



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

“ASPECTOS CELULARES Y MOLECULARES  
INVOLUCRADOS EN LA REVERSIÓN  
SEXUAL DEL RATÓN B6.Y<sup>TIR</sup>”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A  
**BIÓL. NIVIA ROCIO ANTONIO RUBIO**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

COMITÉ TUTORAL

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO



México, D. F

Enero 2012



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.

## DEDICATORIA.

A mi pequeña Andrea.

Especialmente a Aarón Valdez por apoyarme en todo, por compartir conmigo tantos buenos momentos y sobre todo por brindarme su cariño.

A mis abuelos Vicente Antonio y Maura Cruz por su apoyo y la confianza que siempre me han tenido.

A mis padres Raúl Antonio y Angelina Rubio por el gran cariño que siempre me han demostrado.

A mis hermanos Raúl, Héctor y Diana por su apoyo y por estar conmigo en todo momento.

## AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza por la dirección de la presente Tesis en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y al Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano, miembros del Comité Tutoral, por sus comentarios y sugerencias durante la realización del proyecto de investigación.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y a la M. en C. Irma Rivera Montoya por el apoyo y el asesoramiento técnico para realizar parte del trabajo experimental en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

A la M. en C. Esmeralda Lira Romero por el apoyo técnico brindado en la obtención de animales y muestras biológicas y durante la realización del trabajo experimental.

Al Programa de Posgrado, Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, por el apoyo brindado para la realización de los estudios de posgrado correspondientes.

Al Programa de Becas para la formación de Científicos y Tecnólogos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante la realización del presente trabajo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo.

---



---

**ÍNDICE**

❖ <b>Lista de Figuras y Tablas</b>	I
❖ <b>Lista de Abreviaturas</b>	II
❖ <b>Lista de Publicaciones</b>	IV
❖ <b>Resumen</b>	V
❖ <b>Abstract</b>	VII
❖ <b>Antecedentes.</b>	
1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos.	1
1.1 Determinación sexual y cromosomas sexuales.	2
1.2 Gónada indiferenciada.	3
1.3 Diferenciación gonadal.	4
2. Genes involucrados en la diferenciación sexual.	7
2.1 Genes determinantes del sexo.	8
2.2 Genes involucrados en el desarrollo testicular.	10
2.3 Genes involucrados en el desarrollo ovárico.	14
3. Reversión sexual en mamíferos.	17
3.1 Desarrollo sexual anormal en humanos.	17
3.2 Modelos de reversión sexual en roedores.	19
4. Reversión sexual en el ratón B6.Y <sup>TIR</sup> .	20
4.1 Características generales de la cepa B6.Y <sup>TIR</sup> .	21
4.2 Desarrollo gonadal en el ratón B6.Y <sup>TIR</sup> .	23
4.3 Genes analizados en el ratón B6.Y <sup>TIR</sup> .	24
❖ <b>Justificación.</b>	26
❖ <b>Hipótesis.</b>	26
❖ <b>Objetivos.</b>	
1. Objetivo general.	27
2. Objetivos particulares.	27

---

---

❖ <b>Estrategias y métodos.</b>	
1. Mantenimiento de la cepa B6.Y <sup>TIR</sup> .	28
2. Obtención de los embriones y disección de las gónadas.	30
3. Inmunofluorescencias.	30
4. Extracción de RNA total y RT-PCR.	34
❖ <b>Resultados.</b>	
1. Detección de proteínas y análisis morfológico.	38
2. Cuantificación de la fluorescencia.	53
3. Expresión de genes y análisis molecular.	55
❖ <b>Discusión.</b>	
1. Expresión de marcadores testiculares.	66
2. Expresión de marcadores ováricos.	69
3. Células germinales y diferenciación meiótica.	70
4. Esteroidogénesis en la gónada embrionaria del ratón normal.	73
❖ <b>Conclusiones.</b>	79
❖ <b>Referencias.</b>	80
❖ <b>Anexos.</b>	
1. Oligonucleótidos y condiciones de PCR para sexado.	93
2. Condiciones de RT-PCR para genes específicos.	93
3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-PCR.	94
4. Secuenciación de fragmentos amplificados por PCR.	97

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1</b>	Biosíntesis de hormonas esteroides	13
<b>Figura 2</b>	Sexado por amnios	29
<b>Figura 3</b>	Sexado por PCR	29
<b>Figura 4</b>	Cuantificación de Fluorescencia	33
<b>Figura 5</b>	Integridad de RNA total	34
<b>Figura 6</b>	RT-PCR en tiempo real	36
<b>Figura 7</b>	Localización de proteínas específicas	38
<b>Figura 8</b>	Detección de proteínas en la cepa CD1	40
<b>Figura 9</b>	Detección de proteínas en la cepa B6	42
<b>Figura 10</b>	Detección de proteínas en la cepa B6.Y <sup>TIR</sup>	43
<b>Figura 11</b>	Detección de proteínas en la cepa B6.Y <sup>TIR</sup>	44
<b>Figura 12</b>	Fenotipos gonadales en la cepa B6.Y <sup>TIR</sup>	45
<b>Figura 13</b>	Fenotipos gonadales en la cepa B6.Y <sup>TIR</sup>	46
<b>Figura 14</b>	Inmunofluorescencias en complejos urogenitales	47
<b>Figura 15</b>	Detección de 3 $\beta$ -HSD1 y Laminina	49
<b>Figura 16</b>	Detección de 3 $\beta$ -HSD1 y Testosterona	50
<b>Figura 17</b>	Detección de Testosterona y VASA	51
<b>Figura 18</b>	Detección de 3 $\beta$ -HSD1 y WNT4	52
<b>Figura 19</b>	Graficas de cuantificación de fluorescencia	54
<b>Figura 20</b>	Expresión relativa de mRNA en gónadas XX	56
<b>Figura 21</b>	Expresión relativa de mRNA en gónadas XY	58
<b>Figura 22</b>	Expresión relativa de mRNA en gónadas XY	59
<b>Figura 23</b>	Expresión de los genes 3 $\beta$ -Hsd1, Cyp19a1 y Wnt4	65
<b>Tabla 1</b>	Resumen estadístico de la cepa CD-1	60
<b>Tabla 2</b>	Resumen estadístico de la cepa B6	61
<b>Tabla 3</b>	Resumen estadístico de la cepa B6.Y <sup>TIR</sup>	61
<b>Tabla 4</b>	Coefficientes de correlación en la cepa CD-1	62
<b>Tabla 5</b>	Coefficientes de correlación en la cepa B6	63
<b>Tabla 6</b>	Coefficientes de correlación en la cepa B6.Y <sup>TIR</sup>	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>3<math>\beta</math>-Hsd1</b>	3 $\beta$ hidroxioesteroide deshidrogenasa, isoforma 1
<b>AR</b>	Acido retinoico
<b>B6</b>	Cepa de ratones de laboratorio C57BL/6J
<b>B6.Y<sup>DOM</sup></b>	Cruza de ratones C57BL/6J con <i>Mus musculus domesticus</i>
<b>B6.Y<sup>POS</sup></b>	Cepa de ratones con el cromosoma Y de <i>Mus musculus</i> proveniente de Poschiavo, Suiza y autosomas y el cromosoma X de la cepa B6.
<b>B6.Y<sup>TIR</sup></b>	Cepa de ratones con el cromosoma Y de <i>Mus musculus</i> proveniente de Tirano, Italia y autosomas y el cromosoma X de la cepa B6.
<b>Blast</b>	Herramienta de investigación para alineamiento básico local
<b>CD1</b>	Cepa de ratones normales de laboratorio
<b>CGPs</b>	Células Germinales Primordiales
<b>C-kit</b>	Proto-oncogen que codifica para la proteína tirosina cinasa
<b>Dax1</b>	Gen 1 en la región critica sensible a dosis de reversión sexual e hipoplasia adrenal congénita sobre el cromosoma X.
<b>DEPC</b>	Di etil pirocarbonato
<b>Dhh</b>	“Desert hedgehog”
<b>Dmc1</b>	Gen que codifica para una proteína de recombinación meiótica
<b>DNA</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>DNasa I</b>	Enzima desoxirribonucleasa I
<b>dpc</b>	Días post coitum
<b>dpp</b>	Días post parto
<b>EDTA</b>	Ácido etilen diamino tetra acetico
<b>Emx2</b>	Gen que codifica para un factor de transcripción con un homeodominio LIM
<b>Fgf9</b>	Factor de crecimiento fibroblastico 9
<b>Fog2</b>	Gen 2, cofactor amigo de GATA
<b>Foxl2</b>	Factor de transcripción L2 con un dominio de unión a DNA denominado Fork-head
<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>Fzd/LRP</b>	Complejo Receptor Frizzled FZD y co-receptor LRP
<b>GATA</b>	Familia de factores de transcripción que reconocen la secuencia consenso (AIT)GATA(AIG)
<b>Gata4</b>	Miembro 4 de la familia de genes GATA
<b>GCNA1</b>	Antígeno nuclear de células germinales 1
<b>HMG</b>	Grupo de alta movilidad
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>Lhx</b>	Familia de genes con un homeodominio LIM
<b>LRH-1</b>	Gen homologo al receptor hepático 1
<b>M33</b>	Gen 33 de ratón homologo del gen <i>Drosophila's polycomb</i>



---



---

<b>miRNAs</b>	Micro moléculas de ácido ribonucleico
<b>Mis</b>	Gen que codifica para la Sustancia Inhibidora de Müller, Amh
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Oct4</b>	Factor de transcripción 4 con un dominio de unión octámero
<b>P450arom</b>	Citocromo P450 aromatasa
<b>P450c17</b>	Citocromo P450, esteroide 17 alfa hidroxilasa/17,20 liasa
<b>P450scc</b>	Citocromo P450, de división de la cadena lateral del colesterol
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFA</b>	Parformaldehído
<b>RBPs</b>	Proteínas de unión a RNA
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RNasas</b>	Enzimas que degradan moléculas de RNA
<b>RRM</b>	Dominios de reconocimiento de RNA
<b>Rspo1</b>	R-spondin 1, gen que codifica para la proteína 1 secretada rica en cisteína que contiene una región trombospondin repetida tipo 1.
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa-Transcriptasa Reversa
<b>sc</b>	Somitas caudales
<b>Scp3</b>	Proteína 3 del complejo sinaptonémico
<b>Sf1</b>	Gen que codifica para el factor esteroideogénico 1
<b>Sox9</b>	Gen 9 con región HMG relacionado a Sry
<b>spp</b>	Semanas post parto
<b>Sry</b>	Región determinante sexual en el cromosoma Y
<b>StAR</b>	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
<b>Stat5</b>	Proteína 5 de transducción de señales y activador de transcripción
<b>Steel</b>	Gen que codifica para un factor de crecimiento que es ligando del receptor de superficie C-kit
<b>Stra8</b>	Gen 8 estimulado por ácido retinoico
<b>Sxr</b>	Sexo revertido
<b>TAE</b>	Tris / Acetato / EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
<b>TGFβ</b>	Factor de Crecimiento Transformante β
<b>Tris</b>	Hidroximetil-aminometano
<b>VASA</b>	Proteína de unión a RNA con una helicasa dependiente de RNA
<b>Wnt4</b>	Miembro 4 de la familia de genes con sitio de integración desalado de tipo MMTV (virus murino de tumor mamario)
<b>Wt1</b>	Gen 1 supresor tumoral de Wilm
<b>Zfy1</b>	Proteína con dedos de Zinc 1, ligada al cromosoma Y
<b>Zfy2</b>	Proteína con dedos de Zinc 2, ligada al cromosoma Y

---



---

## LISTA DE PUBLICACIONES

- ❖ Antonio-Rubio NR, Guerrero-Estévez SM, Lira-Romero E and Moreno-Mendoza N. 2011. Expression of  $3\beta$ -HSD1 and P450 Aromatase enzymes during mouse gonad differentiation. *Journal of Molecular Histology* 42:535-543. DOI: 10.1007/s10735-011-9358-y
  
- ❖ Antonio-Rubio NR and Moreno-Mendoza N. 2011. Different levels of testicular organization during gonadal differentiation in B6.Y<sup>Tir</sup> mice manifesting sex reversal. *Cell Biology International*. En revisión.

---

---

## RESUMEN

En 1982, se reportó que cuando se transfiere el cromosoma Y del ratón *Mus musculus domesticus* (de Tirano, Italia [Y<sup>TIR</sup>]) dentro de la cepa C57BL/6J (B6), toda la progenie XY falla a desarrollar testículos normales independientemente de la presencia del gen Sry. Los individuos de esta cepa presentan diversos fenotipos sexuales incluyendo reversión sexual completa (hembra XY), hermafroditas verdaderos y machos con testículos pequeños que son pobremente fértiles. Esta nueva cepa fue designada como B6.Y<sup>TIR</sup> y ha sido usada como un excelente modelo para el estudio de procesos del desarrollo sexual; sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que contribuyen a la reversión sexual no son claros. El objetivo del presente trabajo fue establecer los eventos del desarrollo ovárico que posiblemente participan en la reversión sexual del ratón B6.Y<sup>TIR</sup>. El estudio de estos eventos se observó mediante el análisis del patrón de expresión de genes relacionados con la diferenciación testicular (Sry, Sox9 y Mis) y ovárica (Wnt4, Rspo1 y Stra8) en gónadas XY del ratón B6.Y<sup>TIR</sup> y las cepas normales CD1 y C57/BL6J (B6) por medio de inmunofluorescencia y RT-PCR en tiempo real. Se observó que la expresión de los genes relacionados con la diferenciación sexual está alterada en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>, tanto a nivel de transcritos como de proteínas induciendo la diferenciación de ovarios y ovotestis pero no de testículos normales. Los datos mostraron que la expresión de genes testiculares parece estar siendo inhibida en diferentes niveles permitiendo la expresión de genes ováricos como Wnt4, Rspo1 y Stra8. Sin embargo, la acción de estos genes no es clara cuando los datos son analizados como un promedio. Además, en el presente trabajo se muestra un análisis de correlación entre genes que nos permitió observar la relación en la expresión de los genes testiculares y ováricos en la gónada en desarrollo.

La detección de 3 $\beta$ -HSD1 se utilizó como marcador testicular; sin embargo, en el presente trabajo se observó que la enzima se detecta también durante el desarrollo de los ovarios. Para establecer si las gónadas XX son esteroidogénicas, se analizó el patrón de expresión del mRNA de los genes 3 $\beta$ -Hsd1 y P450arom así como el patrón de expresión de las

---

---

proteínas de  $3\beta$ -HSD1 y Testosterona en gónadas normales indiferenciadas y diferenciadas de embriones machos y hembras. Los datos indicaron que la enzima  $3\beta$ -HSD1 se expresa en las gónadas XX durante el periodo de diferenciación gonadal. Sin embargo, la Testosterona, que podría indicar actividad esteroidogénica no es producida. Además, la ausencia de P450arom indicó que no se produce Estradiol. La detección de  $3\beta$ -HSD1 en estadios tempranos del desarrollo ovárico, así como la ausencia de Testosterona sugiere que las gónadas XX no son esteroidogénicas y que la enzima puede jugar un papel diferente al del proceso de esteroidogénesis.

