas). La distribución de la tinción de SOX9 parece difusa en la red epitelial ubicada en el lado vecino al mesonéfros, donde los cordones seminíferos aún no están organizados (*). **C** Corte longitudinal que muestra la expresión de AMH dentro de los cordones seminíferos (sc). Observar, que AMH no se detecta todavía en el área dorsal (mesonéfrica) (*).

El ciclo celular de las células germinales XX y XY

Para determinar la entrada en arresto mitótico de las espermatogonias y la división premeiótica de las ovogonias, observamos la dinámica de proliferación mediante la incorporación de BrdU durante la fase S del ciclo celular. Las células germinales fueron distinguidas de las somáticas por la

actividad de la fosfatasa alcalina (Chiquone 1954). Sin embargo, en el presente estudio empleamos una técnica más reciente (Cox and Singer, 1999.)

Las células germinales de testículos y ovarios de 30 dpc y recién nacidos (31dpp) incorporan BrdU. En ambas edades, la incorporación de BrdU es observada también en células somáticas dentro y fuera de los cordones seminíferos y ovígeros de testículos y ovarios, respectivamente (Figuras 26 A-F). Las células germinales que incorporan BrdU se presentan en grupos distribuidos de manera azarosa sin una distribución regional anteroposterior tanto en testículos como en ovarios. Se observa una notoria disminución de la incorporación de BrdU en las espermatogonias en los testículos de 1dpp (Figuras A-C). Sin embargo, la incorporación de BrdU en los ovarios de 1dpp muestra un patrón semejante al de los 30 y 31dpc (Figuras 26 D-F).

Aunque la incorporación de BrdU en las células somáticas dentro y fuera de los cordones testiculares es evidente a los 10 dpp, las espermatogonias dejan de hacerlo, indicando que se encuentran en arresto mitótico (Figuras 27A y B).

Por otra parte, en los ovarios de 10 dpp es posible todavía detectar grupos de ovogonias marcadas con BrdU tanto en la región de la corteza como de la médula. Es importante señalar que en esta edad una gran proporción de células germinales han abolido la actividad de fosfatasa alcalina (Figura. 27 B).

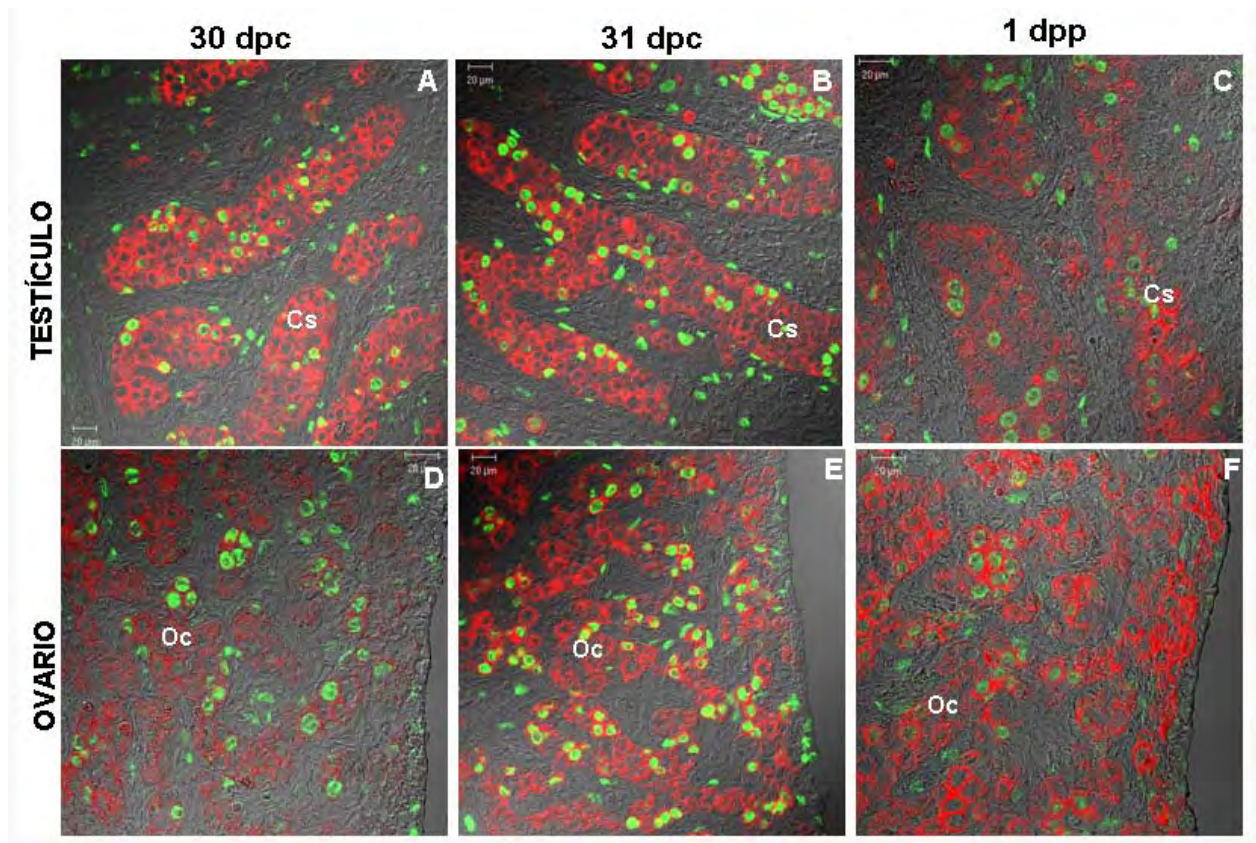


Figura 26. Inmunofluorescencia de BrdU (verde) en células germinales y somáticas y reacción de fosfatasa alcalina (rojo) en células germinales de testículos y ovarios en la etapa perinatal. **A, B y C** muestran los cordones seminíferos (Cs). **D, E y F** muestran la incorporación de BrdU en los cordones ovígeros (Oc).