**ABSTRACT**

In 1982, it was reported that when the Y chromosome of the *Mus musculus domesticus* mice (from Tirano, Italy [Y<sup>TIR</sup>]) was introduced into the C57BL/6J (B6) strain, all XY progeny fail to develop normal testes despite transcription of Sry. The individuals from this strain show a range of sexual phenotypes, including fully sex reversed XY females, true hermaphrodites and males; although the males have small testes and are of poor fertility. This new strain was designed as B6.Y<sup>TIR</sup> and it have been used as excellent study model for analysis of sex development process but the molecular mechanisms which contribute to sex reversal are not clear. The aim of this study was to establish the ovary development events which possibly participate to sex reversal in the B6.Y<sup>TIR</sup> mouse. The study of the pattern of expression of genes related to testicular (Sry, Sox9 and Mis) and ovarian differentiation (Wnt4, Rspo1 and Stra8) in XY gonads of the B6.Y<sup>TIR</sup> mouse and the normal strains CD-1 and C57/BL6J (B6) was undertaken using immunofluorescence and real time RT-PCR. It was observed that the expression of genes related to the process of sex differentiation is altered in the B6.Y<sup>TIR</sup> strain, as much at the transcript level as in terms of the proteins inducing the differentiation of ovaries and ovotestes, but not form normal testes. Our results show that the expression of testicular genes seems to be inhibited at various levels, permitting the expression of ovarian genes such as Wnt4, Rspo1 and Stra8. However the activity of these genes is not clear when we analyzed our data as an average. In addition, in the present work an analysis of correlation is showed where is observed the relation between testicular and ovarian genes during the gonad development.

The detection of 3 $\beta$ -HSD1 was used as testicular marker. Nevertheless, it was observed that the expression enzyme was detected also during the ovary development. To establish if mouse XX gonads are steroidogenic, we analyzed the mRNA expression pattern of 3 $\beta$ -Hsd1 and P450arom as well as protein expression pattern of 3 $\beta$ -HSD1 and Testosterone in normal undifferentiated and differentiated

gonads from both male and female mice embryo. Our data indicate that there is expression of  $3\beta$ -HSD1 enzyme in XX gonads during gonad differentiation period. However the Testosterone which would indicate steroidogenic activity is not produced. Besides, the absence of P450arom indicates that the Estradiol is not produced. The detection of  $3\beta$ -Hsd1 in the early stages of ovarian development, as well as the absence of Testosterone suggests that XX gonads are not steroidogenic and that  $3\beta$ -HSD1 enzyme may play a different role than in the steroidogenesis process.

## ❖ Antecedentes.

### 1. Determinación y diferenciación sexual en mamíferos.

La presencia de sexos separados (gonocorismo) es un fenómeno que sigue interesando a científicos de diferentes áreas debido a que dicha sexualidad se puede expresar de diversas formas y en varios niveles. En vertebrados se pueden observar peculiaridades anatómicas, fisiológicas y conductuales típicas de cada sexo. La presencia de ovarios o testículos es una de las diferencias principales entre hembras y machos en especies gonocóricas.

A pesar de que la morfogénesis de las gónadas en vertebrados es muy similar, los mecanismos que se activan para la determinación y diferenciación del sexo varían considerablemente. El desarrollo del sexo en mamíferos depende de su genotipo, el cual es un equilibrio entre las dotaciones recibidas de los progenitores durante la fecundación. El fenotipo sexual en los adultos es el resultado de una serie de eventos secuenciales que se llevan a cabo principalmente durante la embriogénesis. Estos eventos se pueden dividir en tres fases (Merchant-Larios y Díaz-Hernández, 2011):

- ❖ Determinación sexual cromosómica o genética, se establece en el momento de la fertilización y depende de la carga cromosómica proporcionada por los progenitores. En esta fase se adquieren los componentes genéticos necesarios para que el individuo se desarrolle como macho o hembra.
- ❖ Diferenciación gonadal, en esta fase se activan los procesos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo gonadal y que permiten la diferenciación de un ovario o un testículo, dependiendo del sexo genético adquirido.
- ❖ Diferenciación sexual somática, es la etapa en la cual se desarrollan los caracteres sexuales internos y externos de cada sexo. En este periodo también se incluye la aparición de los caracteres sexuales secundarios posnatales. 🐭

---

---

### 1.1 Determinación Sexual y Cromosomas sexuales.

Determinación sexual se define como el conjunto de eventos genéticos que inducen la diferenciación de la gónada específica de macho o de hembra. El sexo puede ser determinado por varios mecanismos genéticos. En mamíferos el mecanismo de determinación sexual es de tipo cromosómico y se denomina XX/XY (Styrna, 1999).

Durante el proceso de fecundación los gametos masculinos y femeninos se unen restaurando la composición diploide de las células. En cada célula, los cromosomas autosómicos provenientes de cada gameto contienen los mismos genes; sin embargo, los cromosomas sexuales son diferentes y contienen los genes que determinan el sexo. Los cromosomas sexuales son denominados X o Y (Styrna, 1999; Puertas, 1999). Ambos sexos contienen un cromosoma X, que es adquirido de los gametos femeninos. La presencia de un segundo cromosoma X proveniente del gameto masculino da origen a una hembra homogamética XX, mientras que si en su lugar se obtiene un cromosoma Y se desarrolla un macho heterogamético XY de manera normal (Gilbert, 2005; Puertas, 1999; Baccetti y Collodel, 1999).

Cuando hay aneuploidias de los cromosomas sexuales o existen mutaciones en sus genes, se presentan alteraciones en el desarrollo sexual, las cuales pueden ser evidentes a diferentes niveles. La presencia de un solo cromosoma Y con dos o más cromosomas X da origen a individuos machos con alteraciones morfológicas y fisiológicas relacionadas con el sexo. Por otro lado, la ausencia del cromosoma Y dirige el desarrollo del sexo femenino (Styrna, 1999; Parker *et al.*, 1999).

La translocación del brazo corto del cromosoma Y hacia el X es una de las causas que explican los casos de reversión sexual en los que individuos con dos cromosomas X se desarrollan como machos. De manera contraria, la alteración o ausencia de esta misma región en organismos con cromosomas XY se desarrollan con un fenotipo femenino (Gilbert, 2005). 🐭



---


---

## 1.2 Gónada indiferenciada.

En su origen embrionario, ovarios y testículos no pueden ser distinguidos como tales debido a que surgen mediante la formación de una estructura denominada gónada indiferenciada. Dicha estructura también se conoce como gónada bipotencial por que tiene la capacidad de diferenciarse hacia un ovario o hacia un testículo dependiendo de la carga genética (XX o XY) del individuo (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

Las gónadas se derivan del mesodermo intermedio como engrosamientos pareados de la superficie ventromedial del mesonefros. La proliferación celular y la llegada de las células germinales primordiales son eventos críticos para el establecimiento de la gónada indiferenciada bipotencial. Las gónadas de ambos sexos en esta etapa están constituidas esencialmente por células somáticas (de soporte y tejido conectivo) y germinales primordiales (Capel, 2000; Gilbert, 2005).

Datos experimentales parecen indicar que las células germinales no están implicadas en las etapas iniciales de la diferenciación gonadal, y que el compromiso de la gónada bipotencial a diferenciarse como testículo u ovario debe ocurrir en el linaje celular de soporte; es decir, en las células pre-Sertoli o en las células pre-foliculares, respectivamente (Merchant, 1975). Por otro lado, la interacción entre las células somáticas y germinales en el ovario embrionario es de gran importancia para su adecuado desarrollo. La ausencia de células germinales debido a la pérdida del patrón de señalización conocido como C-kit / Steel impide la formación de folículos y se observa disgenesia gonadal (Buehr *et al.*, 1993a).

Muchos genes son expresados en la gónada indiferenciada de ambos sexos. Genes tales como *Wt1* y *Sf1* son esenciales en el establecimiento de la gónada indiferenciada. En ausencia de dichos genes se ha observado que las gónadas entran en proceso de apoptosis por lo cual los individuos carecen de estas estructuras (Wagner *et al.*, 2003). 

---

---

### 1.3 Diferenciación gonadal.

El evento crítico de determinación del sexo depende de la expresión sinérgica o en cascada de los genes presentes en los cromosomas sexuales y autosómicos antes y durante la diferenciación gonadal (Parker *et al.*, 1999). Estos eventos moleculares desencadenan procesos celulares que estimulan la interacción entre células germinales y somáticas que inducen la diferenciación de un ovario o un testículo. En general, en el desarrollo gonadal se involucran las siguientes etapas:

- ❖ Migración y arribo de células germinales primordiales (CGPs). En el ratón, a los 7.5 días post coitum (*dpc*), y en humano alrededor del día 28 de gestación, las CGPs marcadas con fosfatasa alcalina pueden ser localizadas migrando hacia las crestas genitales (MacGregor *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 2000), en donde se establecen y comienzan a expresar factores como VASA (Mvh, Toyooka *et al.*, 2000) y GCNA1 (Enders y May, 1994).
- ❖ Formación de las crestas genitales. Estas estructuras presentes en ambos sexos se forman por proliferación de células del epitelio celómico en la superficie ventromedia del mesonefros (Capel, 2000). Este evento se lleva a cabo alrededor de los 9.5 *dpc* en el ratón y en la quinta semana de gestación en humano.
- ❖ Formación de la gónada indiferenciada. Las CGPs llegan a la cresta genital entre los 10 y 11 *dpc* en ratón y en la sexta semana de gestación en humanos. Una vez que arriban, las CGPs interaccionan con células somáticas y forman los cordones sexuales de la gónada indiferenciada (Merchant-Larios y Taketo, 1991).
- ❖ Morfogénesis gonadal. La formación de un ovario o testículo se lleva a cabo por proliferación y diferenciación de los linajes celulares somáticos dependiendo del sexo genético (Merchant-Larios y Taketo, 1991; Merchant-Larios *et al.*, 1993). En el ratón, las gónadas pueden ser distinguidas a los 12.5 *dpc* y en la séptima semana de gestación en humanos.

Si un embrión es XY, se activan los genes requeridos para el desarrollo sexual masculino, estos genes inducen la diferenciación testicular. En el testículo se diferencian cuatro tipos celulares:

- ❖ Células de Sertoli. Proporcionan soporte y nutrientes a las CGPs.
- ❖ Células de Leydig. Productoras de hormonas esteroides
- ❖ Células Germinales o Espermatogonias. Formaran espermatozoides haploides.
- ❖ Células Peritubulares o Mioides. Proveen integridad estructural al testículo.

El primer signo morfológico de diferenciación sexual en la gónada masculina es la aparición de una red de cordones testiculares conformados por células de Sertoli y germinales, los cuales son evidentes por la formación de una lámina basal constituida por Laminina y Colagena principalmente (Pelliniemi y Frojzman, 2001). Esta lámina basal es formada por proteínas que son secretadas por las células de Sertoli y Mioides. Los cordones testiculares son separados del epitelio celómico debido a la formación de vasos sanguíneos. Posteriormente las células de Leydig y la producción de Testosterona dirigen el desarrollo de los genitales internos y externos (Merchant-Larios y Taketo, 1991; Merchant-Larios *et al.*, 1993).

Se sugiere que las células de Sertoli del testículo embrionario producen un factor inhibidor de la meiosis, por lo que las células germinales que son incluidas en los cordones testiculares son incapaces de iniciar dicho proceso y permanecen en arresto mitótico (McLaren y Buehr, 1990). En la pubertad las células de Leydig producen los andrógenos necesarios para inducir el inicio de la mitosis y la espermatogénesis.

Las células de Sertoli y Leydig son importantes en la diferenciación de los genitales internos. La Hormona Anti-Mülleriana (Amh o Mis) producida por las células de Sertoli induce la regresión de los conductos de Müller (Paramesonefricos) evitando la formación de los genitales internos femeninos. La Testosterona producida por las células de Leydig induce la diferenciación de los conductos de Wolff (Mesonefricos) para que se forme el epidídimo, los conductos deferentes y las vesículas seminales.

---

---

Cuando el embrión es XX el desarrollo es dirigido hacia un ovario por la regulación positiva de genes que promueven la diferenciación de las células de la Granulosa y la Teca, así como la formación de folículos.

En las gónadas femeninas los cambios no son tan evidentes como en machos y las diferencias morfológicas no son tan notables con respecto a la gónada indiferenciada. El principal cambio es un aumento de tamaño producido por la continua proliferación celular tanto de las células somáticas como germinales. Sin embargo, después del periodo de diferenciación sexual, los ovarios tan solo son la mitad del tamaño de un testículo. En la superficie externa se forman cordones sexuales corticales (ovígeros), los cuales son menos evidentes en comparación con los cordones testiculares. Los cordones están conformados por células germinales interconectadas por uniones citoplásmicas formando un cisto y por células somáticas que se diferenciaron en células de la granulosa y de la teca (Pepling y Spradling, 1998).

Las células germinales en el ovario de ratón inician la meiosis a los 13.5 *dpc*, poco después de la etapa de diferenciación sexual (McLaren, 2003). Entre los 15 y 16 *dpc* la mayoría de las CGPs han iniciado el proceso de meiosis y entonces se les denomina ovocitos. Estos ovocitos se encuentran en etapa de Paquíteno (Profase I de la meiosis), y se pueden observar los complejos sinaptonémicos donde ocurre intercambio genético entre los cromosomas homólogos. Posteriormente, entran a la etapa de Diplóteno y permanecen quiescentes. En etapas cercanas al nacimiento, se inicia el proceso de foliculogénesis con la formación de folículos primordiales (Merchant *et al.*, 1991). Al parecer, el inicio de la meiosis está controlado por acción del Acido Retinoico (AR) secretado en el mesonefros. En estudios que involucraron tratamientos con AR exógeno e inhibidores de AR se observó que es capaz de inducir la expresión de marcadores meióticos como *Stra8*, *Scp3* y *Dmcl* en células germinales. La inhibición de AR previene la entrada a meiosis y las células germinales continúan expresando marcadores de células indiferenciadas como *Oct4* (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006). 🐭

---

---


## 2. Genes involucrados en la diferenciación sexual.

La morfogénesis gonadal es controlada por la acción de los factores genéticos que se encuentran localizados principalmente en los cromosomas sexuales; sin embargo, los procesos de diferenciación sexual requieren de muchos genes distribuidos tanto en los cromosomas sexuales como en los autosomas (Baccetti y Collodel, 1999).

Muchos genes son expresados en las gónadas indiferenciadas de ambos sexos y son importantes en el establecimiento de ésta. Algunos de estos genes son M33 (Kato-Fukui *et al.*, 1998), Lhx (Luo *et al.*, 1994), Emx2 (Miyamoto *et al.*, 1997), Wt1 (Wagner *et al.*, 2003) y Sf1 (Jeyasuria *et al.*, 2004). Estos dos últimos son de interés debido a que también participan durante el periodo de diferenciación sexual.

El gen WT1 codifica para un factor de transcripción que se expresa en el complejo urogenital de ambos sexos (Wilhelm y Englert, 2002). Se ha observado que embriones mutantes que carecen de WT1 desarrollan un primordio gonadal, el cual degenera debido a un incremento en el proceso de apoptosis (Wagner *et al.*, 2003).

El gen Sf1 es importante en el establecimiento de la gónada indiferenciada, ya que los embriones mutantes presentan agenesia gonadal (ausencia de gónadas) y reversión sexual de macho a hembra (Jeyasuria *et al.*, 2004). Por otro lado regula la expresión de genes involucrados en la diferenciación masculina (Achermann *et al.*, 2001).

Se han reportado más de 2000 genes involucrados en el desarrollo gonadal, muchos de estos genes se expresan en ambos sexos desde etapa de gónada indiferenciada; otros son expresados dimórficamente y son importantes para llevar a cabo la diferenciación ovárica o testicular (Nef *et al.*, 2005; Menke y Page, 2002; Beverdam y Koopman, 2006). Algunos de estos se explican brevemente a continuación. 

---

---

## 2.1 Genes determinantes del sexo.

En 1990 se dio a conocer la existencia del gen Sry considerado como el factor determinante testicular (TDF o TDY). Este gen que se localiza en el brazo corto del cromosoma Y es el responsable de iniciar la cascada de interacciones genéticas y celulares que inducen el desarrollo de testículos a partir de la gónada indiferenciada (Sinclair *et al.*, 1990). Se le ha denominado SRY (sex-determining region of the Y chromosome) en humanos (Berta *et al.*, 1990) y Sry en ratón (Koopman *et al.*, 1990). Su papel como factor determinante masculino se propuso cuando estudios con ratones transgénicos demostraron que un fragmento de DNA de 14 mil pares de bases (pb) fue capaz de inducir diferenciación masculina en individuos con cromosomas XX (Koopman *et al.*, 1991).

El gen Sry codifica para un factor de transcripción que se caracteriza por tener un dominio de unión a DNA denominado HMG. Su acción es intracelular y controla la expresión de otros genes relacionados con la diferenciación testicular (Dubin y Ostrer, 1994). En el ratón es expresado brevemente por las células de Sertoli entre los 10.5 y 12.5 *dpc* y por las células germinales en el testículo adulto (Albrecht y Eicher, 2001; Hacker *et al.*, 1995). En humanos se detecta en el núcleo de las células de Sertoli y células germinales durante la sexta semana de gestación y continúa su expresión hasta etapas adultas (Hanley *et al.*, 2000; Salas-Cortes *et al.*, 1999; 2001). Se ha observado que tanto el mRNA (mensajero) como la proteína inician su producción en la región central de la cresta genital y posteriormente se extiende hacia los polos rostral y caudal (Albrecht y Eicher, 2001; Bullejos y Koopman, 2001). Su expresión induce la proliferación de células somáticas que se diferenciarán en células epiteliales y de Sertoli (Schmahl *et al.*, 2000). Al parecer la expresión e interacción de las proteínas de Gata4 y Fog2 es necesaria para la expresión correcta de Sry, debido a que se ha observado que embriones XY mutantes que carecen de Fog2 presentan niveles de expresión de Sry reducidos a los 11.5 *dpc* cuando debería alcanzar su pico máximo (Tevosian *et al.*, 2002).

---

---

Se ha propuesto que el gen Sox9 puede ser blanco directo de Sry, ya que estudios han demostrado que Sry (Kidokoro *et al.*, 2005; Sekido *et al.*, 2004) y Sf1 regulan positivamente la expresión de Sox9 (Sekido y Lovell-Badge, 2008; Park *et al.*, 2011). Sox9 se ha considerado un factor determinante del sexo masculino, ya que en ausencia de Sry, su expresión ectópica en gónadas XX y su expresión normal en gónadas XY es capaz de inducir diferenciación testicular (Qin y Bishop, 2005).

Sox9 es un gen autosómico que pertenece a la familia de proteínas HMG y se ubica en el brazo largo del cromosoma 11 de ratón. Codifica para un factor de transcripción que está involucrado en el desarrollo de los huesos y en la determinación del sexo (Foster *et al.*, 1994, Wagner *et al.*, 1994). Estudios a nivel de proteínas demostraron que en el ratón, las gónadas XX no expresan esta proteína y que en gónadas XY comienza su expresión en la región central de la gónada a los 11 *dpc* (15 somitas caudales; sc) poco tiempo después del inicio de la expresión de Sry. Posteriormente a partir de los 11.5 *dpc* (17–20 sc) se detecta en toda la gónada (Moreno-Mendoza *et al.*, 2003). Recientemente se reportó que la expresión de un trans-gen de Sry induce la expresión de SOX9 y la morfogénesis testicular en la región central de la gónada, pero no es suficiente para estabilizar la expresión de SOX9 o la diferenciación testicular en ambos polos (Hiramatsu *et al.*, 2010). En otros estudios se mostró que gónadas de ambos sexos expresan el mRNA a los 10.5 *dpc* y a los 11.5 *dpc* se mantiene en los testículos y desaparece en los ovarios (Kent *et al.*, 1996). De manera similar, en humanos se han detectado los transcritos de Sox9 en ambos sexos observándose niveles mayores en las gónadas XY (Hanley *et al.*, 2000).

La expresión ectópica de Sry en gónadas XX induce la formación de testículos si se expresa durante el periodo de 11.0-11.25 *dpc* (12-14 sc), lo cual corresponde a una ventana de 6 horas después del punto de inicio de la expresión de Sry en gónadas XY (Hiramatsu *et al.*, 2009). Sox9 actúa activando y/o regulando otros genes implicados en el desarrollo testicular y la duplicación de este gen produce una reversión (XX) de hembra a macho (Huang *et al.*, 1999; Vilain y McCabe 1998). 🐭

---

---

## 2.2 Genes involucrados en el desarrollo testicular.

El conocimiento sobre los genes que están involucrados en la diferenciación sexual ha avanzado considerablemente desde el descubrimiento del gen Sry. Actualmente se conocen más de 2000 genes que están relacionados con el desarrollo de la gónada (Nef *et al.*, 2005). Algunos de los genes que se ha visto participan activamente en la diferenciación sexual masculina y pueden o no estar relacionados al gen Sry son los siguientes (Bouma *et al.*, 2004; Menke y Page, 2002):

### ❖ Sustancia inhibidora de los conductos de Müller (Mis o Amh).

Esta glicoproteína es codificada por un gen que pertenece a la familia de Factores de Crecimiento Transformantes  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) y está ubicado en el brazo largo del cromosoma 10 de ratón y en el 19 de humano. En etapas embrionarias es expresada por las células de Sertoli (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991) y se ha observado que su expresión inicia 20 horas después del gen Sry, cuando este último está alcanzando su pico máximo de expresión (Hacker *et al.*, 1995). Su expresión es activada por acción de Sox9 y regulada positivamente por la acción de los genes autosómicos Sf1, Wt1 y Gata4 (Arango *et al.*, 1999; Marshall y Harley, 2000). Es la hormona responsable de la regresión (por apoptosis) de los conductos de Müller (Roberts *et al.*, 2002). En ratones mutantes que carecen de Mis, no se suprime el desarrollo de los conductos de Müller y se presenta pseudohermafroditismo (Arango *et al.*, 1999). La mutación de este gen o la insensibilidad a la proteína en humanos, produce el Síndrome de Conductos Müllerianos Persistentes asociado a criptorquidia bilateral, que se caracteriza por la falta de descenso testicular (Lang-Muritano *et al.*, 2001). La exposición de ovarios fetales de rata a esta hormona induce reversión sexual parcial y desarrollo de ovarios en los que se observa formación de estructuras similares a cordones testiculares (Vigier *et al.*, 1987). En el ratón, cuando hay expresión de Mis en hembras se observa ausencia de oviducto y útero (Behringer *et al.*, 1990) y desarrollo de un ovario en el que se puede llegar a observar bloqueo de la meiosis y se induce la pérdida de células germinales (Josso *et al.*, 1998).



---

---

### ❖ $3\beta$ -Hidroxi esteroide Des hidrogenasa ( $3\beta$ -HSD1).

En etapas postnatales, las gónadas de los mamíferos producen tres grupos esenciales de hormonas esteroides (Wilson *et al.*, 1981): las progestinas (Progesterona), los estrógenos (Estrona y Estradiol) y los andrógenos (Androstenediona y Testosterona). Dichos metabolitos se producen en la vía esteroidogénica a partir de colesterol, y son sintetizados por la acción de varias enzimas (Simard *et al.*, 2005). La mayoría de las enzimas esteroidogénicas participan en múltiples pasos y son capaces de sintetizar más de un metabolito intermedio (Fig. 1). La enzima  $3\beta$ -Hsd es importante en la síntesis de Progesterona y Testosterona (Lorence *et al.*, 1990), y la P450arom participa en la síntesis de Estrona y Estradiol (Simpson *et al.*, 1994). Estas hormonas esteroides son importantes en la regulación de la fisiología sexual de los mamíferos adultos y en etapas embrionarias se sabe que la producción de Testosterona es un evento crucial en la diferenciación masculina.

El gen  $3\beta$  Hsd1 pertenece a la familia de genes  $3\beta$ -Hsd, en la que se encuentran seis genes que producen una isoforma (I - VI) de enzima que se expresa en un tejido específico (Abbaszade *et al.*, 1997; Bain *et al.*, 1991; 1993). Las isoformas I y VI se expresan en gónadas y participan en la biosíntesis de hormonas esteroides (Abbaszade *et al.*, 1997) por lo que son requeridas para la producción de los andrógenos y estrógenos necesarios para la diferenciación (Greco y Payne, 1994) y función testicular (Baker *et al.*, 1999). La  $3\beta$ -Hsd1 comienza a expresarse entre los 13 y 13.5 *dpc* en las células precursoras de Leydig y se mantiene hasta el nacimiento (Baker *et al.*, 1999). En humanos la isoforma II es la enzima que se detecta en las gónadas y glándulas adrenales; la deficiencia en esta enzima provoca hiperplasia adrenal congénita lo cual altera el proceso de esteroidogénesis en ambos órganos. Los individuos con este padecimiento presentan un pseudo-hermafroditismo masculino. La expresión de esta enzima parece estar regulada por acción de Sf1, Stat5, Dax1 y Gata4 (Simard *et al.*, 2005).

---

---

Algunos trabajos reportan la síntesis de Estradiol y Progesterona en ovarios embrionarios de humano (George y Wilson, 1978), conejo (Gondos *et al.*, 1983) y oveja (Quirke *et al.*, 2001). En ovejas se ha reportado la expresión de enzimas esteroidogénicas en ovarios embrionarios (Quirke *et al.*, 2001). La expresión máxima de la enzima  $3\beta$ -HSD1 se detectó en el periodo de diferenciación sexual (alrededor de los 30 días de gestación) y posteriormente su intensidad disminuye (a partir de los 35 días de gestación). Una expresión similar se observó para las enzimas P450arom y P450scc a los 55 días y 75 días respectivamente. Por otro lado, el análisis de contenido de Progesterona, Androstenediona, Testosterona y Estradiol en oveja mostró que las gónadas tanto femeninas como masculinas tienen actividad esteroidogénica en el periodo de diferenciación morfológica (Quirke *et al.*, 2001).

Por otra parte, en otros modelos de estudio como la rata (Juneau *et al.*, 1993) y el ratón (Greco y Payne, 1994) se ha considerado que el ovario embrionario no tiene actividad esteroidogénica. La detección esporádica de enzimas esteroidogénicas como la  $3\beta$ -Hsd1, P450scc, P450c17 y P450arom en ovarios embrionarios de ratón sugiere que no son capaces de sintetizar hormonas esteroides (Greco y Payne, 1994).

En etapas embrionarias se ha reportado que el proceso de esteroidogénesis en los testículos es independiente de la acción de gonadotropinas (O'Shaughnessy *et al.*, 1998) por lo que este proceso es controlado por factores producidos por las gónadas en desarrollo. Sf1 es un factor de transcripción expresado durante el establecimiento y diferenciación de las gónadas de ambos sexos (Ikeda *et al.*, 1994) y que regula la expresión de enzimas ( $3\beta$ -Hsd y citocromos P450) y factores (StAR) importantes en el proceso de esteroidogénesis (Luo *et al.*, 1994, Sugawara *et al.*, 1996). 🐭



---

---

### 2.3 Genes involucrados en el desarrollo ovárico.

Aunque se ha observado que existen 1223 genes que se sobre expresan en las gónadas XX durante el periodo de diferenciación sexual (Nef *et al.*, 2005), aún no se ha encontrado un gen determinante de diferenciación ovárica. Se han detectado genes que son importantes en la diferenciación ovárica sugiriendo que su desarrollo depende de un mecanismo regulado genéticamente y no solo se produce en ausencia Sry (Kim *et al.*, 2006a).

#### ❖ R-spondin 1 (Rspo1).

Es un gen que se localiza en el cromosoma 4 de ratón y que pertenece a la familia de genes *R-spondin* (*Rspo*) que codifican para moléculas de secreción. Es una familia de ligandos que interactúan con un complejo receptor denominado Fzd/LRP (Nam *et al.*, 2006, Wei *et al.*, 2007). En el ratón, entre los 10.5 y 11.0 *dpc* se detecta en el epitelio celómico de la cresta genital de ambos sexos sin mostrar diferencias en los niveles de expresión de mRNA. Posteriormente su patrón de expresión es dimórfico, en el ovario se encuentra en todas las células somáticas, mientras que en el testículo se localiza en el epitelio celómico. A partir de los 12.5 *dpc* su expresión incrementa en las gónadas XX, alcanzando un máximo nivel a los 14 *dpc* (Parma *et al.*, 2006). Rspo1 es importante para el desarrollo ovárico y al parecer no es requerido para la diferenciación y función testicular. Se sugiere que Rspo1 puede hacer sinergia con Wnt4 para estabilizar a  $\beta$ -catenina en las gónadas XX e inducir el desarrollo ovárico normal (Kim *et al.*, 2006b). Es un gen que se encuentra alterado en un síndrome recesivo que se caracteriza por presentar reversión sexual completa de tipo XX en humanos. Los individuos con este padecimiento son 46,XX y Sry negativos, presentan testículos funcionales, masculinización de los genitales internos y externos y no tienen derivados del conducto de Müller. Esta masculinización puede ser inducida por las células de Sertoli y Leydig funcionales en el testículo, sin embargo, todos los individuos son estériles, probablemente debido a la presencia de dos cromosomas X y la ausencia de un cromosoma Y (Parma *et al.*, 2006).

---

---

❖ **Wnt4 [Wingless-type MMTV (murine-mammary-tumour virus) integration site family, member 4].**

Es un gen que codifica para una molécula de señalización (glicoproteína) que es miembro de la familia Wnt y que se localiza en el cromosoma 4 de ratón. Su expresión inicia entre los 9.5 y 10.5 *dpc* en el mesénquima del mesonefros y el epitelio celómico de las crestas genitales. A los 11 *dpc* se expresa en células mesenquimáticas de las gónadas indiferenciadas de ambos sexos y a partir de los 11.5 *dpc* la expresión en machos comienza a ser regulada negativamente, manteniéndose en las hembras (Vainio *et al.*, 1999). Se requiere en la formación de los conductos de Müller, en la diferenciación del linaje de células intersticiales y en el desarrollo y la permanencia post-meiótica de los ovocitos. Se sugiere que en el ovario, inhibe la migración de células endoteliales y la diferenciación de células esteroideogénicas.

Mutaciones en este gen producen desarrollo de fenotipo masculino en individuos XX debido a la producción de Testosterona (Heikkila *et al.*, 2005). Las gónadas mutantes presentan marcadores testiculares como Mis y Dhh lo que sugiere que hay diferenciación de células de Sertoli. La sobreexpresión de Wnt4 en las gónadas XY induce alteraciones en la formación de vasos sanguíneos y en la producción de andrógenos (Vainio *et al.*, 1999; Jeays-Ward *et al.*, 2003). La inactivación de Wnt4 y Foxl2 induce la diferenciación de cordones testiculares y espermatogonias en gónadas XX, implicando que estos genes tienen actividad complementaria en la morfogénesis ovárica (Ottolenghi *et al.*, 2007). Su expresión parece ser controlada directa o indirectamente por la acción de Sox9 y Fgf9 en el testículo (Barrionuevo *et al.*, 2006), en donde también es necesario para la diferenciación normal (Jeays-Ward *et al.*, 2004, Jordan *et al.*, 2003).

En ratones machos transgénicos que sobre expresan el gen Wnt4 se observó que se inhibe la acción de Sf1 y por lo tanto la síntesis de Testosterona (Jordan *et al.*, 2003).