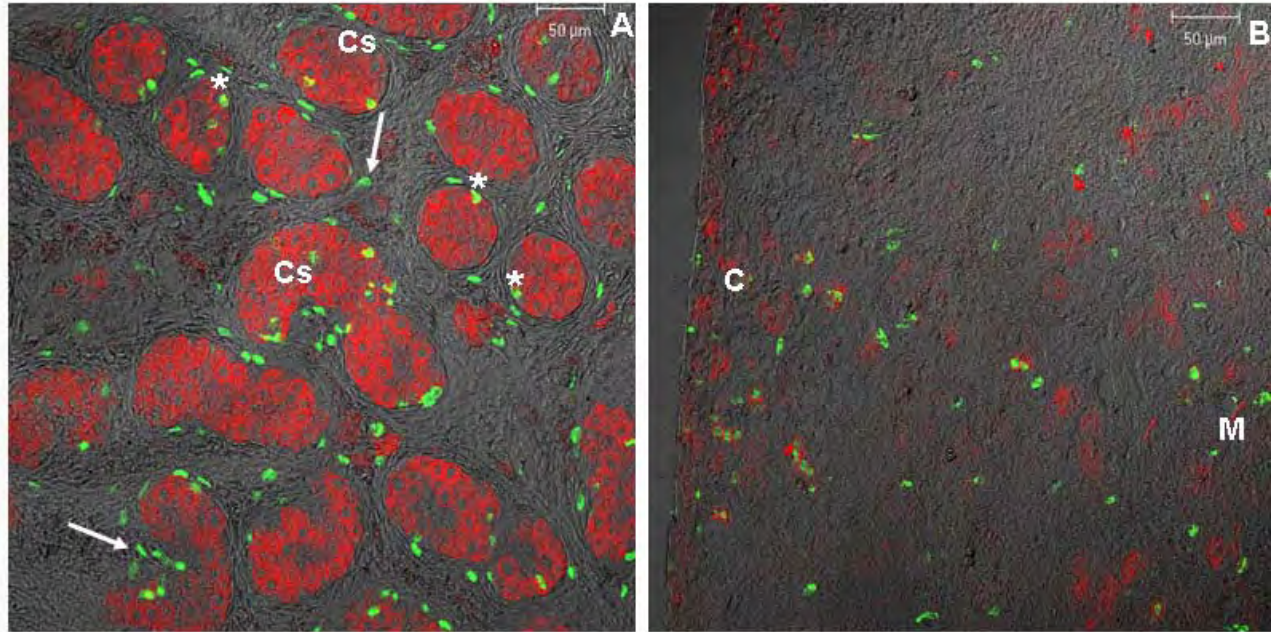


Figura 27. Inmunofluorescencia de BrdU (verde) y reacción de fosfatasa alcalina (rojo) en testículos y ovarios a los 10dpp. **A** La reacción de fosfatasa alcalina es evidente en las espermatogonias dentro de los cordones seminíferos (Cs). Los asteriscos muestran algunos núcleos BrdU positivos dentro de los cordones seminíferos, pero que no corresponden a células germinales al ser células negativas a la fosfatasa alcalina. La flecha muestra células somáticas positivas para BrdU fuera de los cordones seminíferos. **B** En los ovarios los grupos de células germinales positivas a la fosfatasa alcalina son ya muy pocos. Algunos de ellos aún incorporan BrdU y están distribuidas cerca de la corteza (C) y en la región médular (M).

Expresión del Aldh1a2 y Cyp26b1 en gónadas de conejo posnatal

Los fragmentos de *Aldh1a2* (650pb), *Cyp26b1* (660pb), y *Scp3* (600pb) obtenidos para conejo, muestran los siguientes porcentajes de homología con otras especies de mamífero:

Aldh1a2: *Macaca fascicularis* 95%, *Homo sapiens* 94%, *Canis familiaris* 92%, *Bos taurus* 91% .

Cyp26b1 : *Homo sapiens* 93%, *Canis familiaris* 91% y *Mus musculus* 88%.

Scp2: *Homo sapiens* 90% *Macaca fascicularis* 90% *Canis familiaris* 88% *Rattus norvegicus* 87%.

Los transcritos de *Aldh1a2* y *Cyp26b1* se detectan en las gónadas de ambos sexos en todas las edades analizadas (Figuras 28 y 29). Sin embargo, la menor intensidad de las bandas de *Cyp26b1* sugiere niveles menores de expresión en los ovarios (Figuras 28 y 29). La expresión de los transcritos de *Scp2* se expresa tanto en ovarios como en testículos de 1 y 5 dpp. Altos niveles de transcritos de *Scp2* fueron encontrados en ovarios de 1, 5 y 7 dpp en contraste con los bajos niveles detectados en los testículos de 1 y 5 dpp. A los 7dpp los niveles de expresión de *Scp2* es todavía más débil (Figuras 28 y 29).

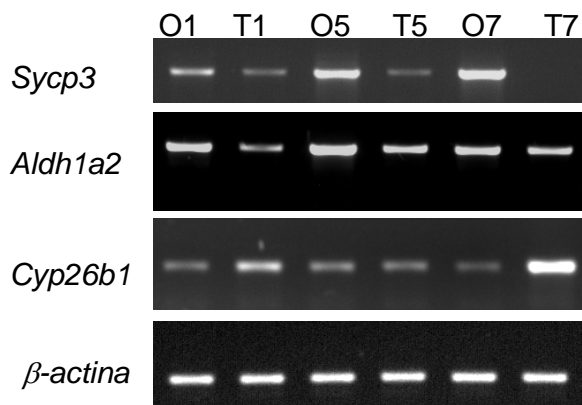


Figura 28. RT-PCR de *Scp3*, *Aldh1a2* y *Cyp26b1* en ovarios y testículos de 1,5 y 7 dpp. **A** Gel representativo de los productos de RT-PCR en un gel de agarosa. La amplificación de *Scp3* y *Aldh1a2* es evidente en ambos sexos, aunque con mayor expresión en los ovarios de las edades analizadas, a diferencia de *Cyp26b1* que presenta mayor expresión en los testículos. (O= ovario, T=testículo).

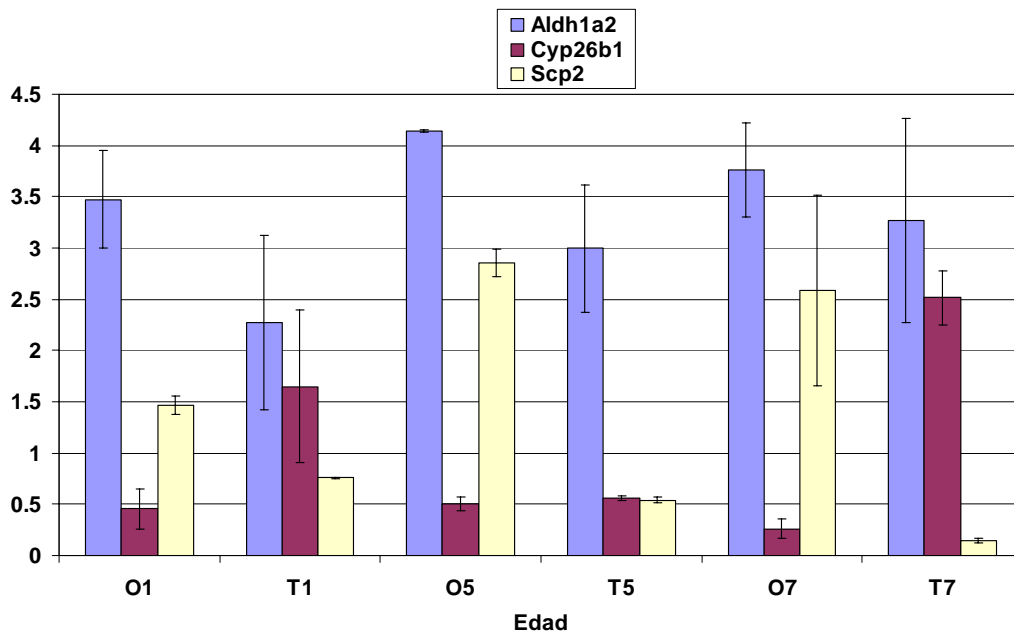


Figura 29. Representación gráfica de la tendencia de expresión de Scp3, Aldh1a2 y Cyp26b1. Las barras indican el promedio. Las barras de error indican la desviación estandar.

Con la técnica de hibridación in situ en cortes, se analizó la expresión de la *Aldh1a2* y *Cyp26b1* en ovarios de testículos de 7dpp. En el testículo, se observó una intensa expresión de *Aldh1a2* dentro de los cordones seminíferos y en los conductos epiteliales del epidídimo (Figura 30 B y C). En el caso del ovario, la expresión de *Aldh1a2* se detectó en los cordones ovígeros mostrando una mayor intensidad hacia la región cortical (Figura 30 A).

En cuanto a la expresión de *Cyp26b1* en los machos, se observó una fuerte expresión dentro de los cordones seminíferos (Figura 31 B), y a diferencia de *Aldh1a2* no se detectaron transcritos en el epidídimo (Figura 31 C). En el caso de los ovarios, la expresión de *Cyp26b1* en los cordones ovígeros mostró una menor intensidad con respecto a la observada en los cordones seminíferos del testículo (Figura 31A).

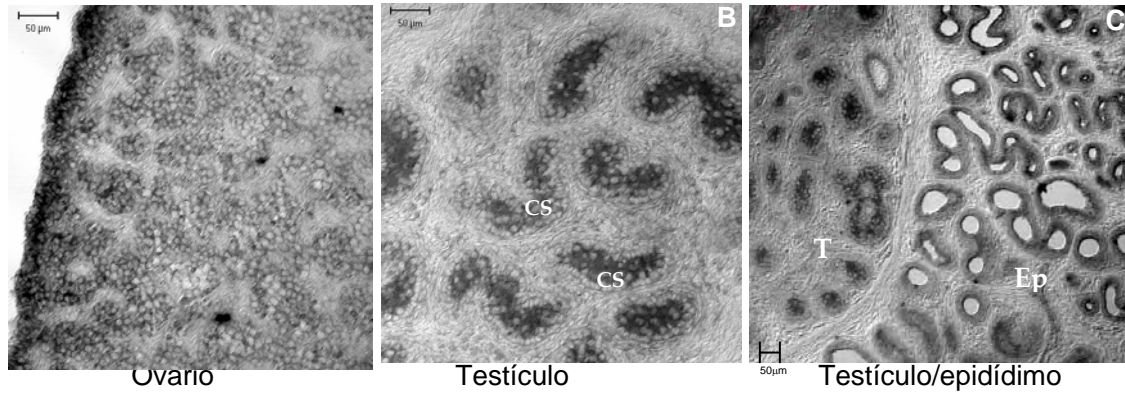


Figura 30. Expresión de *Aldh1a2* en criosecciones de ovario y testículo con epidídimo de 7dpp. **A.** Se observa la expresión en los cordones ovígeros del ovario con mayor intensidad en la corteza (flecha). **B.** En el testículo se observa una intensa expresión de *Alhd1a2* dentro de los cordones seminíferos. **C.** Muestra un menor aumento de parte del testículo (T) y el epidídimo (Ep).

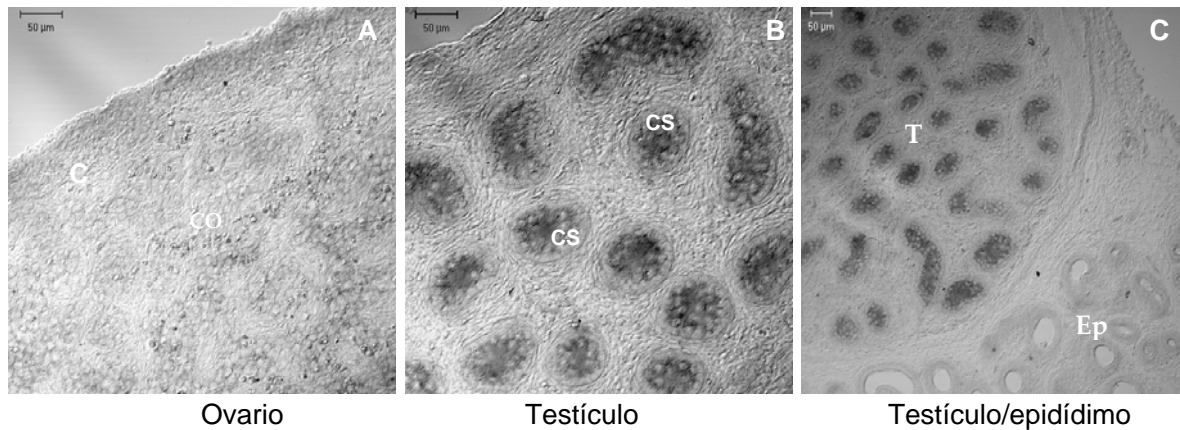


Figura 31. Expresión de *Cyp26b1* en ovario, testículo y epidídimo de 7dpp. **A.** Se observa una tenue expresión de *Cyp26b1* en los cordones ovígeros de la corteza del ovario. **B.** En los cordones seminíferos del testículo se observa una intensa expresión dentro de los cordones seminíferos (Cs), **C.** Menor amplificación mostrando la expresión de *Cyp26b1* en los cordones seminíferos del testículo (T) y su ausencia en el epidídimo (Ep).

DISCUSIÓN

Considerando que el desarrollo de los órganos embrionarios procede de acuerdo al concepto de heterocronía como proceso importante para la evolución biológica (Gould, 1977), resulta interesante correlacionar el momento en que se establece la cresta genital con la etapa de desarrollo del embrión. Es posible encontrar diferencias evolutivas relevantes comparando la correlación gónada-embrión entre diferentes especies de mamífero. En el presente estudio, los embriones de conejo fueron organizados de acuerdo a la tabla de desarrollo propuesta por Edwards (1968) y Butler y Juurlink (1987) y son referidas al humano como etapas Carnegie (CS por sus siglas en inglés). En la Figura 32 se muestran las etapas de desarrollo en las que se han reportado la expresión de *SRY* y *SOX9* en las gónadas fetales. Los actuales resultados en el conejo fueron comparados con humano, cerdo, oveja, perro y ratón. Es evidente que el perfil de expresión de *SRY/SOX9* del conejo es similar a las otras especies hasta ahora analizadas pero difiere del ratón. En tanto que el inicio de la expresión de *Sry/Sox9* en el ratón ocurre en las etapas CS 12-13, en las demás especies ocurre en las etapas CS 16-17. Aunque esta notable diferencia puede no ser relevante para el resultado final de la diferenciación sexual de la especie, su hallazgo enfatiza la singular posición embriológica y evolutiva del ratón como sistema modelo de la determinación sexual en los mamíferos.

La formación de los glomérulos mesonéfricos precede al desarrollo de la cresta urogenital en el conejo. En el ratón, el mesonefros es una estructura vestigial que no llega a ser funcional ya que el metanefros se desarrolla rápidamente. En contraste, en el conejo y en otras especies de mayor talla, el mesonefros es un órgano funcional durante la vida fetal. La condensación de células mesenquimáticas del complejo urogenital genera los túbulos mesonéfricos que a su vez se transforman en las unidades excretoras del riñón fetal. En el conejo, hay una estrecha relación entre las células epiteliales de los

corpúsculos renales craneales y las células del epitelio celómico. Desde el inicio de la formación de las crestas genitales a los 13 dpc hasta los 18 dpc se observa la agregación de células provenientes de las dos estructuras. A diferencia del ratón donde las células mesonéfricas que contribuyen a la diferenciación del testículo son de tipo estromático (vasos sanguíneos, fibroblastos y precursores de células miodes), en el conejo, la contribución de las células epiteliales derivadas de las cápsulas de Bowman mesonéfricas parece ser importante para la formación de los cordones seminíferos como sucede en el humano y la oveja. En estas dos especies, el tiempo requerido para la formación de los cordones seminíferos es más largo que en el ratón, debido al mayor tamaño de sus gónadas (Wartenberg, 1978; Zamboni and Upadhyay, 1982). La contribución de células epiteliales de las cápsulas de Bowman del mesonefros a la formación de los cordones seminíferos es evidente.

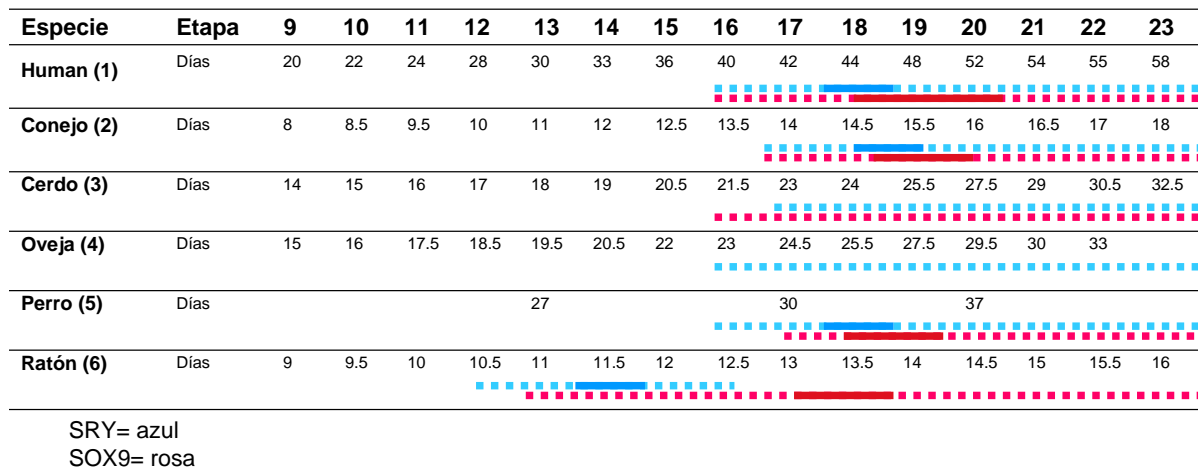


Figura 32. Comparación de las etapas Carnegie y patrones de expresión de *SRY/SOX9* en diferentes especies de mamíferos (O’Rally and Müller, 1987; Butler and Juurlink, 1987; Theiler, 1972). 1. Hibridación *in situ* (radioactiva), Hanley et al., 2000. 2. Presentes resultados. 3. Parma et al., 1999. 4. Payen et al., 1996. 5. Meyers-Wallen, 2003. 6. Hacker et al., 1995; Parma et al., 2006.