---

---

Por otro lado, en las gónadas de hembras mutantes que carecen de Wnt4 se observa expresión de las enzimas  $3\beta$ -Hsd y P450c17 y síntesis de Testosterona por lo que se sugiere que Wnt4 es requerido para reprimir la diferenciación de células precursoras de Leydig en el ovario embrionario (Vainio *et al.*, 1999). Por lo tanto la expresión adecuada de Sf1 y Wnt4 en las gónadas embrionarias es crucial para la regulación del proceso de esteroidogénesis.

#### ❖ Gen 8 estimulado por Acido Retinoico (Stra8).

Es un gen que pertenece a la familia de Genes sensibles a AR conocidos como Genes *Stra* y codifica para una proteína citoplásmica específica de células germinales pre-meióticas. Se localiza en el cromosoma 6 de ratón y en el cromosoma 7 de humano (Miyamoto *et al.*, 2002). Es regulado positivamente en células germinales embrionarias de gónadas XX antes del inicio de la meiosis y no se expresa en células germinales embrionarias masculinas; su expresión en testículos es detectada hasta después del nacimiento. La expresión de Stra8 en células germinales de gónadas XX se ha observado como una onda antero-posterior de diferenciación que dura aproximadamente 4 días entre los 12.5 y 16 *dpc*. Este patrón de expresión es seguido por otros marcadores meióticos tales como Dmc1 y Scp3. La señalización por AR (un derivado activo de la vitamina A) es requerida para la expresión de Stra8 y por lo tanto para el inicio de la meiosis en ovarios embrionarios (Koubova *et al.*, 2006; Bowles *et al.*, 2006). Tanto hembras como machos que carecen de Stra8 son estériles en la vida adulta debido a que las células germinales de la hembra no inician la meiosis manteniendo una morfología nuclear similar a las células germinales pre-meióticas por varios días y mueren cerca del nacimiento. En machos, se observan espermatocitos pre-meióticos y posteriormente sufren apoptosis. En ambos casos, no se observa condensación de cromosomas meióticos, lo que sugiere que las células germinales deficientes de Stra8 son incapaces de iniciar la Profase de la Meiosis I.



### 3. Reversión sexual en mamíferos.

Cuando la diferenciación de las gónadas propias de cada sexo se lleva a cabo de manera normal, estas producen y secretan las hormonas requeridas para la diferenciación de los genitales internos y externos que conforman el sexo fenotípico. Es por lo anterior que se considera que el sexo fenotípico de los individuos es dependiente del sexo de la gónada. Si los caracteres morfológicos observados en un individuo no corresponden al sexo cromosómico (XX o XY), se dice que se presenta reversión sexual con algún tipo de desorden del desarrollo sexual. Si hay alteraciones numéricas de los cromosomas sexuales se presentan anomalías del desarrollo sexual. Los Síndromes de Klinefelter y Turner en humanos son ejemplos clásicos de este tipo de alteraciones cromosómicas, sin embargo, existen casos de individuos con cromosomas sexuales sin alteraciones en los que la diferenciación sexual no se lleva a cabo de manera normal en uno o varios niveles del desarrollo.

#### 3.1 Desarrollo sexual anormal en humanos.

En humanos se ha observado que la ausencia o las mutaciones de SRY provocan reversión sexual donde los individuos genéticamente machos (XY) se desarrollan como hembras fenotípicas. De manera contraria, su expresión ectópica en individuos XX es suficiente para iniciar el desarrollo sexual masculino. Estudios moleculares realizados en individuos con reversión sexual o hermafroditismo verdadero revelaron presencia de SRY en machos con cromosomas XX; sin embargo, no se detectó en hembras XY. Estos resultados sentaron las bases para proponer a Sry como el factor determinante del sexo masculino y la participación de otros genes implicados en la diferenciación sexual (Copelli *et al.*, 1996). Con el descubrimiento del gen Sry se pudo explicar la incidencia de reversión sexual en humanos, dando a conocer que la ausencia o alteración de dicho gen, específicamente en su dominio de unión a DNA (región HMG) es la causa de muchos de los casos de reversión sexual analizados durante la década de los años 90 (Harley *et al.*, 1992, Hawkins *et al.*, 1992; Hawkins, 1993; Kolon *et al.*, 1998).

No todos los casos de reversión sexual son explicados por mutaciones o alteraciones en la secuencia del gen Sry, ya que también se han presentado casos de reversión sexual XX en los que no se han detectado secuencias del cromosoma Y (De la Chapelle, 1987). Wnt4 es un gen que se propone como posible responsable de algunos casos de reversión sexual en humanos y se ha observado que la expresión de este gen en células de Sertoli y Leydig regula de manera positiva la expresión de Dax1, el cual puede antagonizar la acción de Sry dando como resultado un fenotipo femenino en individuos XY (Jordan *et al.*, 2001).

Los hermafroditas verdaderos son individuos generalmente estériles que forman tanto tejido ovárico como testicular. Se han observado hermafroditas con diferentes cariotipos, entre los que se reportan están 46XY, 46XX/XY (presentando mosaicismo) y el 46XX, siendo este último el más frecuente (González *et al.*, 2001). Las gónadas en un hermafrodita pueden ser:

- ❖ Un ovario y un testículo contralateral.
- ❖ Ovotestis bilaterales
- ❖ Un ovario y un ovotestis.
- ❖ Un testículo y un ovotestis.

Existen casos de hermafroditas verdaderos que no presentan secuencias del gen Sry, por lo que se han estudiado para detectar alteraciones de otros genes involucrados en la diferenciación sexual. Debido a que se propone que Wnt4 suprime la diferenciación masculina, se ha analizado en estos individuos; sin embargo, no se han detectado mutaciones que puedan explicar el hermafroditismo presentado en humanos (Canto *et al.*, 2004). La existencia de hermafroditas verdaderos 46XX que son negativos para Sry es de gran interés en lo que se refiere al análisis de genes relacionados con la diferenciación sexual. 🐭




---

---

### 3.2 Modelos de reversión sexual en roedores.

Existe una amplia gama de anormalidades del desarrollo sexual en mamíferos. El estudio del desarrollo sexual anormal en modelos de roedores ha permitido el descubrimiento de muchas de las causas de alteraciones sexuales presentes en humanos y otros mamíferos.

Un caso interesante de reversión sexual es el ratón Sxr, el cual produce machos fenotípicos con componente genético XX cuando se encuentra alterada la región denominada como “Sex Reversed” (Sxr). Este fenotipo se debe a una duplicación de la región del brazo corto del cromosoma Y que incluye al gen Sry y que es translocado a la región pseudoautosómica del brazo largo que puede ser transmitido a la progenie dando como resultado machos XX (Bishop *et al.*, 1988). Los embriones pueden presentar mosaicismo en la expresión de Sry debido a la inactivación aleatoria de uno de los cromosomas X (Nagamine *et al.*, 1998). Existen dos variantes de la región Sxr, denominadas a y b. Estos se diferencian por que la variante “b” presenta una delección en la región que incluye a varios genes como el Zfy2, implicado en el proceso de espermatogénesis.

Los casos que se han reportado de ratones hermafroditas incluyen a individuos con ovarios y ovotestis o solo ovotestis, y en ocasiones los genitales internos no corresponden con el sexo de la gónada que se ha desarrollado. Se ha propuesto que la causa de estos casos de hermafroditismo se debe a la presencia de mosaicismo cromosómico. Los hermafroditas pueden poseer un componente genético XX, XY o ser quimeras cromosómicas. El ratón B6.Y<sup>DOM</sup> es un buen modelo de estudio del hermafroditismo ya que de manera espontánea se ha observado el desarrollo de individuos clasificados como hermafroditas (Houle y Taketo, 1992). En el caso de la rata también se ha reportado hermafroditismo, en donde se ha observado la presencia de un ovario y un ovotestis contralateral, así como un testículo y un ovario o dos ovotestis en algunos individuos. 

---



---

#### 4. Reversión sexual en el ratón B6.Y<sup>TIR</sup>.

Entre las cepas de ratones en las que se han observado alteraciones en el desarrollo sexual se encuentra la cepa conocida como B6.Y<sup>DOM</sup>, la cual se caracteriza por presentar reversión sexual de tipo XY (Eicher *et al.*, 1982). La cepa B6.Y<sup>DOM</sup> se produce mediante las cruzas realizadas entre machos portadores del cromosoma Y del ratón *Mus musculus domesticus* y hembras de la cepa C57BL/6J (B6). Cuando el cromosoma Y de estos ratones se introduce en el componente genético de la cepa B6 se presentan alteraciones en el desarrollo sexual y los individuos adultos pueden presentar (Eicher *et al.*, 1982; Taketo-Hosotani *et al.*, 1989):

- ❖ Hermafroditismo. Los organismos XY, durante la vida fetal desarrollan dos fenotipos gonadales: ovotestis ú ovarios.
- ❖ Reversión sexual severa de macho a hembra. Se desarrollan hembras fenotípicas estériles con cromosomas sexuales XY.

Se han identificado dos poblaciones del ratón domestico que son capaces de inducir reversión sexual macho a hembra:

- ❖ Machos provenientes de la población de Poschiavo en Suiza; la cepa se denomina B6.Y<sup>POS</sup> (Eicher *et al.*, 1982).
- ❖ Machos provenientes de la población de Tirano en Italia; la cepa se denomina B6.Y<sup>TIR</sup> (Eicher y Washburn, 1986).

El origen de esta reversión sexual aún no es claro, pero se propone que una de las posibles causas sea una incompatibilidad entre los genes autosómicos o ligados al cromosoma X derivados de la cepa B6 con aquellos genes localizados en el cromosoma Y aportado por el ratón doméstico (Biddle y Nishioka, 1988; Eicher y Washburn, 1983; 1986; Eicher *et al.*, 1982; Nagamine *et al.*, 1987). 🐭

---

---

#### 4.1 Características generales de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>.

Esta cepa con reversión sexual se originó mediante cruzas de ratones machos silvestres (*Mus musculus domesticus*) con hembras de la cepa B6. La progenie F1 resulto ser normal; sin embargo, cuando los machos F1 fueron apareados con hembras B6 no relacionadas (retrocruza), los individuos XY podían presentar diferentes grados de reversión sexual (Eicher *et al.*, 1982). Los individuos obtenidos de estas cruzas se pueden clasificar como: hembras XX, machos XY o hembras XY.

##### ❖ Hembras XX.

Cuando las hembras XX normales provenientes de la F1 fueron apareadas con machos normales B6 se observo que su progenie también fue normal desarrollándose machos y hembras en una proporción 1:1. Los embriones forman ovarios funcionales y se diferencian como hembras fértiles normales en todos los aspectos. La progenie con cromosomas XX de todas las generaciones estudiadas se ha desarrollado de manera normal (Eicher *et al.*, 1982).

##### ❖ Machos XY.

El 26% de la progenie con cromosomas XY se desarrolla como hermafroditas en etapas embrionarias y como machos o hermafroditas en la vida adulta (Eicher y Washburn, 2001). Durante el desarrollo embrionario no se forman testículos normales y las gónadas se diferencian como ovotestis o como ovarios. Los ovotestis desarrollan cordones testiculares en la región medular mientras que en las regiones corticales (craneal y caudal) el tejido se diferencia como ovárico (Merchant-Larios y Taketo, 1991; Taketo *et al.*, 1991). Los adultos se desarrollan como machos fenotípicos que llegan a ser fértiles (Eicher *et al.*, 1982). Cuando se analizaron machos de entre 60 y 180 días post parto (dpp) se observó que alrededor del 36% de los individuos presentan testículos bilaterales, el 60% son hermafroditas verdaderos y el 4% presentaban disgenesia gonadal mixta (Houle y Taketo, 1992).

---

---

### ❖ Hembras XY o Machos Revertidos.

El 74% de la progenie con cromosomas XY se desarrolla como hembras fenotípicas (Eicher y Washburn, 2001). En este caso la reversión sexual de los individuos es completa (Eicher *et al.*, 1982). Las hembras B6.Y<sup>TIR</sup> o machos revertidos presentan conducta sexual aparentemente normal y pueden ser apareadas con machos B6 normales (Eicher *et al.*, 1982; Merchant-Larios *et al.*, 1994). Con excepción de una hembra XY con ovarios bilaterales se ha observado que estas son infértiles (Eicher *et al.*, 1982; Taketo-Hosotani *et al.*, 1989) y presentan características endócrinas y ciclos estrales anormales (Villalpando *et al.*, 1993). Al nacimiento los niveles de Testosterona, Estradiol y Progesterona son normales; sin embargo, se reducen conforme avanza la edad de las hembras (Villalpando *et al.*, 1993). Las alteraciones observadas en los ciclos estrales de estas hembras parecen ser restringidas al funcionamiento del ovario debido a que el tratamiento con gonadotropinas permite la ovulación de ovocitos que pueden ser fecundados. Sin embargo, los productos no se desarrollan después de la formación de dos células tanto *in vivo* como *in vitro* y pocos ovocitos en cultivo alcanzan estadios de entre 4 y 8 células (Merchant-Larios *et al.*, 1994, Amleh *et al.*, 1996). La realización de trasplantes ortotópicos apoyan la propuesta de que los ovarios XY son los responsables de la alteración en los ciclos estrales (Marmolejo-Valencia *et al.*, 1999). El estudio de hembras quimeras (con células B6.Y<sup>TIR</sup> y XX normales) permitió sugerir que la infertilidad de las hembras B6.Y<sup>TIR</sup> se debe a la presencia del cromosoma Y en las células germinales (Amleh y Taketo, 1998). Mediante experimentos de trasplante nuclear se observó que los ovocitos de hembras B6.Y<sup>TIR</sup> contienen componentes nucleares y citoplásmicos defectuosos no determinados que alteran el desarrollo embrionario (Amleh *et al.*, 2000). Durante la segunda división meiótica los ovocitos tienden a presentar segregación anormal o incompleta de las cromátidas hermanas (Villemure *et al.*, 2007) mientras que el citoplasma es insuficiente para formar el huso en la segunda metafase de la meiosis (Obata *et al.*, 2008). 🐭

---

---

## 4.2 Desarrollo gonadal en el ratón B6.Y<sup>TIR</sup>.

Durante la etapa embrionaria, las gónadas de los individuos XY se pueden desarrollar como ovarios y/u ovotestis.

### ❖ Ovarios.

Análisis de embriones entre los 14.5 y 16 *dpc* demostraron que el 75% de las gónadas XY se diferencian como ovarios (Eicher y Washburn, 2001). Morfológicamente son iguales a los ovarios XX hasta los 16.5 *dpc*, cuando se observan ovocitos en estadio de Cigóteno o Paquíteno de la meiosis. Posteriormente hay degeneración masiva en la zona central de la gónada antes de que estos alcancen el estadio de Diplóteno (Morales, 2004; Taketo-Hosotani *et al.*, 1989). Estudios preliminares demostraron que los ovarios XY de 4 semanas post parto (spp) son normales y que a las 8 spp existen pocas células germinales debido a una rápida depleción de estas (Eicher *et al.*, 1982). A diferencia de los ovarios normales, los ovarios XY de 10 dpp no forman folículos en la región medular pero sí desarrollan folículos en crecimiento en la región cortical, lo que explica la reducción en el número de folículos a las 4 spp (Taketo-Hosotani *et al.*, 1989).