En embriones humanos la gónada morfológicamente indiferenciada se establece entre las semanas quinta y sexta de la gestación. En Micrografías

electrónicas es posible observar la degeneración de estructuras glomerulares y tubulares en regiones cercanas a la gónada que mantienen contacto con las células del blastema gonadal. Al parecer, estas células también contribuyen a la formación de los cordones testiculares aún después de la diferenciación morfológica testicular (Wartenberg, 1978). En la oveja, en el día 24 de gestación hay migración y colonización de células glomerulares hacia las crestas genitales donde se integran a los cordones seminíferos. El sistema epitelial de los conductos masculinos tiene una fuerte contribución del mesonefros fetal (Zamboni and Upadhyay, 1982).

Los presentes resultados sobre el conejo chinchilla confirman la descripción morfológica y ultraestructural de Wartenberg et al. (1991) quienes estudiaron el desarrollo de la gónada en el conejo blanco Nueva Zelanda. De manera, que no encontramos diferencias notables entre las dos razas de conejos. La distribución cronológica y topológica de las células de las crestas urogenitales, sugiere una continua transferencia de células del corpúsculo renal para la formación de los cordones seminíferos. En el ratón, el proceso de formación de los cordones seminíferos (proceso mediante el cual las células de preSertoli y las células germinales forman los cordones seminíferos) es muy rápido, en el conejo como en otras especies (incluyendo al humano), el proceso de formación de los cordones seminíferos se extiende por un largo periodo.

La cresta genital del conejo inicia su formación a los 13 dpc correspondiendo a la etapa 16 CS y un día después aumenta su espesor manteniéndose indiferenciada (Wartenberg et al., 1991 y el presente estudio). Los actuales resultados de hibridación *in situ* muestran que *SRY* y *SOX9* inician su expresión de manera simultánea al establecimiento de la cresta genital. La expresión de *SOX9* en las crestas de ambos sexos, sugiere que el *SRY* regula directa o indirectamente la elevación de los niveles de *SOX9* en los machos como se ha propuesto en el ratón. Resulta interesante que en las dos especies, el tiempo requerido para el establecimiento de la cresta genital es de alrededor de 48h, durante el cual la expresión de *SRY* indica que se ha llevado a cabo la

determinación sexual. Sin embargo, los actuales patrones de expresión de *SRY* y *SOX9* detectados por PCR en tiempo real en el conejo difieren del ratón. En el ratón los niveles de *SRY* son más altos a los 11.5 dpc, antes de la diferenciación testicular, en tanto que los actuales resultados en el conejo indican el máximo nivel a los 15 dpc cuando ya se ha iniciado la diferenciación de los cordones seminíferos. No obstante; se debe considerar que los niveles reales de expresión de *SRY* a los 14 dpc, pudieran ser más altos, que los mostrados en el perfil actual de expresión. La presencia del RNA del mesonefros cuyo tamaño es al menos 10 veces mayor que la gónada, pudo haber interferido en la medición al diluir el RNA gonadal en relación al RNA total extraído de las gónadas aisladas.

En el ratón, el aumento de expresión de *Sox9* coincide con la regulación negativa de *Sry*. Ya que en las gónadas de ratón *Sox9*^{-/-}, el *Sry* persiste, los resultados indican que *Sox9* puede estar involucrado en el decremento de expresión de *Sry* (Barrionuevo et al., 2006; Chaboissier et al., 2004). Sin embargo, en humano (Hanley et al., 2000), oveja (Payen et al., 1996), cerdo (Daneau et al., 1996; Parma et al. 1999), perro (Meyers-Wallen, 2002) y como lo muestran los presentes resultados en conejo, la expresión de *Sry* no se abate abruptamente como en el ratón (Hacker et al., 1995; Koopman et al., 1990).

Probablemente, existan variaciones entre especies con respecto a los factores involucrados en la retroactivación del promotor de *Sry* y en sitios críticos para la función del gen. En el *SOX9*, un probable sitio de unión a *SRY* en la región flanqueante 5' se encuentra ausente en ratón, pero está conservado en humano, bovino y cerdo (Daneau et al., 2002). Además, la región 3' no traducida del *Sry*, es importante para dirigir la expresión correcta de genes reporteros en ratón (Albrecht and Eicher, 2001; Sekido et al., 2004). Esta secuencia es considerablemente más corta en humanos, donde el *SRY* continúa expresándose después de la determinación sexual gonadal (Hanley et al. 2000). Además, la variación existente entre mamíferos puede estar relacionada en términos de la regulación del promotor de *SRY*. Daneau y cols. (2002) sugieren

que en contraste con el ratón, en el cerdo, *SOX9* puede contribuir en la regulación de la expresión de *SRY* por un proceso de retroactivación en las células preSertoli. El patrón de expresión de *SRY/SOX9* encontrado en el presente estudio es consistente con esta idea.

La regulación positiva inicial de la expresión de *Sox9* en el ratón es regulada por *Sry/Sf1* activando *TESCO* en las células de preSertoli del ratón. Después, se ha propuesto que el mantenimiento de la expresión de *Sox9* depende de la acción continua de *Wt1* y *Sf1* en las células de Sertoli (Gao et al., 2006; Sekido y Lovell-Badge, 2008). La expresión de *Amh* es concomitante al inicio de la formación de los cordones seminíferos en el ratón (Morais da Silva et al., 1996; Munsterberg and Lovell-Badge, 1991). Los presentes resultados indican que la expresión de *AMH* a los 15 dpc en el conejo también coincide con el inicio de la formación de los cordones seminíferos.

En el ratón, las células somáticas expresan *Sry* por un periodo aproximado de 8h (Sekido et al., 2004; Wilhelm et al., 2005). Considerando que *Sox9* es detectado alrededor de 4h después de la expresión de *Sry* en células de preSertoli, hay una expresión simultánea de estos dos genes 24 horas antes de iniciarse la diferenciación de los cordones seminíferos (Bouma et al., 2005; Bullejos and Koopman, 2005; Kidokoro et al., 2005; Wilhelm et al., 2005).

Aunque la regulación directa de *Sox9* por *Sry* en el ratón ocurre en las mismas células de preSertoli, la inducción indirecta de la expresión de *Sox9* en células que no expresaron *Sry* también se lleva a cabo. Se ha propuesto que el factor de señalización *PGD2* actúa como factor parácrino responsable del reclutamiento de células que no expresaron *SRY*. De manera que por este proceso es posible incrementar el número de células que expresan *Sox9* asegurando el rápido crecimiento de los cordones seminíferos al incorporar células mesenquimáticas del estroma (Wilhelm et al., 2005). Los actuales resultados en el conejo permiten especular que en contraste con el ratón, la acción parácrina de *PGD2* pudiera jugar un papel importante en el reclutamiento

de las células derivadas de los corpúsculos mesonéfricos para integrarse a los cordones seminíferos.

La correlación entre las observaciones ultraestructurales y la expresión de marcadores de las células precursoras de Sertoli, apoyan la idea de un origen dual del componente somático de los cordones seminíferos en el conejo (Wartenberg et al., 1991). Una lámina basal incompleta permite el contacto célula-célula de manera directa entre las células positivas y negativas a SOX9 en diversos lugares a lo largo de un área de transición del lado mesonéfrico del crecimiento de la cresta genital. Nuestros actuales resultados indican que la lámina basal incompleta permite un contacto directo célula-célula entre las células positivas y negativas a SOX9, a lo largo del extremo craneal del lado mesonéfrico de los cordones seminíferos en crecimiento. La formación de la lámina basal alrededor de los cordones seminíferos previene el contacto directo entre las células del compartimiento epitelial de los cordones seminíferos y el compartimiento estromal (células mesenquimáticas, fibroblastos y vasos sanguíneos)

Aparentemente, hay una diferencia importante en los niveles dimórficos de expresión de SOX9 entre el conejo y el ratón. En el ratón, Sox9 desaparece después de una débil expresión inicial. Los presentes resultados en el conejo demuestran la persistencia de bajos niveles de SOX9 como se ha reportado en otras especies de mayor talla. Sin embargo, es importante notar que diferentes niveles de sensibilidad fueron encontrados de acuerdo al método empleado para la detección de SOX9. Con PCR en tiempo real, la expresión de SOX9 fue detectada en todas las edades estudiadas. Sin embargo mediante hibridación *in situ* en criosecciones de gónada, las células positivas a SOX9 son detectadas en sólo en crestas genitales de 14 y 15 dpc.

Por otra parte, la hibridación en montaje completo fue el método menos sensible para detectar la expresión de SOX9 en las gónadas de hembra en el conejo, siendo debilmente detectado de los 14 a los 18 dpc. La detección de transcritos de SOX9 en cortes, correlaciona con el modesto pico observado en

las gónadas de hembra, alrededor de 15 y 16 dpc observada en el PCR en tiempo real. Esto sugiere que los límites de detección de la expresión de SOX9 en el ovario, se alcanzan en un periodo particular del desarrollo.

Los presentes resultados muestran que hay una aparente correlación entre el tiempo en que se da el aumento de expresión de SOX9 en las gónadas de ambos sexos. Este resultado sugiere que a diferencia del ratón donde la expresión de Sox9 es suprimida en las hembras antes de que se establezca la cresta genital, los ovarios del conejo conservan una bipotencialidad por más tiempo.

Los altos niveles de SOX9 en las gónadas del macho apoyan su papel en la determinación de las células de Sertoli del conejo y de todas las especies de mamíferos estudiadas. Sin embargo, su papel en las gónadas de las hembras aún permanece desconocido. Exceptuando al ratón, se han reportado bajos niveles de expresión de SOX9 en gónadas fetales de hembras en humano (Salas-Cortes et al., 1999; Hanley et al., 2000), cerdo (Daneau et al., 1996; Parma et al., 1999), oveja, (Payen et al., 1996) perro (Meyers-Wallen, 2003) y conejo (presentes resultados). Es posible que los bajos niveles de SOX9 en los ovarios sean insuficientes para canalizar la diferenciación de las células prefoliculares hacia Sertoli. Se ha postulado un mecanismo que previene la translocación de SOX9 del citoplasma al núcleo de la célula durante el periodo crítico de la determinación sexual (De Santa Barbara et al., 2000). Si esta posibilidad fuera correcta, los niveles bajos de expresión de SOX9 en las hembras pudieran ser neutralizados debido a un contexto molecular dimórfico entre las células preSertoli y las células prefoliculares. La ausencia de SRY en las células prefoliculares hace evidente la diferencia en el contexto intracelular de uno y otro tipo celular. Si esta explicación es aceptada, es razonable concluir que la detección de SOX9 en los ovarios de la coneja como el detectado en hembras de otras especies es fisiológicamente irrelevante. La ausencia de la proteína SOX9 detectada por inmunofluorescencia apoya dicha posibilidad.

Sin embargo, todavía no puede descartarse que existan niveles bajos de proteína SOX9 en ovarios correspondientes a los transcritos de SOX9 detectados con PCR. La poca sensibilidad del anticuerpo empleado pudo haber prevenido la detección de bajos niveles de antígeno. Una explicación alternativa es que la regulación negativa de SOX9 en las células prefoliculares puede ocurrir a nivel postranscripcional.

Resulta interesante correlacionar la cronología de la hormona antimuleriana (AMH) detectada en el presente estudio con los experimentos clásicos de castración de Alfred Jost (1947) en conejos fetales. Encontramos que las células de Sertoli comienzan la producción de AMH desde los 15 dpc y los conejos fueron castrados a los 20 dpc, cinco días después de la presencia del factor inhibidor en el testículo. ¿Cómo explicar la reversión sexual fenotípica encontrada después de la castración?

Los conductos mullerianos del conejo fetal se desarrollan entre los 15 y 20 dpc. Es posible que durante este periodo no existan o sean muy bajos los niveles de receptores de AMH en las células del estroma que median su efecto. Otra posibilidad es que las vías de señalización inter e/o intracelulares que median la regresión de los conductos mullerianos todavía no se hayan completado. Cabe también una explicación puramente anatómica. Aunque la comunicación vascular entre el mesonefros y el testículo es amplia, los vasos que llegan a los conductos mullerianos entre los 15 y 20 dpc son escasos. Después, la vascularización es abundante coincidiendo con la regresión masiva de los conductos mullerianos in vivo. Otra posible explicación para los clásicos resultados de A. Jost pudiera ser que la AMH detectada tempranamente en el citoplasma de las células de Sertoli no sea secretada en cantidades suficientes antes del día 20.

Con respecto a la diferenciación sexual de las células germinales, en el ratón la decisión de las células germinales del ovario fetal para iniciar la meiosis es inducida por el ácido retinoico (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). A diferencia del ratón, el conejo no inicia la meiosis en la vida fetal, sino hasta

después del nacimiento. Se ha reportado que las primeras células germinales en leptoteno son observados a partir del día 1pp y los primeros folículos aparecen a los 15dpp (Peters et al., 1965). Los presentes resultados con BrdU marcan a una amplia población de ovogonias proliferando hasta los 10dpp. Por lo anterior, el inicio de la meiosis en el ovario del conejo es un proceso gradual donde coexisten células que entran en meiosis y células germinales en proliferación. Las poblaciones que incorporan BrdU se encuentran distribuidas a lo largo y ancho de la gónada sin mostrar un patrón antero-posterior. Este resultado en el conejo indica una diferencia sustancial con el patrón reportado en el ovario fetal del ratón donde la meiosis se inicia en la región anterior de la cresta y progresa rápidamente hacia las regiones media y posterior (Bullejos and Koopman, 2004; Menke, et al., 2003). Aunque en el presente estudio no empleamos marcadores de meiosis, la entrada en esta, es detectada por la presencia de complejos sinaptonémicos con el microscopio electrónico apoya el resultado de una distribución no regionalizada de las ovogonias que entran en meiosis en el conejo.

La regionalización de la meiosis en el ovario fetal del ratón se correlaciona con la producción del ácido retinóico (AR) en el mesonefros adyacente (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Es claro que esta posibilidad es remota en el caso del conejo ya que el mesonefros fetal involuciona varios días antes de que se inicie la meiosis en el ovario. Queda entonces la posibilidad de que en el conejo, el AR sea producido a nivel intragonadal como lo sugieren nuestros resultados de hibridación in situ de *Aldh1a2*. El hallazgo de que los transcritos aparecen en mayor concentración en la corteza del ovario sugiere diferentes niveles regionales de AR en el ovario. Sin embargo, tales diferencias no correlacionan con ningún gradiente regional de entrada en meiosis de las células germinales. Los resultados sugieren una cierta autonomía de los niveles de AR por parte de las ovogonias para iniciar la meiosis. Es válido especular que estirpes de ovogonias expresen receptores al AR y/o cofactores de transcripción de manera estocástica sin relación con su ubicación en el ovario fetal.