### ❖ Ovotestis.

El 25% de las gónadas XY, en etapas embrionarias (14.4-16 *dpc*) se desarrollan como ovotestis (Eicher y Washburn, 2001). Estas se caracterizan por presentar tejido testicular y ovárico en la misma gónada (Merchant-Larios y Taketo, 1991). En la región medular, la formación de cordones testiculares es evidente morfológicamente (Taketo-Hosotani *et al.*, 1989) y su actividad se ha demostrado por medio de la expresión de proteínas y factores masculinos (Nagamine *et al.*, 1987; Taketo *et al.*, 1991; Lee y Taketo, 1994). En la región cortical, la detección de células germinales que se encuentran en la profase meiótica es la característica morfológica más evidente de diferenciación ovárica (Taketo-Hosotani *et al.*, 1989). Se ha observado un retraso en el desarrollo de los cordones testiculares en ovotestis,

---

---

se calcula que ocurre alrededor de 14 horas después de la diferenciación morfológica en ratones normales (Palmer y Burgoyne, 1991; Taketo *et al.*, 1991). En etapas postnatales se desarrollan como testículos pequeños y fértiles. 🐭

### 4.3 Genes analizados en el ratón B6.Y<sup>TIR</sup>.

Los individuos XY de esta cepa inician la expresión del gen Sry al mismo tiempo que lo reportado en cepas normales (10.5 *dpc*); sin embargo, su detección se extiende en la gónada por 36 horas más (Lee y Taketo, 1994). Análisis con RT-PCR han mostrado que los niveles de transcritos de Sry están disminuidos en las gónadas XY<sup>TIR</sup> al igual que en la cepa B6 (Lee y Taketo, 2001). Por otro lado, en estudios con hibridación *in situ* se ha observado que el tiempo de expresión de Sry está retrasado con respecto a cepas normales. En la cepa B6 la expresión de Sry se inicia a los 16 sc mientras que en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> se detectó hasta los 22 sc. Por lo anterior se propone que Sry puede estar actuando en un periodo crítico durante el cual debe activar genes como Sox9 que inhiban el patrón de diferenciación ovárico (Bullejos y Koopman, 2005). Al parecer, la expresión de Sry en las gónadas XY<sup>TIR</sup> es capaz de inducir la expresión de Sox9 a los 11.5 *dpc*; sin embargo, este gen puede o no regularse negativamente a los 13.5 *dpc*. Con base en lo anterior se propone que cuando Sox9 se mantiene en las dos gónadas del embrión se forman ovotestis bilaterales (macho), cuando es regulado negativamente se desarrollan dos ovarios (hembra) y cuando en una gónada se mantiene y en la otra se pierde se formará un hermafrodita con un ovario y un ovotestis (Moreno-Mendoza *et al.*, 2004). Aunado a esto, se ha sugerido, que al igual que el Sry, la expresión de Sox9 está considerablemente retrasada en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup>. De tal manera, que la expresión de Sox9 no asegura la diferenciación testicular llevando a la formación de ovotestis cuando es regulado negativamente en los polos, o al desarrollo de ovarios XY<sup>TIR</sup> cuando es regulado negativamente en la gónada completa (Park *et al.*, 2011).

---

---

Algunas gónadas XY<sup>TIR</sup> clasificadas como ovarios y que expresan Sry, carecen de marcadores testiculares como Mis, 3 $\beta$ -HSD y 17 $\alpha$ -Hidroxilasa (Lee y Taketo, 1994), lo que sugiere que Sry no es suficiente para desencadenar la diferenciación masculina. En los ovotestis de 13.5 *dpc* estos tres marcadores testiculares están presentes y se ha observado que la proteína MIS y la Testosterona se localizan en la región testicular (Nagamine *et al.*, 1987, Taketo *et al.*, 1991). Algunos de los estudios realizados con este modelo de reversión sexual se han enfocado a la estructura (Graves y Erickson, 1995; Albrecht y Eicher, 1997) y el papel (Xian *et al.*, 2001; Albrecht *et al.*, 2003; Eicher *et al.*, 1995) que Sry juega en la determinación y diferenciación sexual. Sin embargo, se sabe poco a cerca del patrón de expresión y/o función de otros genes involucrados en el desarrollo sexual. Recientemente se ha observado que los niveles de transcritos de Wnt4 no disminuyen en las gónadas B6Y<sup>TIR</sup> como ha sido reportado para las gónadas XY normales B6. Esta falla en la regulación negativa de Wnt4 sugiere que el camino hacia la diferenciación ovárica pudiera estarse activando en las regiones anterior y posterior de las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> formando ovotestis, o en su caso en la gónada completa desarrollándose ovarios XY<sup>TIR</sup> (Park *et al.*, 2011).

❖ **Justificación.**

Como se observa en algunos casos de reversión sexual, la presencia del gen Sry por sí solo no es capaz de controlar la diferenciación testicular normal, sino que se requiere de la expresión de genes autosómicos y/o genes ligados al cromosoma X. Los modelos de ratones que presentan reversión sexual son de gran interés debido a su utilidad en el análisis de los mecanismos celulares y moleculares que se llevan a cabo durante la diferenciación sexual a nivel gonadal. Dichos modelos permiten dilucidar y/o proponer procesos relacionados con los eventos de determinación y diferenciación sexual que pueden estar ocurriendo de manera normal. El estudio de genes relacionados con el desarrollo sexual en el ratón B6.Y<sup>DOM</sup> puede proveer información que permita dilucidar las causas de la reversión sexual. El ratón B6.Y<sup>TIR</sup> representa un modelo biológico de reversión sexual con características semejantes a ciertas alteraciones sexuales encontradas en humanos tales como individuos XY con algún grado de reversión a nivel gonadal y en los cuales se ha observado expresión positiva de SRY. Por lo que, al conocerse los mecanismos celulares y moleculares de la diferenciación sexual de los ratones B6.Y<sup>TIR</sup> se aportará información relevante sobre el desarrollo gonadal normal. 🐭

❖ **Hipótesis.**

En el ratón B6.Y<sup>TIR</sup>, el factor determinante de la diferenciación testicular (Sry) inicia la cascada de eventos necesaria para inducir la gónada indiferenciada bipotencial a diferenciarse en un testículo. Sin embargo, genes autosómicos (Mis, Sox9 y 3 $\beta$ -HSD1), ya sean regulados o no por Sry "fallan" en completar la ruta testicular, por lo cual se sigue el camino constitutivo de diferenciación ovárica. 🐭




---


---

## ❖ Objetivos.

### 1. Objetivo general.

- ❖ Examinar el nivel de diferenciación celular en un contexto cortical y medular del desarrollo de ovotestis y ovarios XY<sup>TIR</sup>, con el fin de establecer un mecanismo de competencia entre las regiones testicular y ovárica durante el desarrollo de ovotestis. 

### 2. Objetivos particulares.

- ❖ Estudiar la expresión de genes (Sox9, Mis, Wnt4, Rspo1 y Stra8) relacionados con los eventos de determinación y diferenciación sexual normal y durante el desarrollo de ovotestis y ovarios en el ratón B6.Y<sup>TIR</sup> con reversión sexual.
- ❖ Analizar el patrón de expresión del mRNA y de la proteína de las enzimas 3 $\beta$ -HSD1 y P450arom, así como de la secreción de Testosterona durante la morfogénesis gonadal (11.5-15.5 dpc) en las cepas de ratón CD-1 y B6.Y<sup>TIR</sup>.
- ❖ Medir cuantitativamente la expresión de Sox9 y Sry, tanto por RT-PCR convencional como en tiempo real, con el fin de establecer una correlación entre su patrón de expresión antes (11.5 dpc) y durante (12.5 y 13.5 dpc) la diferenciación morfológica de la gónada B6.Y<sup>TIR</sup>.
- ❖ Analizar los cambios en los niveles de expresión de genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual en el desarrollo gonadal normal y del ratón B6.Y<sup>TIR</sup>. 

## ❖ Estrategias y métodos.

### 1. Mantenimiento de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>.

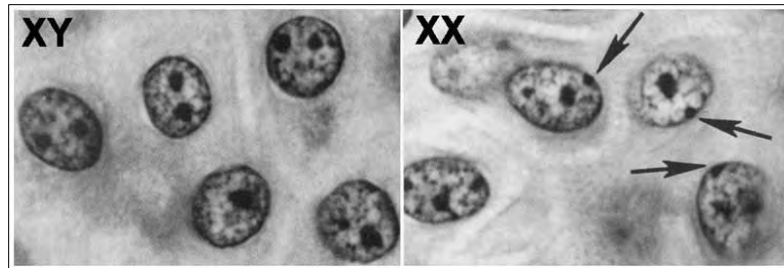
El mantenimiento de la cepa se llevó a cabo mediante el seguimiento de las cruzas de los machos B6.Y<sup>TIR</sup> sementales y la detección de los individuos portadores del cromosoma Y de *Mus musculus domesticus* (originario de Tirano, Italia).

#### ❖ Cruzas de ratones B6.Y<sup>TIR</sup> y C57BL/6J (B6).

Hembras de la cepa C57BL/6J (B6) se colocan con machos sementales de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> entre las 17 y 18 horas; a la mañana siguiente se retiran las hembras y se revisa la presencia de tapón vaginal, señal de que hubo copula. La presencia del tapón vaginal se considera como 0.5 *dpc*. Las crías obtenidas portan el cromosoma Y<sup>TIR</sup>, y presentan diferentes grados de reversión sexual. Los machos obtenidos son utilizados como sementales para mantener la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>.

#### ❖ Sexado por amnios (embriones).

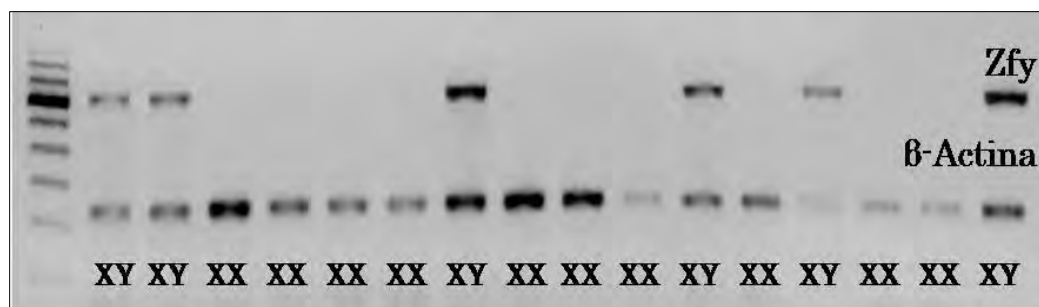
El sexo cromosómico de los embriones se determinó mediante la localización del Corpúsculo de Barr, utilizado como indicador de inactivación de uno de los cromosomas X en células XX (Palmer y Burgoyne, 1991). La técnica consiste en aislar el amnios de los embriones y mantenerlo con 1 ml de solución ácido acético-metanol (1-1) a 4°C. Fijados así los amnios, se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se agregaron 2 gotas de ácido acético (60% en agua bidestilada) y se homogeneizaron utilizando una varilla de vidrio. Se aforó a 1 ml con ácido acético y nuevamente se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se resuspendió el botón celular, se colocó en un portaobjetos limpio y se dejó secar al aire. Se tiñó con Azul de Toluidina (1% en agua bidestilada); y se observaron al microscopio de campo claro. Cuando se observaron más del 80% de células con Corpúsculo de Barr, los embriones fueron clasificados como hembras; si fue menor el porcentaje, los individuos se consideraron machos genéticos (Fig. 2).



**Figura 2.** Sexado por amnios. Identificación del Corpúsculo de Barr (flechas) en células de amnios provenientes de embriones XY y XX.

❖ **Sexado por PCR convencional (embriones y adultos).**

El sexo de los embriones de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>, se identificó utilizando la técnica de PCR (Fig. 3). Con esta técnica se detecta la presencia del gen *Zfy1* (Moreno-Mendoza *et al.*, 2004) el cual está ubicado en el cromosoma Y, mediante amplificación de una banda de 600 pb. Esto permite establecer el sexo cromosómico e identificar los individuos que presentan reversión sexual. Como control interno se utilizaron oligonucleótidos para la amplificación de  $\beta$ -Actina que producen una banda de aproximadamente 243 pb y sirven como indicadores de presencia de DNA en las muestras tratadas. En el caso de embriones se utilizan restos del cuerpo para el sexado y en los ratones postnatales y adultos se toma una muestra de cola o se utilizan restos corporales en caso de ser sacrificados. El producto de PCR se corre en un gel de Agarosa (Gibco) al 1.5% en amortiguador Tris/Ácido Acético/EDTA (TAE) 1X y Bromuro de Etidio (0.25 mg/ml; Bio-Rad) para visualizar las bandas. Los oligonucleótidos y las condiciones de PCR utilizadas se muestran en el anexo 1. 🐭




**Figura 3.** Sexado por PCR. Amplificación de una secuencia de 600 pb correspondiente al gen *Zfy1* ubicado en el cromosoma Y. Se muestran las bandas correspondientes a  $\beta$ -Actina (243 pb) de todos los embriones y las bandas de *Zfy1* en los embriones XY. Se utilizó un marcador molecular de 100 bp.

## 2. Obtención de los embriones y disección de las gónadas.

En el presente trabajo se manejaron dos cepas de ratones normales (CD-1 y B6) y la cepa con reversión sexual B6.Y<sup>TIR</sup>. Los animales se conservaron en condiciones de bioterio, bajo el cuidado del personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se mantuvieron en ciclos de luz/ oscuridad de 12 por 12 horas con alimento y agua disponible.

Se utilizaron hembras gestantes de las tres cepas a los 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. Las hembras se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvieron los embriones. Los embriones se separaron del útero, se mantuvieron sin membranas embrionarias en condiciones estériles y se sacrificaron por decapitación para la disección de sus gónadas, las cuales se obtuvieron por pares.

Las muestras que se usaron para inmunofluorescencia se extrajeron con mesonefros y se fijaron en Paraformaldehído (PFA; Sigma) al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS; Gibco). Las gónadas que se usaron para el análisis de RT-PCR se aislaron del mesonefros y se almacenaron inmediatamente con Trizol (Invitrogen) a -70°C hasta ser procesadas.

Las características morfológicas de las gónadas de los embriones CD-1 y B6 a los 12.5 y 13.5 *dpc* permiten conocer su sexo por identificación directa. Los machos presentan testículos en los que se pueden distinguir los cordones testiculares. Las hembras presentan una morfología homogénea. Los embriones de 11.5 *dpc* se sexaron por la técnica de amnios y PCR antes descritas. 

## 3. Inmunofluorescencias.

Se manejó la técnica de inmunofluorescencia para la detección de la proteína de los genes de interés en los linajes celulares previamente reportados en ovarios y testículos de ratones normales.

---

---

### ❖ Protocolo General.

Se disectaron gónadas por pares de embriones de 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc* y se fijaron en PFA durante 15 minutos, se lavaron rápidamente con PBS y se incubaron con Sacarosa (Sigma) al 30% en PBS a 4°C por toda la noche. Las gónadas se incluyeron en medio OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA) y se congelaron a -70°C para obtener cortes seriados de tejido de 20 µm de grosor. Los cortes se lavaron con PBS, después se permeabilizaron con Tritón X100 (Sigma) al 1% en PBS, nuevamente se lavaron con PBS y se dejaron incubando por dos horas con albumina bovina (Sigma) al 1% en PBS. Los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios específicos a 4 °C por toda la noche. Las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente por una hora a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron los cortes con PBS y se montaron con solución DAKO (Medio de montar fluorescente; Dako Cytomation) para su posterior observación en el microscopio confocal.

Como control negativo de los experimentos se trabajaron muestras de cortes que fueron incubadas sin el anticuerpo primario y con el anticuerpo secundario correspondiente. Este procedimiento se siguió para cada uno de los anticuerpos primarios de interés y se realizó la técnica para la detección de dos y tres anticuerpos de manera simultánea.

### ❖ Anticuerpos y Diluciones.

En la técnica de inmunofluorescencia se usaron los siguientes anticuerpos primarios y secundarios diluidos en albumina bovina:

1. Anti-SOX9 de humano, policlonal hecho en conejo donado por el Dr. V. Harley; específico de células de Sertoli (núcleo). Dilución 1:250.
2. Anti-MIS (C20), policlonal hecho en cabra de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (sc6886); específico de células de Sertoli (citoplasma). Dilución 1:250.
3. Anti-DDX4/MVH (VASA), policlonal hecho en conejo de Abcam MA, USA (ab13840); específico de células de la línea germinal (citoplasma). Dilución 1:500.