En el caso del testículo murino se asume que las espermatogonias no inician la meiosis debido a la actividad de *Cyp26b1* encargada de degradar al AR producido también en el mesonefros adyacente (Bowles et al., 2006). En el conejo células del mesonefros participan en la formación de los cordones seminíferos, la rete testis y los túbulos del epidídimo. Nuestra detección de la expresión de *Aldh1* en los tres tipos de células epiteliales apoya su origen común y su función como productoras de AR. La detección de *Cyp26b1* restringida a las células de Sertoli en los cordones seminíferos del conejo sugiere una función similar a la propuesta en el ratón. Sin embargo, una cierta población de espermatogonias parece que intenta iniciar la meiosis como lo indica la ligera detección de transcritos de *Scp3*. Es probable que estas espermatogonias “equivocadas” sean eliminadas por apoptosis en etapas previas al inicio normal de la meiosis en la pubertad. Finalmente, como en el ovario, la actividad proliferativa de las espermatogonias en el testículo fetal del conejo tampoco está regionalizada. De manera que su entrada en arresto mitótico también parece ser un proceso estocástico cuya base molecular queda por establecerse.

CONCLUSIONES

1. El periodo en que ocurre la determinación sexual, es similar en las crestas genitales del ratón y el conejo. En ambas especies la expresión de *SRY/SOX9* se activa alrededor de 48 h antes del inicio de la formación de los cordones seminíferos y la producción de AMH. Sin embargo, en contraste con el ratón, en el conejo, la morfogénesis de los cordones seminíferos dura varios días más. Proponemos que la contribución de células epiteliales de los corpúsculos mesonéfricos antes y después de la diferenciación del testículo apoya un origen dual de las células de Sertoli.
2. El presente estudio muestra que la etapa en que se establece la cresta genital, el patrón de desarrollo de la gónada, el perfil de expresión de los genes *SRY/ SOX9*, la producción del AR y el patrón de inicio de la meiosis del conejo, son similares a otras especies incluyendo al humano.
3. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis planteada y nos permiten proponer que el conejo representa un buen modelo para investigar los mecanismos involucrados en la morfogénesis de la gónada y en la diferenciación sexual de los mamíferos.

Apéndice 1

TÉCNICA	EDAD	NUM. DE EMBRIONES HEMBRA						NUM. DE EMBRIONES MACHO					
		SRY	SOX9	AMH	ALDH 1A2	CYP 26B1	BrdU	SRY	SOX9	AMH	ALDH 1A2	CYP 26B1	BrdU
PCR en tiempo real	14dpc	2	5					5	5				
	15	2	3					3	3				
	16	2	3					3	4				
	18	2	2					2	2				
	21	2	3					3	3				
	26	2	2					3	3				
	28	2	2					2	2				
	1 dpp	2	2					2	2				
	5	2	2					2	2				
	7	2	2					3	2				
Hibridación In situ en montaje Completo (mCHIS)	13dpc	1	2					2	2				
	14	3	4					5	3				
	15	2	2					4	2				
	18	1	2					2	2				
Hibridación In situ en cortes por congelación (cgHIS)	13dpc		1						1				
	14	2	2					2	2				
	15	1	2					3	3				
	18	1	1					2	4				

	1dpp													
	7				2	2					2	2		
Inmuno- fluorescencia	14 dpc		2	2						2	2			
	15		2	2						2	8			
	18		2	2						3	4			
	30													2
	31													2
	1dpp													2
	5													2
	7													2
	RT-PCR de punto final	1dpc				2	2						2	2
5					2	2						2	2	
7					2	2						2	2	

Tabla 1. Resumen del número de embriones de conejo utilizados en cada técnica descrita en material y métodos.

Apéndice 2

<i>GEN</i>	<i>SECUENCIA 5'- 3'</i>	<i>CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN</i>	<i>SECUENCIAS DE REFERENCIA</i>
Sry <i>Sexado por PCR</i> <i>Ribosonda</i>	S: GTGGTCCCAACATCAGA AS: ACCTCGTCGGAAGGTTAAAATC	94°C- 1min 56°C- 1min 72°C- 1min	Sinclair et al., 1990
Sox9 <i>PCR</i>	S: TCATGAAGATGACCGACGAG AS: GTT CTT CAC CGA CTT CCT C	94°C- 1min 56°C- 1min 72°C- 1min	Human- BC007951 Mouse- BC023790 Pig- AF029696 Chicken- AB012236
Sox9 <i>Ribosonda</i>	S: AGGAAGTCGGTGAAGAACG AS: ATGTTGGAGATGACGTCGC	94°C- 1min 56°C- 1min 72°C- 1min	Human- BC007951 Mouse- BC023790 Pig- AF029696 Chicken- AB012236
Sypc3	S: ACAAGGCTCTTCTTGCCAAG AS: CATACTCTTTA GAACTGCTC	94°C-1min 56°C-1min 72°C-1min	Humano (BC062662) Cerdo (CV866337) Rata (BC089540)
Aldh1a2	S: GAA GAG AGT AAC TCT GGA AC AS: GCC TCT TAG GAG TTC TTC TG	94°C-1min 56°C-1min 72°C-1min	Rata (NM_053896) Ratón (NM_009022)
Cyp26b 1	S: CGTCAT CAA GGA GGT CAT G AS: CTA ACA CTG TCA CGG GCA T	94°C-1min 56°C-1min 72°C-1min	Humano (NM_019885) Rata (NM_181087) Ratón (NM_175475)
β-actina	S: ATGTGCAAGGCCGGCTTCGC AS: GGTCTCAAACATGATCTGGG	94°C-1min 56°C-1min 72°C-1min	Humano

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados y condiciones de PCR. Referencia en NCBI de las secuencias utilizadas en el alineamiento para el diseño de los oligonucleótidos. S= sentido, AS= antisentido

REFERENCIAS

- Adams, I. and McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129: 1155-1164.
- Albrecht, K. H., and Eicher, E.M. (2001). Evidence that Sry is expressed in preSertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240: 92-107.
- Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., McCrea, P.D. and de Crombrughe, B. (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation *Genes Dev* 18:1072-1087.
- Anderson, E.L., Baltus, A. E., Ropers-Gajadien, H. L., Hassold, T.J., de Rooji, D.G., van Pelt, A.M.M. and Page, D.C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and ovogenesis in mice. *PNAS* 105: 14976-14980.
- Anttonen, M., Ketola, I, Parviainen, H., Pusa, A. and Heikinheimo, M. (2003). FOG-2 and GATA-4 are coexpressed in the Mouse Ovary and can modulate Müllerian-Inhibiting substance expression. *Biol Rep* 68: 1333-1340.
- Arango, N. A., Lovell-Badge, R. and Behringer, R. R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99: 409-419.
- Baltus, A.E., Menke, D.B., Hu, Y.C., Goodheart, M.L., Carpenter, A.E., de Rooij, D.G., and Page, D.C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 38: 1430–1434.
- Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Floridia, G., Worley, K.C., Tonini, G., Ferrante, E., Chiumello, G., McCabe, E.R.B., Fraccaro, M., ZuVardi, O. and Camerino, G. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal, *Nat Genet* 7: 497-501.
- Barrionuevo, F., Bagheri-Fam, S., Klatting, J., Kist, R., Taketo, M.M., Englert, C. and Scherer, G. (2006). Homozygous inactivation Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Rep* 74: 195-201.

- Beverdam, A. and Koopman, P. (2006). Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum Mol Gen* 13: 417-431.
- Bitgood, M.J., Shen, L., McMahon, A.P. (1996). Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6: 298-304.
- Bouma, G. J., Albrecht, K.H., Washburn, L.L., Recknagel, A.K. Churchill, G.A. and Eicher, E.M. (2005). Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development* 132: 3045-3054.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., y Koopman, P. (2006). Retinoid Signaling determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* 312: 596-600
- Bowles, J. and Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 134: 3401-3411.
- Bullejos, M. and Koopman, P. (2001). Spatially dynamic expression Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn* 221:201-205.
- Bullejos, M. and Koopman, P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 68: 422-428.
- Bullejos, M. and Koopman, P. (2005). Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal. *Dev Biol* 278: 473-481.
- Butler, H. and Juurlink, B.H.J. *An Atlas for Staging Mammalian and Chick embryos*. CRC Press (Boca Raton Florida, 1987).
- Byskov, A.G. and Saxen, L. (1976). Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. *Dev Biol* 52: 193-200.
- Capel, B. (2006). R-spondin tips the balance in sex determination. *Nature Genetics* 38: 1233-1234.
- Chaboissier, M., Kobayashi, A., Vidal, V., Lutzkendorf, H., Van de Kant, H., Wegner, M., De Rooij, D., Behringer, R. and Schedl, A. (2004). Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determining in the mouse. *Development* 131: 1891-1901.

- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10: 940-954.
- Chiquoine, A.D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118: 135-146.
- Chuma, S. and Nakatsuji, N. (2001). Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev Biol* 229: 468–479.
- Cox WG, Singer VL. (1999). A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J Histochem Cytochem* 47:1443-56.
- Daneau, I., Ethier, J.F., Lussier, J.G. and Silversides, D.W. (1996) Porcine SRY gene locus and genital ridge expression. *Biol Reprod* 55: 47-57
- Daneau, I., Pilon, N., Boyer, A., Behdjani, R. and Overbeek PA. (2002). The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis* 33: 170-180.
- De Santa Barbara, P., Bonneaud, N., Boizet, B., Desclozeaux, M., Moniot, B., Sudbeck, P., Scherer, G., Poulat, F. and Berta, P. (1998). Direct Interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates Transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18: 6653-6665.
- De Santa Barbara, P., Me´jean, C., Moniot, B., Malcle`s, M., Berta, P. and Boizet-Bonhoure, B. (2001). Steroidogenic Factor-1 contributes to the cyclic-adenosine monophosphate down-regulation of Human SRY gene expression. *Biol Reprod* 64: 775-783.
- De Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F. and 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 Carlo, A., Travia, G. and De Felici, M. (2000).The meiotic specific synaptonemal complex protein SCP3 is expressed by female and male primordial germ cells of the mouse embryo. *Int J Dev Biol* 44: 241-244.
- Edwards, The external development of the rabbit and rat embryo. *Advances in teratology*, Vol 3, Woollam (ed), Academic Press, NY (1968).
- Gao, F., Maiti, S., Alam, N., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., Lecureuil, C., Guillou, F. and Huff, V. (2006).The Wilms tumor genes, Wt1, is required for

Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. Proc Natl Acad Sci USA 103:11987-11992.

- Gondos, B. and Byskov, A. (1981). Germ cell Kinetics in the neonatal rabbit testis. Cell Tissue Res 215:143-151.
- Goto, T., Adjaye, J., Rodeck, C.H. and Monk, M. (1999). Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. Mol Human Reprod 5: 851:860.
- Gould SJ: Ontogeny and Phylogeny (The Belnap Press of Harvard University Press, Cambridge and London 1977).
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry the mouse sex determining gene in genital ridges. Development 121:1603-1614.
- Hanley, N., Hagan, D., Clement-jones, M., Ball, S., Strachan, T., Salas-Cortes, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., and Wilson, D. (2000). SRY, SOX9 and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. Mech. Dev. 91: 403-407
- Harley, V. R., Clarkson, M. J. and Argentaro, A. (2003). The molecular action and regulation of the Testis-determining factors, SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related High-Mobility Group (HMG) Box9. Endocrine Rev 24: 466-487.
- Harley, V.R., Jackson, D.I., Hextall, P.J., Hawkins, J.R., Berkovitz, G.D., Sockanathan, S., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P.N. (1992). DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. Science 255: 453–456.
- Hayashi, T., Kageyama, Y., Ishizaka, K., Kihara, K. and Oshima, H. (2000). Sexual dimorphism in the regulation of meiotic process in the rabbit. Biol Reprod 62: 1722-1727
- Heikkilä, M., Prunskaitė, R., Naillat, F., Itäranta, P., Vuoristo, J., Leppäluoto, J., Peltoketo, H. and Vainio S. (2005). The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. Endocrinology 146: 4016-4023.
- Hilscher, B., Hilscher, W., Bulthoff-Ohnolz, B., Kramer, U., Birke, A., Pelzer, H., Gauss, G. (1974). Kinetics of gametogenesis. I. Comparative histological and

- autoradiographic studies of oocytes and transitional proespermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res.*154: 443-470
- Hossain, A. and Saunders, F. (2001). The human Sex-determining gene SRY is a direct Target of WT1. *J Biol Chem* 276:16817-16823.
 - Jeays-Ward, K., Dandonneau, M. and Swain, A. (2004). Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 276: 431-440.
 - Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S.P., Zhao, L., De Rooij, D.G., Themmen, A.P., Behringer, R.R. and Parker KL. (2004). Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* 18: 1610-1619.
 - Jordan, B.K., Shen, J.H., Olaso, R., Ingraham, H.A. and 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: 10866-10871
 - Jost, A. (1947). Recherches sur la differenciation de l'embyon de lapin: 3eme partie: rôle des gonads foétales dans la differenciation sexuelle somatique. *Arch d'Anat microscop Morph Exp* 36: 271-312.
 - Jost, A (1971) Embryonic sexual differentiation (Morphology, physiology, abnormalities) in: Jones H.W. and Scott W.W. Hermaphroditism, genital anomalies and related endocrine disorders. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. pp 16-64.
 - Katoh-Fukui, Y., Tsuchiva, R., Shimishi, T., Nakahara, Y., Hashimoto, N., Noguchi, K., Higashinakagawa, T. (1998). Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 393: 688-692.
 - Kent, J., Wheatley, C.S., Andrews, E.J., Sinclair, H.A. y Koopman, P. (1996). A male-specific role for Sox9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813-2822.
 - Kidokoro, T., Matoba, S., Hiramatsu, R., Fujisawa, M., Kanai-Azuma, M., Taya, C., Kurohmaru, M., Kamakami, H., Hayashi, Y., Kanai, Y. and Yonekawa, H. (2005). Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Dev Biol* 278: 511-525
 - Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, ME., Poulat, F., Behringer, R., Lovell-Badge, R. and Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4

- act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS biology* 4: 1000-1009.
- Koopman, P., Munsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and 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. and Lovell-Badge, R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351: 117-121.
 - Koubova, J., Douglas, B. M., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D. and Page, D. C. 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *PNAS*. 103: 2474-2479.
 - Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. and Jaenisch, R. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74: 679-691.
 - Luciani, J.M., Monique- Devictor, and Sthal, A. (1977). Preleptotene Chromosome condensation stage in human foetal and neonatal testes. *J Embryol Exp Morph* 38: 175-186.
 - Luo, X., Ikeda, Y. and Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490.
 - MacLean, G., Li, H., Metzger, D., Chambon, P. and Petkovich, M. (2007). Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology* 148: 4560-4567.
 - Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, C., Berta, P., Poulat, F. and Boizet-Bonhoure B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* 18: 1798-1809.
 - Mark, M., Jacobs, H., Oulad-Abdelghani, M., Dennefeld, C., Féret, B., Vernet, N., Codreanu, C-A., Chambon, P., and Ghyselinck, N. (2008). STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. *J Cell Science* 121: 3233-3242.
 - McLaren A. (1995). Germ cells and germ cell sex. [Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.](#): 350: 229-233.

- McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262: 1–15.
- Merchant, H. (1975) Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. *Dev Biol* 44:1-21.
- Menke, D.B., Koubova, J. and Page, D.C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. (2003). *Dev Biol* 262: 303-312.
- Meyers-Wallen, V.N. (2003). Sry and Sox9 Expression During Canine Gonadal Sex Determination Assayed by Quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction. *Mol Rep Dev* 65: 373-381.
- Miyamoto, N., Yoshida, K., Kuratani, S., Matsuo, I. and Aizawa, S. (1997) Effects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124: 1653-1664.
- Mizusaki, H., Kawabe, K., Mukai, T., Ariyoshi, E., Kasahara, M., Yoshioka, H., Swain, A. and Morohashi, K. (2003) Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol* 17: 507-519.
- Molyneaux, K. and Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. *Int J Dev Biol* 48: 537–544.
- Morais da Silva, S., Hacker, A., Harley, V., Goodfellow, P., Swain, A. and Lovell-Badge, R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14: 62-68.
- Munsterberg, A. and Lovell-Badge. (1991). Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.
- Nef, S., Schaad, O., Stallings, N.R., Cederroth, C.R., Pitetti, J.L., Schaer, G., Malki, S., Dubois-Dauphin, M., Boizet-Bonhoure, B., Descombres, P., Parker, K.L. and Vassalli, J.D. (2005). Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 287: 361-377.
- Nef, S., Verma-Kurvari, S., Merenmies, J., Vassalli, J., Efstratiadis, A., Accili, D. and Parada, L.F. (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426: 291-295.