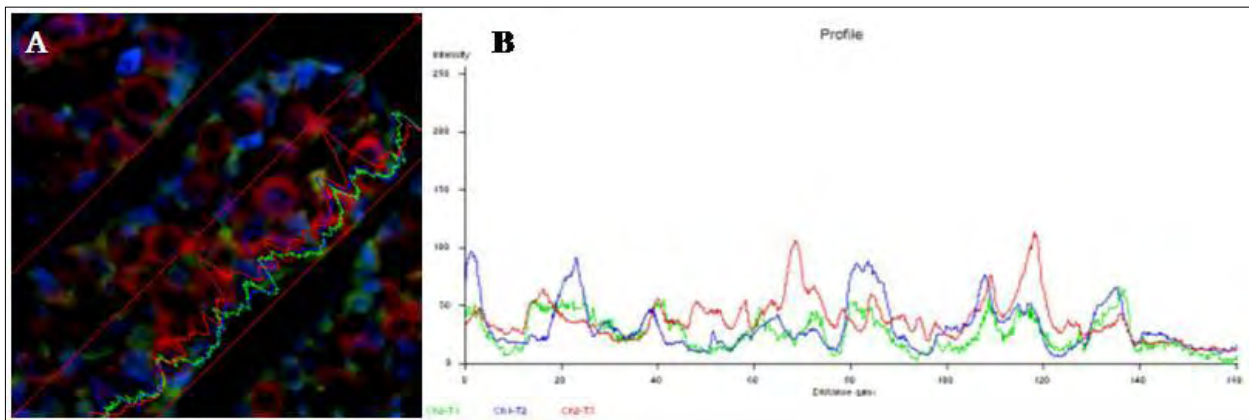
4. Anti-HSD3B1, monoclonal hecho en ratón de Abcam MA, USA (ab55268); específico de células esteroideas o de Leydig (citoplasma). Dilución 1:500.
5. Anti-Laminina, policlonal hecho en conejo de Sigma, Missouri, USA (L9393); específico de células productoras y sitios de almacenamiento de la proteína. Dilución 1:500.
6. Anti-Testosterona, policlonal hecho en conejo de Abcam MA, USA (ab8557); marcador de células esteroideas y sitios de almacenamiento de la hormona. Dilución 1:50.
7. Anti-Wnt4, policlonal hecho en cabra de Abcam MA, USA (ab15699), marcador de células somáticas principalmente femeninas. Dilución 1:250.
8. Anti-Conejo producido en cabra IgG CyTM5 conjugado de Zymed, San Francisco, Cal. USA (81-6116). Dilución 1:100.
9. Anti-Cabra producido en conejo IgG FITC conjugado de Calbiochem, La Jolla, CA. USA (401514). Dilución 1:100.
10. Anti-Conejo producido en cabra IgG Rodamina conjugado de Calbiochem, La Jolla, CA. USA (401321). Dilución 1:100.
11. Anti-Ratón producido en conejo IgG FITC conjugado de Zymed, San Francisco, Cal. USA (61-6511). Dilución 1:100.

❖ **Análisis de imágenes por microscopia confocal.**

Los cortes tratados por inmunofluorescencia se analizaron con un microscopio confocal de la marca Zeiss modelo LSM 5 (Carl Zeiss, Inc) equipado con laser de Argón-Kriptón y Helio-Neón y usando los filtros BP 459-490 y 546/12. Los fluorógenos Cy5, Fluoresceína y/o Rodamina en inmunotinciones dobles o triples fueron detectados de manera simultánea, designándoles un color diferente a cada uno (azul, verde o rojo respectivamente). Las imágenes adquiridas se guardaron en formato LSM.

### ❖ Cuantificación de fluorescencia.

Las imágenes adquiridas por microscopia confocal fueron obtenidas bajo las mismas condiciones, cuidando que la señal máxima de fluorescencia no se saturara. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se llevo a cabo con el programa Start LSM Image Browser. Para medir la intensidad de fluorescencia, se marcaron líneas de prueba aleatorias sobre secciones de las gónadas y se obtuvo el valor absoluto de intensidad (Fig. 4). Cada valor de intensidad fue determinado como el promedio de los valores de intensidad de todos los puntos dentro de la línea de prueba. Se marcaron un mínimo de cinco líneas de prueba para cada una de las secciones examinadas. Para cada una de las gónadas se analizaron al menos dos secciones.



**Figura 4.** Cuantificación de fluorescencia. Inmunofluorescencia triple con una línea de prueba sobre la sección mostrando la intensidad de fluorescencia de los tres marcadores (A). Gráfica de intensidad de fluorescencia para cada uno de los marcadores detectados (B).

### ❖ Análisis estadístico.

Los datos de cuantificación de la fluorescencia fueron obtenidos de al menos tres muestras provenientes de experimentos separados. Los resultados se presentaron como valores promedio de los diferentes experimentos  $\pm$  su desviación estándar. Las diferencias significativas se obtuvieron realizando un análisis multivariado de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Para la realización del análisis se utilizó el programa estadístico Stat Plus 2007 Professional (Statistical Analysis Software). 🐭

#### 4. Extracción de RNA total y RT-PCR.

##### ❖ Extracción de RNA total.

Las gónadas disectadas para análisis de RNA mensajero se recolectaron por pares, se congelaron inmediatamente con 50  $\mu$ l de Trizol (Invitrogen) en hielo seco y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser procesadas. La extracción de RNA total se realizó mediante la técnica de Trizol-Cloroformo. Las gónadas se homogeneizaron con Trizol y se dejaron incubando con Cloroformo (J. T. Baker) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. El tiempo de precipitación de RNA en Isopropanol (J. T. Baker) fue de toda la noche para optimizar la extracción. El RNA se obtuvo por centrifugación a 14 000 rpm durante 30 minutos, el botón de RNA se lavo con Etanol (J. T. Baker) 80% en agua tratada con Di Etil Pirocarbonato (DEPC; Sigma). Se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por 10 minutos y el RNA se resuspendió en agua de DEPC.

##### ❖ Cuantificación del RNA.

La concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) de RNA total se cuantificó con un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) usando una dilución de 1:100 de RNA en agua de DEPC. Se realizaron lecturas de absorbancia a 260 y 280 nanómetros (nm) para obtener la concentración y pureza. El valor mínimo de pureza fue de 1.5, (obtenido del cociente de 260 y 280 nm), y el optimo de 2 (dos partes de RNA por una de proteínas). Si la concentración de RNA de las gónadas embrionarias lo permitió, se corrieron 2  $\mu$ l de RNA en un gel de agarosa al 2 % en TAE 1X y Bromuro de Etidio (0.25 mg/ml; Bio-Rad) para observar la integridad del RNA (Fig. 5).



**Figura 5.** Integridad de RNA total. Gel representativo mostrando las bandas características de muestras conteniendo RNA total de gónadas de embriones CD-1 de 13 *dpc*.



### ❖ Tratamiento del RNA total con DNasa I.

Para eliminar contaminación por DNA en las muestras y prevenir la amplificación de este en la técnica de RT-PCR se realizó un tratamiento con la enzima Desoxyribonucleasa I (DNasa I; Invitrogen). Se incubó 1 µg de RNA total con 1 µl de DNasa I (1 U/µl) y 1 µl de Amortiguador 10X (Reaction Buffer) a 37°C por 30 minutos, posteriormente la enzima se inactivó con 1 µl de EDTA (25 mM, pH 8.0, Sigma) a 65°C por 10 minutos. Este tratamiento se realizó antes de llevarse a cabo la técnica de RT-PCR para prevenir contaminación con DNA.

### ❖ RT-PCR convencional.

Se utilizaron 150 ng de RNA total tratado con DNasa I para la amplificación por medio de la técnica de RT-PCR de un solo paso. Se trabajó con el Kit Super Script One Step RT-PCR (Invitrogen) para la amplificación de los fragmentos de interés. El volumen final de cada reacción fue de 20 µl. Cada reacción consistió de una mezcla que contuvo el RNA, 10 µl de amortiguador de reacción (2X Reaction Mix), 2 µl de oligonucleótidos específicos (10 µM) y 0.5 µl de la enzima RT/Platinum Taq Mix.

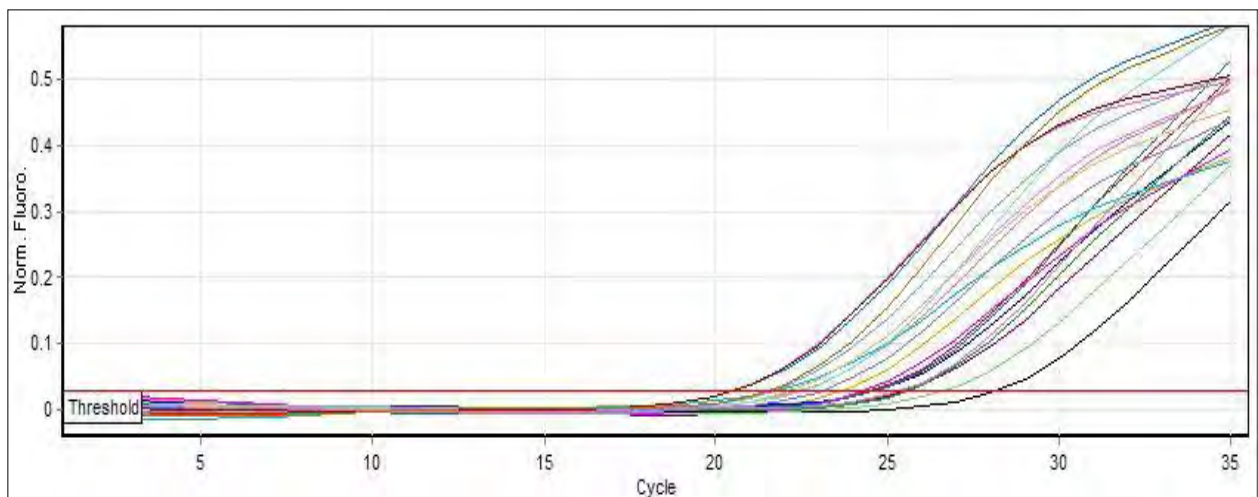
Las condiciones de RT-PCR para los oligonucleótidos utilizados se estandarizaron según los reportes previos para cada gen (Anexo 2). Sry, Mis, 3β-Hsd1 (Bouma *et al.*, 2004), Sox9 (Moreno-Mendoza *et al.*, 2004), Wnt4 (Mohamed *et al.*, 2004), Stra8 (Koubova *et al.*, 2006), Rspo1 (Nam *et al.*, 2007) y Cyp19a1 (Stromstedt *et al.*, 1996). La amplificación de β-Actina se usó como control interno (Moreno-Mendoza *et al.*, 2004). Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en el Anexo 3.

Para confirmar la amplificación de los fragmentos correspondientes, el producto de RT-PCR se corrió en un gel de Agarosa (Gibco) al 1% en TAE 1X y Bromuro de Etidio. Los geles se observaron con un trans-iluminador ultravioleta y se fotografiaron. Los tamaños de los fragmentos reportados son los siguientes:

Sry presenta una banda de 124 pb, Mis una de 117 pb, Sox9 de 310 pb, Wnt4 de 345 pb, Stra8 de 151 pb, Rspo1 de 346 pb,  $\beta$ -Hsd1 de 129 pb, Cyp19a1 de 579 pb y de  $\beta$ -Actina una banda de 243 pb.

### ❖ RT-PCR en Tiempo Real.

Para cuantificar la expresión relativa de cada uno de los genes de interés se adicionó el reactivo Syber Green I (Amresco) a la reacción de RT-PCR convencional previamente estandarizada. El reactivo Syber Green I es un marcador intercalante que permite detectar los fragmentos de doble cadena amplificados durante la reacción de RT-PCR (Ponchel *et al.*, 2003). Cuando dicho reactivo se une a fragmentos de doble cadena se produce fluorescencia que puede ser detectada (Fig. 6). El reactivo Syber Green I se trabajó como una dilución de 1: 10 000 en agua libre de RNAsas (Gibco). La detección de la amplificación se llevó a cabo utilizando el equipo Rotor Gene Thermocycler (RG-300, Corbett-Research) y el programa ABI Prism 7000 Sequence Detection System ubicados en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. La expresión relativa de cada gen fue normalizada con los valores de expresión de  $\beta$ -Actina y el análisis de los datos se realizó usando el método  $2^{-DD/CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001).




**Figura 6.** RT-PCR en tiempo real. Gráfica de cuantificación de fluorescencia (Syber Green I) obtenida por RT-PCR en tiempo real. Amplificación de secuencias específicas para los genes Sry, Sox9, Mis, Wnt4, Stra8, Rspo1 y  $\beta$ -Actina como control interno.

### ❖ **Análisis estadístico.**

Los valores de expresión relativa para cada gen se presentan como los promedios de cinco determinaciones independientes  $\pm$  su desviación estándar. Se usó el programa estadístico Stat Plus 2007 Professional para evaluar las diferencias significativas. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Para conocer el grado de relación en la dinámica de expresión entre los genes dentro de las gónadas embrionarias, se obtuvo el coeficiente de correlación (R de Pearson) mediante un análisis de correlación para datos continuos e independientes.

### ❖ **Secuenciación.**

Se llevo a cabo la purificación y secuenciación de las bandas observadas para cada producto de RT-PCR con el fin de conocer la especificidad de los oligonucleótidos. Se corrieron los productos de RT-PCR en un gel de agarosa al 1% para visualizar las bandas correspondientes. Cada una de las bandas se aisló del gel de agarosa y se almacenaron a 4°C hasta ser procesadas. La purificación se realizó utilizando el Kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN). Los fragmentos purificados se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de investigaciones Biomédicas, UNAM. Los productos obtenidos se compararon con los reportes del Banco de Genes y se obtuvo su porcentaje de similitud. Los fragmentos para cada gen y su porcentaje de similitud se muestran en el Anexo 4. 

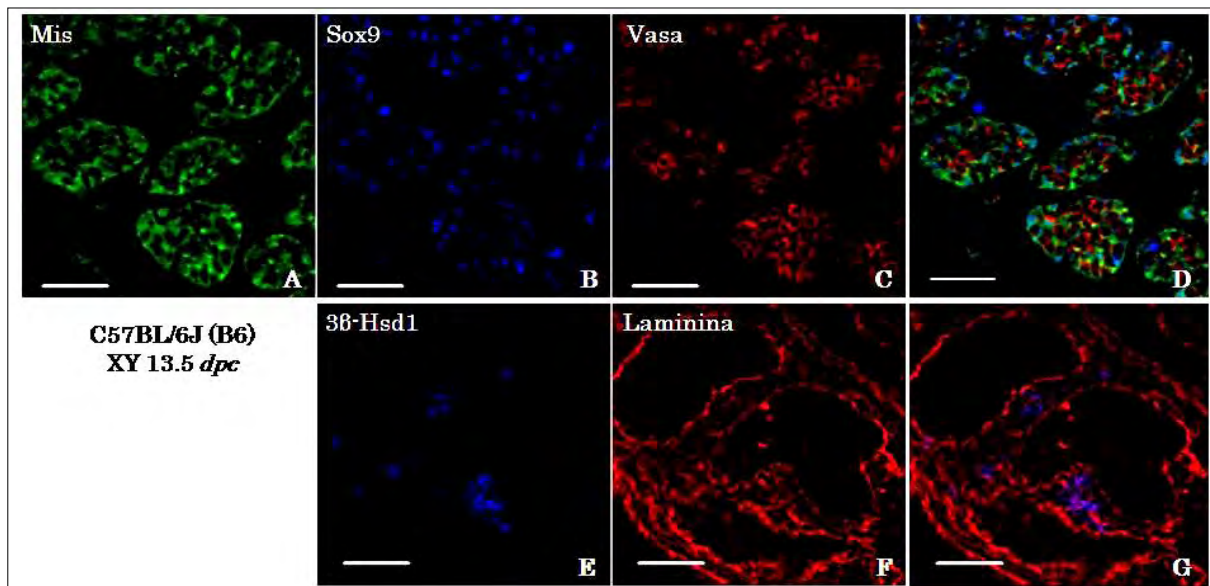
## ❖ Resultados.