- Niakan, K.K. and McCabe, E.R.B. (2005). Dax origin, function and a novel role. *Dev Gen Metabol* 86: 70-83.
- Niederreither, K. and Dollé, P. (2006) Molecular mediators of retinoic acid signaling during development. *Adv Dev Biol* 16:105-143.
- Niederreither, K., Vermot, J., Fraulob, V., Chambon, P. and Dollé, P. (2002) Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-independent patterns of retinoic acid synthesis in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16111-16116.
- Nishino, K., Hattori, N., Tanaka, S. and Shiota, K. (2004). DNA Methylation-mediated control of Sry gene expression in mouse gonad development. *J. Biol. Chemistry* 279: 22306-22313.
- O'Rally R., Müller F. *Developmental Stages in Human Embryos* (Carnegie Institution of Washington, Publication 637, 1987).
- Ottolenghi, C., Pelosi, E., Tran, J., Colombino, M., Douglass, E., Nedorezov, T., Cao, A., Forabosco, A. and 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.
- Parma, P., Pailhoux, E. and Cotinot, C. (1999). Reverse Transcription-Polymerase Chain reaction Analysis of Genes Involved in Gonad Differentiation in Pigs. *Biol. Rep.*61: 741-748.
- Parma, P., Radi, O., Vidal, V., Chaboissier, M.C., Dellambra, E., Valentini, S., Guerra, L., Schedl, A., and Camerino, G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38:1304–1309.
- Payen, E., Pailhoux, E., Abou Merhi, R., Gianquinto, L., Kirszenbaum, M., Locatelli, A. and Cotinot, C. (1996). Characterization of ovine SRY transcript and developmental expression of genes involved in sexual differentiation. *Int J Dev Biol* 40: 567-575.
- Pennimpe, T., Cameron, D., and Petkovich, M. (2006) Regulation of murine embryonic patterning and morphogenesis by retinoic acid signaling. *Adv Dev Biol.* 16:65–104.
- Peters, H., Levy, E. and Crone, M. (1965). Oogenesis in rabbits. *J Exp Zool* 158: 169-180.
- Pierucci-Alves F, Clark AM, and Russell LD. (2001). A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod* 65: 1392-1402.

- Pilon, N., Daneau, I., Paradis, V., Hamel, F., Lussier, J. G., Viger, R. S., and Silversides, D. W. (2003) Porcine SRY promoter is a target for Steroidogenic Factor 1. *Biol Reprod* 68: 1098-1106.
- Salas-Cortes, L., Jaubert, F., Barbaux, S., Nessman, C., Bono, M.R., Fellous, M., McElrreavey, K., and Roseblatt, M. (1999). The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol* 43: 135-140.
- Schmahl, J., Kim, Y., Colvin, J.S., Ornitz, D.M., and Capel, B. (2004). Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* 131: 3627-3636.
- Svingen, T., Beverdam, A., Bernard, P., McClive, P., Harley, V., Sinclair, A. and Koopman, P. (2007). Sex-specific expression of a novel gene Tmem 184a during mouse testis differentiation. *Reproduction* 133: 983-989.
- Sekido, R. and Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 12: 930-934.
- Sekido, R., Bar, I., Narvaez, V., Penny, G. and Lovell-Badge, R. (2004) Sox9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 274: 271-279.
- Shimamura, R., Fraizer, G.C., Trapman, J., Lau, YfC., and Saunders, G.F. (1997). The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Müllerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* 3: 2571-2580.
- Sinclair, A., Berta. P., Palmer, S.M., Ross Hawkins, R.J. Griffiths, L.B., Smith, M.J., Foster, W.J., Frischauf, A., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, N.P. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244 .
- Smith, C.A., Roeszler, K.N., Bowles, J., Koopman, P., Sinclair, A.H. (2008). Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. *BMC Dev Biol* 8: 85
- Suzuki, A. and Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell. *Genes & Dev.* 22: 430-435.
- Tevosian, S.G., Albrecht, K.H., Crispino, J.D., Fujiwara, Y., Eicher, E.M., Orkin, S.H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129: 4627-4634.

- Theiler, K. *The House Mouse*. Springer-Verlag. (New York, Heidelberg, Berlin. 1972).
- Tomizuka, K., Horikoshi, K., Kitada, R., Sugawara, Y., Iba, Y., Kojima, A., Yoshitome, A., Yamawaki, K., Amagai, M., Inoue, A., Oshima, T. y Kakitani, M. (2008). R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Gen* 17: 1278-1291.
- Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. y McMahon, A.P. (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397: 405-409.
- Viger, R., Mertineit, C., Trasler, J. M. J. y Nemer, M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic during mouse gonadal development and is a potent activator inhibiting substance promoter. *Development* 125: 2665-2675.
- Wartenberg, H., Kinsky, I., Viebahn, C. and Schmolke C. (1991). Fine structural characteristics of testicular cord formation in the developing rabbit gonad. *J Electron Micr Technique* 19:133-157.
- Wartenberg H. (1978). Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. *Andrologia* 10: 1-21.
- Wilherm, D. and Englert, C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev* 16: 1839- 1851
- Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Megan, W. Combes, A., Beverdam, A., Bowles, J., Mizusaki, H. and 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. and Koopman, P. (2007). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87: 1-28.
- Western, P., Miles, D.C., van Den Bergen, J., Burton, M. and Sinclair, A. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest fetal male germ cells. *Stem Cell* 26: 339-347.
- Yao, H.H., Matzuk, M.M., Jorgez, C.J., Menke, D.B., Page, D.C. and Swain, A. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230: 210-215.
- Yao, H.H., Whoriskey, W. and Capel B (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 16: 1433-1440.

- Yao, H.H-C (2005) The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Gen Metabol* 86: 70-83.
- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A., Jameson, J.L. (1998) Role of Nr0b1 in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* 20: 353-357.
- Zamboni, L. and Upadhyay, S. (1982). The contribution of the mesonephros to the development of the sheep fetal testis. *Am J Anat* 165: 339-356.
- Zamboni, L. and Upadhyay, S. (1983). Germ Cell Differentiation in mouse Adrenal glands. *J Exp Zool* 228:173-193.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS



PDCB/grad/076/Jur/2009

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

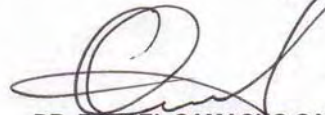
Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 237ª del 11 de marzo de 2009, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de **VERÓNICA DÍAZ HERNÁNDEZ**, con número de cuenta **504014390**, con la tesis titulada **"INTERACCIONES CELULARES INVOLUCRADAS EN LA DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GONADAL DEL CONEJO"**, dirigida por el Dr. Horacio Merchant Larios.

Presidente: Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano
Secretario: Dr. Horacio Merchant Larios
Vocal: Dr. Jesús Chimal Monroy
Vocal: Dr. Miguel Betancourt Roule
Vocal: Dra. Gabriela Morali de la Brena

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, a 12 de marzo de 2009



DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
RESPONSABLE
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS



DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. Horacio Merchant Larios
Coordinación de PDCB

FMM/RCC/bhh

Teléfono 5623 0171 5623 0170 <http://www.pdcbl.unam.mx> E-mail: pdcbl@servidor.unam.mx