## 1. Detección de proteínas y análisis morfológico.

Cada uno de los anticuerpos utilizados en las inmunofluorescencias resultó ser específico para un tipo celular dentro de la gónada embrionaria en los estadios estudiados (Fig. 7). La localización celular de cada uno de los genes es la siguiente:

- ❖ SOX9 se encontró en el núcleo de células de Sertoli.
- ❖ MIS se observó en el citoplasma de células de Sertoli.
- ❖ VASA se detectó en el citoplasma de las células germinales.
- ❖  $3\beta$ -HSD1 se localizó en el citoplasma de células esteroideogénicas.
- ❖ Laminina marcó los sitios de almacenamiento de dicha proteína.

Las técnicas de doble y triple inmunofluorescencia permitieron identificar las proteínas de manera simultánea, lo cual es de gran importancia cuando se utilizan muestras pequeñas como en el caso de las gónadas embrionarias. Se realizaron inmunofluorescencias triples (Fig. 7, A-D) contra las proteínas de SOX9, MIS y VASA y dobles para  $3\beta$ -HSD1 y Laminina (Fig. 7, E-G), en gónadas de embriones de las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> en edades de 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*.



**Figura 7.** Localización de proteínas específicas. Inmunofluorescencias dobles y triples mostrando la detección de las proteínas MIS (A), SOX9 (B), VASA (C),  $3\beta$ -HSD1 (E) y Laminina (F) en cortes testiculares de un embrión B6 macho de 13.5 *dpc*. Detección simultánea de dos (G) y tres (D) proteínas. Barra = 50  $\mu$ m.

---

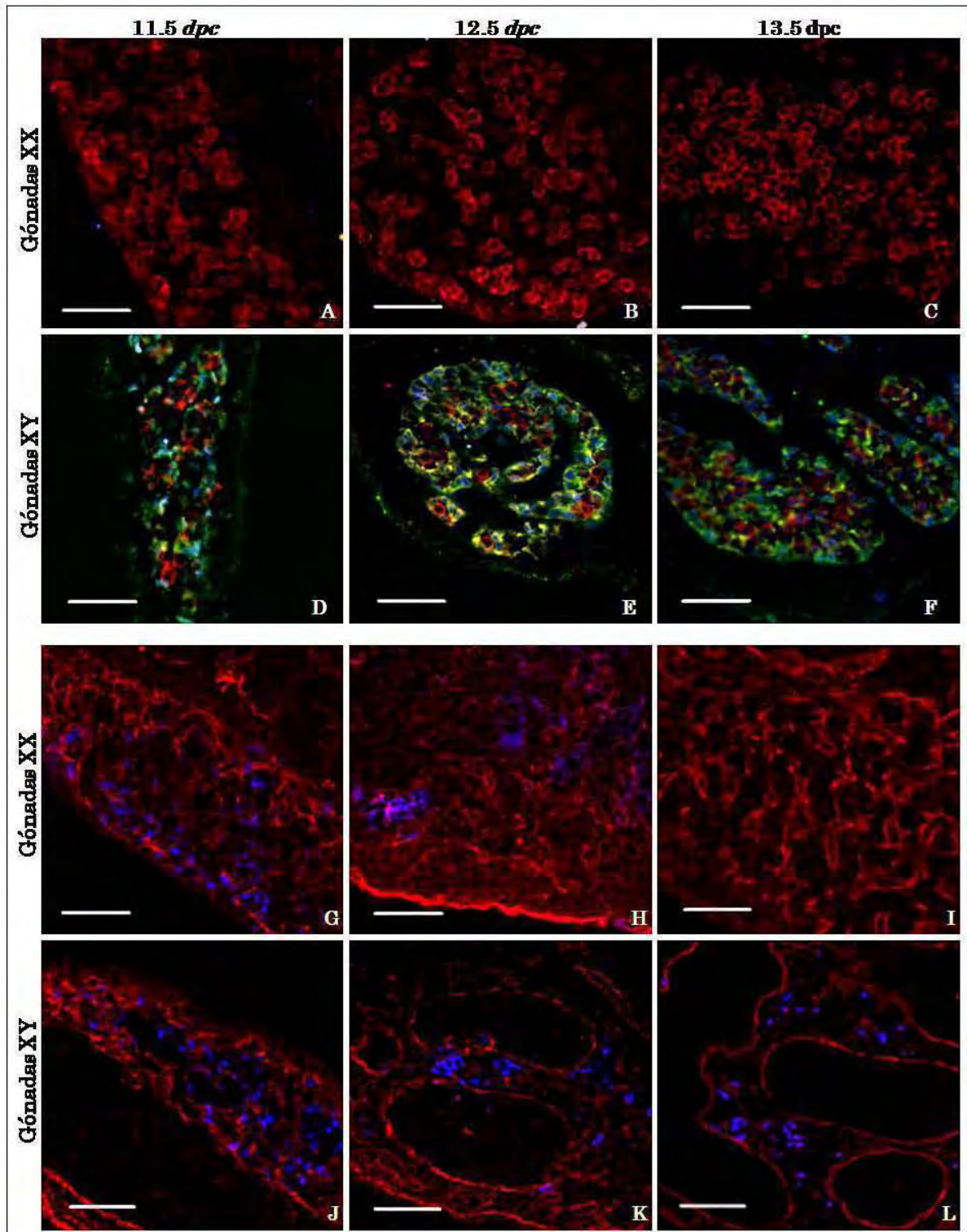
---

### ❖ Cepa CD-1.

El análisis por inmunofluorescencia de las gónadas de embriones de la cepa CD-1 mostró una clara diferencia entre hembras (gónadas XX) y machos (gónadas XY) en las edades estudiadas (11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*).

En las inmunofluorescencias triples la expresión de la proteína VASA se detectó tanto en gónadas XX como en XY evidenciando a las células germinales (Fig. 8). Las gónadas XY expresaron las proteínas SOX9 y MIS (características de testículo) a partir de los 11.5 *dpc* (Fig. 8, D-F). Estas proteínas no se detectaron en gónadas XX en ninguna de las edades analizadas (Fig. 8, A-C). Los cordones testiculares son evidentes a los 12.5 y 13.5 *dpc* observándose a las células de Sertoli (marcadas con SOX9 y MIS) rodeando a las células germinales (Fig. 8, E-F). A los 11.5 *dpc* no se encontraron cordones testiculares; sin embargo, sí se detectaron las proteínas SOX9 y MIS producidas por las células de Sertoli diferenciadas (Fig. 8, D).

Las inmunofluorescencias dobles mostraron que tanto gónadas XX como XY contienen sitios de almacenamiento de la proteína Laminina, los cuales se distribuyen de manera diferente entre los dos sexos conforme avanza la edad (Fig. 8). En gónadas XX la proteína Laminina se observó formando pequeños cordones sexuales (Fig. 8, G-I). En gónadas XY, los cordones sexuales se observaron a los 11.5 *dpc*, y a los 12.5 y 13.5 *dpc* la Laminina evidencia la formación de los cordones testiculares que contienen a las células germinales y de Sertoli (Fig. 8, J-L). La proteína  $3\beta$ -HSD1 se detectó tanto en gónadas XX como en XY; sin embargo, su distribución cambió conforme la edad y el sexo de las gónadas. En las gónadas XX, a los 11.5 *dpc* la proteína se observó distribuida ampliamente, a los 12.5 *dpc* la expresión de la proteína se redujo a pequeños grupos celulares y a los 13.5 *dpc* no se detectó (Fig. 8, G-I). Las gónadas XY expresaron la proteína  $3\beta$ -HSD1 ampliamente a los 11.5 *dpc*; sin embargo, a los 12.5 y 13.5 *dpc* su expresión se detectó en grupos celulares ubicados por fuera de los cordones testiculares (Fig. 8, J-L).



**Figura 8.** Detección de proteínas en la cepa CD-1. Inmunofluorescencias dobles y triples en gónadas de embriones CD-1 de 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. Se observa la expresión de la proteína VASA (rojo) en gónadas XX (A-C), la expresión de las proteínas SOX9 (azul), MIS (verde) y VASA (rojo) en gónadas XY (D-F), la expresión de la proteína  $3\beta$ -HSD1 (azul) y Laminina (rojo) tanto en gónadas XX como en las XY (G-L). Barra = 50  $\mu$ m.

---

---

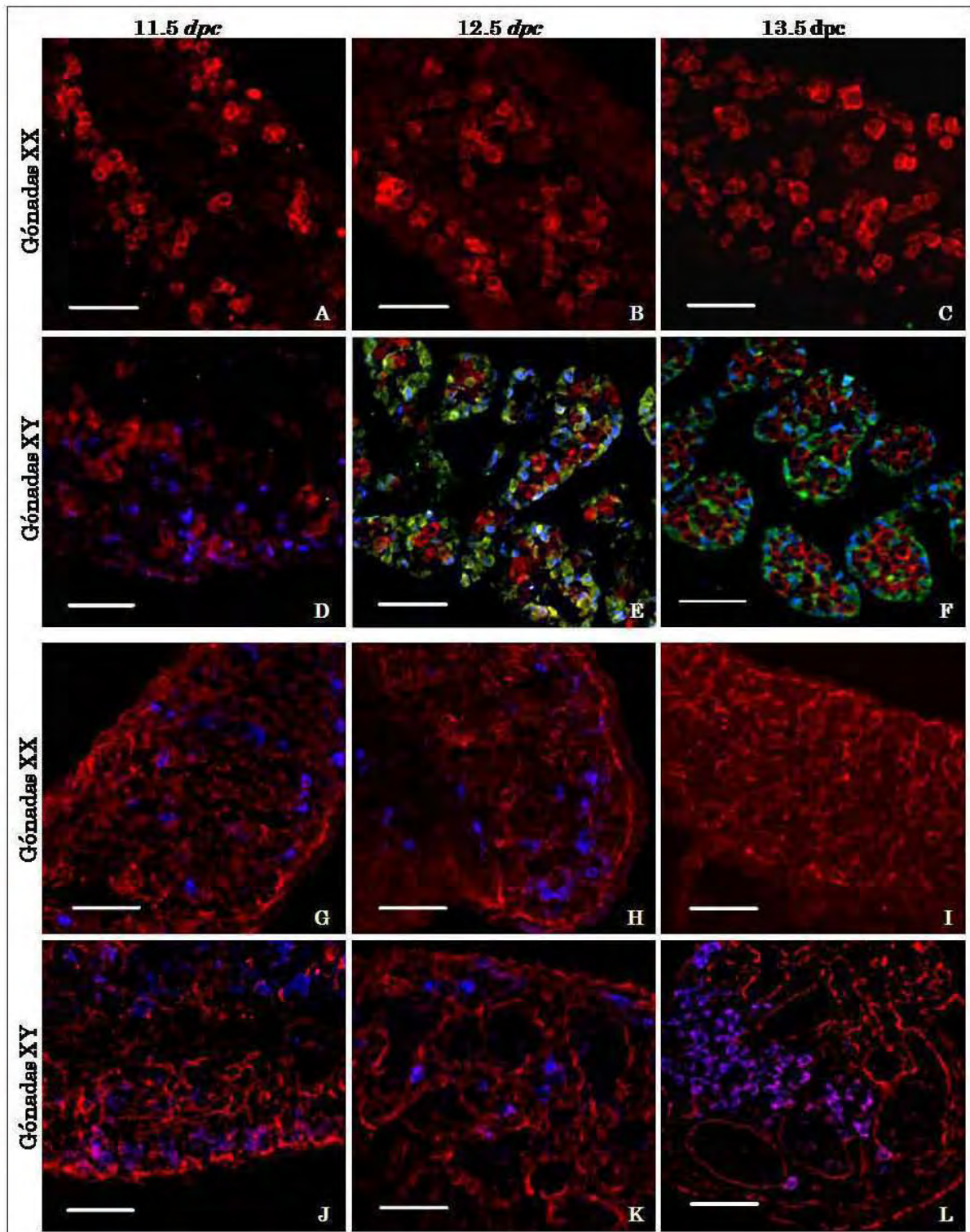
### ❖ Cepa C57BL/6J (B6).

En las gónadas de embriones B6 se observó un patrón de expresión similar al encontrado en la cepa CD-1. La proteína VASA se localizó en las células germinales de todas las gónadas analizadas. Las gónadas XX (B6) tampoco expresaron los marcadores SOX9 y MIS (Fig. 9, A-C). A diferencia de la cepa CD-1, las gónadas XY de la cepa B6 expresaron la proteína MIS a partir de los 12.5 *dpc*, por lo que a los 11.5 *dpc* solo se observó la expresión de SOX9 como marcador testicular. Los cordones testiculares fueron evidentes a partir de los 12.5 *dpc* (Fig. 9, D-F).

La distribución de las proteínas 3 $\beta$ -HSD1 y Laminina en gónadas B6 es similar al observado en la cepa CD-1 (Fig. 9, G-L). La expresión de 3 $\beta$ -HSD1 se detectó a los 11.5 y 12.5 *dpc* en gónadas XX y su pérdida se observó a los 13.5 *dpc*. En gónadas XY la proteína 3 $\beta$ -HSD1 se localizó en grupos celulares de la región intersticial. La formación de los cordones testiculares, evidenciado por la Laminina también se observó a partir de los 12.5 *dpc*.

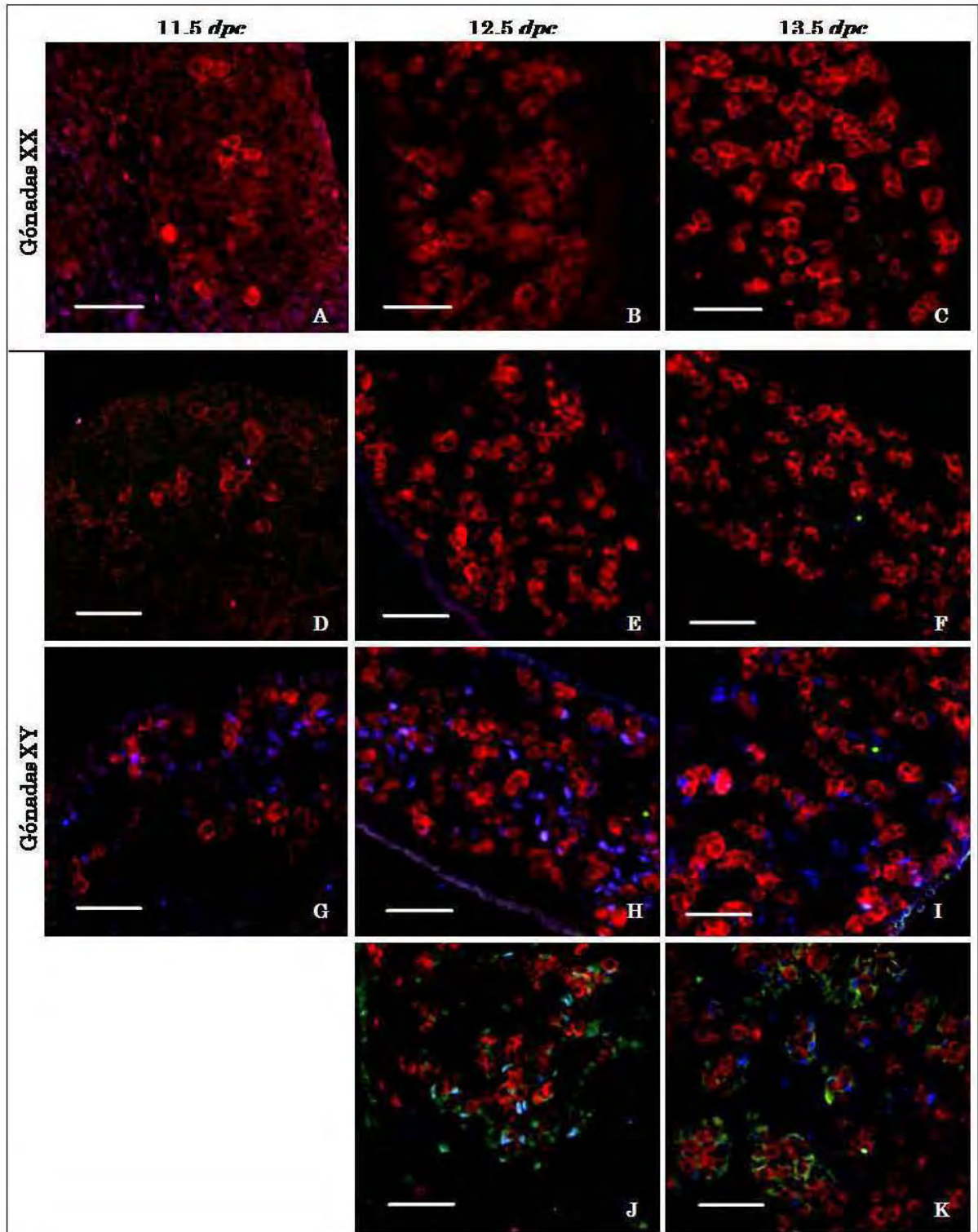
### ❖ Cepa B6.Y<sup>TIR</sup>.

Las gónadas XX de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>, al igual que en las gónadas XX de las cepas CD-1 y B6, expresaron únicamente la proteína de VASA en el citoplasma de las células germinales (Fig. 10, A-C). Considerando los marcadores testiculares SOX9 y MIS, las gónadas XY de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> mostraron diferentes fenotipos (Fig. 9, D-K). A los 11.5 *dpc* fueron de dos tipos, en algunas no se detectó ninguno de los marcadores como en el caso de las gónadas XX. En otras solo se observó la expresión de SOX9 como las gónadas B6 en la misma edad. A los 12.5 y 13.5 *dpc* además de los dos fenotipos antes mencionados se observó un tercer fenotipo en el que se detectó la expresión de SOX9 y MIS. Los cordones testiculares fueron observados en algunas de las gónadas que expresaron SOX9 y MIS. Otras de las gónadas que expresaron ambos marcadores no mostraron diferenciación de cordones testiculares, este fenotipo es similar al observado en las gónadas XY de 11.5 *dpc* de la cepa CD-1.



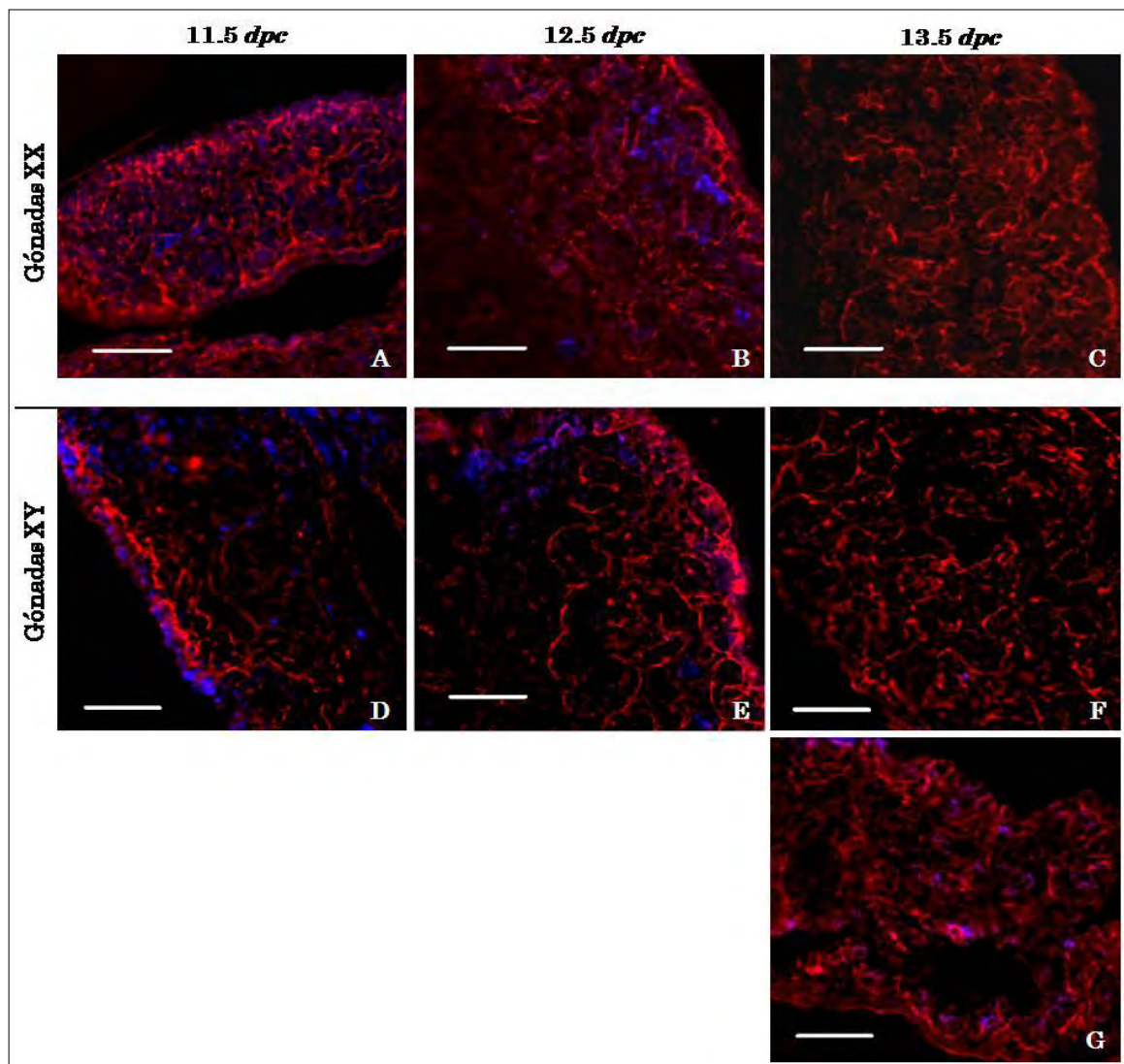
**Figura 9.** Detección de proteínas en la cepa B6. Inmunofluorescencias dobles y triples en gónadas de embriones B6 de 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. Se observa la expresión de la proteína VASA (rojo) en todas las gónadas y la expresión de SOX9 (azul, D-F) y MIS (verde, E-F) es detectada en las gónadas XY. La expresión de las proteínas 3 $\beta$ -HSD1 (azul) y Laminina (rojo) se detecta tanto en gónadas XX como en XY (G-L). Barra = 50  $\mu$ m.





**Figura 10.** Detección de proteínas en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>. Inmunofluorescencia triple en gónadas de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. Se muestran las células germinales con la marca para VASA (rojo) y se observan los diferentes fenotipos gonadales considerando la expresión de los marcadores testiculares SOX9 (azul) y MIS (verde). En las gónadas XX (A-C) solo se detecta la proteína de VASA y en las gónadas XY (D-K) se observan los marcadores testiculares SOX9 y MIS.

Todas las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> mostraron una distribución de Laminina homogénea, la cual permitió notar los cordones sexuales (Fig. 11). A diferencia de las cepas CD-1 y B6, en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> no se observaron cordones testiculares delimitados por Laminina. En las gónadas XX, el patrón de expresión de la proteína 3 $\beta$ -HSD1 fue similar al observado en las cepas CD-1 y B6, perdiéndose su expresión a los 13.5 *dpc* (Fig. 11, A-C). A los 11.5 y 12.5 *dpc*, todas las gónadas XY expresaron 3 $\beta$ -HSD1; sin embargo, a los 13.5 *dpc* se encontraron gónadas que no expresaron la proteína, mostrando un fenotipo semejante a las gónadas XX de la misma edad (Fig. 11, D-G).

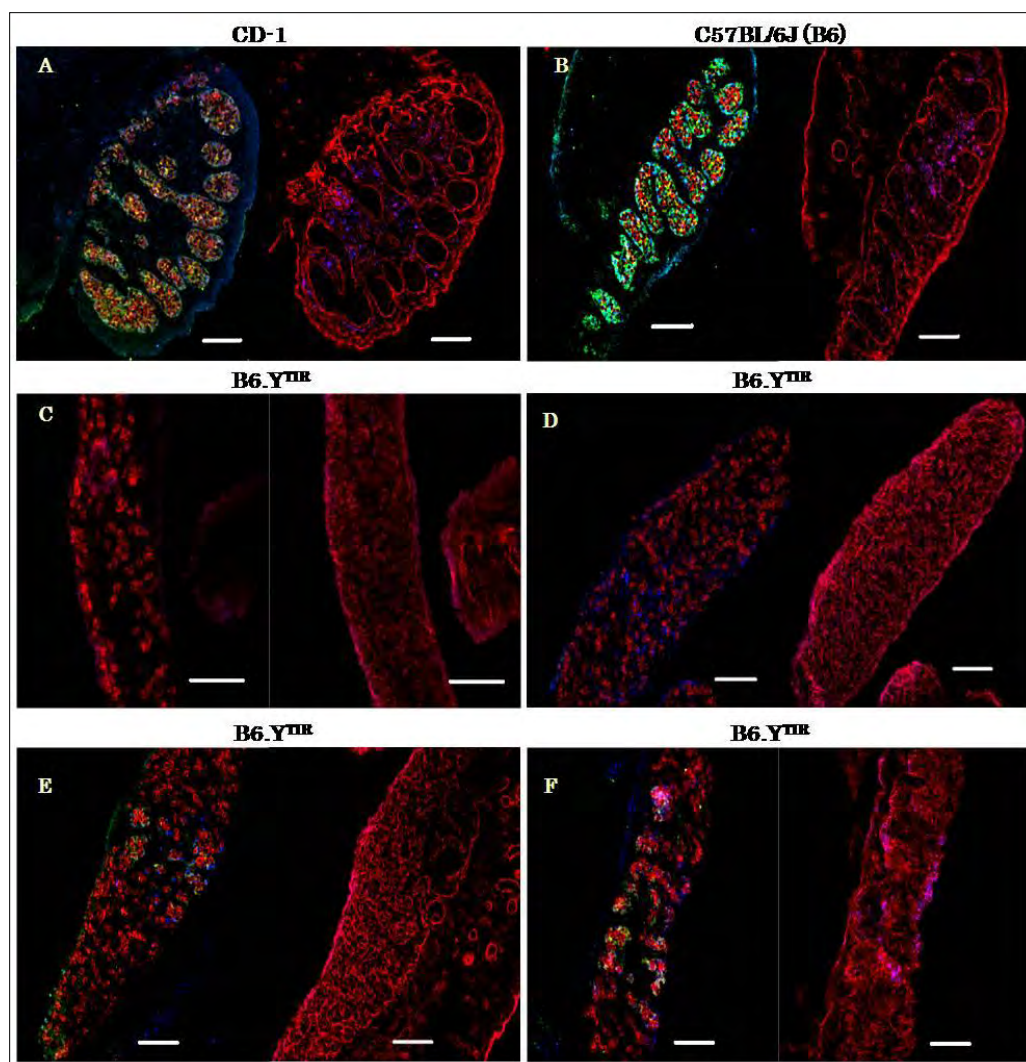


**Figura 11.** Detección de proteínas en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>. Inmunofluorescencia doble en gónadas de embriones B6.Y<sup>TIR</sup> de 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. Se observa la expresión de la proteína 3 $\beta$ -HSD1 (azul) y Laminina (rojo). La proteína 3 $\beta$ -HSD1 se detecta a los 11.5 y 12.5 *dpc* en ambos sexos. A los 13 *dpc* desaparece en las gónadas XX mientras que en las gónadas XY es detectada solo en algunos casos.

### ❖ Diferenciación Gonadal.

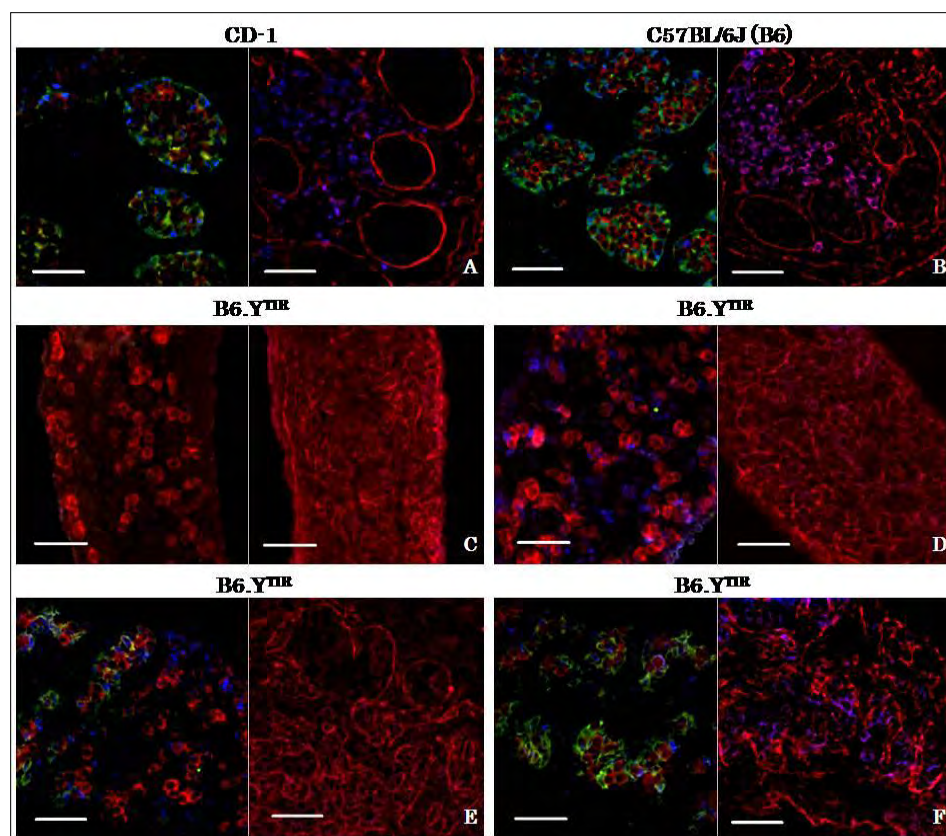
En embriones XY (Fig. 12 y 13) se observaron cuatro tipos de gónadas con diferentes niveles de diferenciación en comparación con testículos de embriones de las cepas CD-1 y B6 a los 13.5 *dpc*.

1. No expresan SOX9, MIS o  $3\beta$ -HSD1 (Fig. 12 C).
2. Solo expresan SOX9 en la región medular (Fig. 12 D).
3. Expresan SOX9 y MIS (Fig. 12 E).
4. Expresan SOX9, MIS y  $3\beta$ -HSD1 (Fig. 12 F).



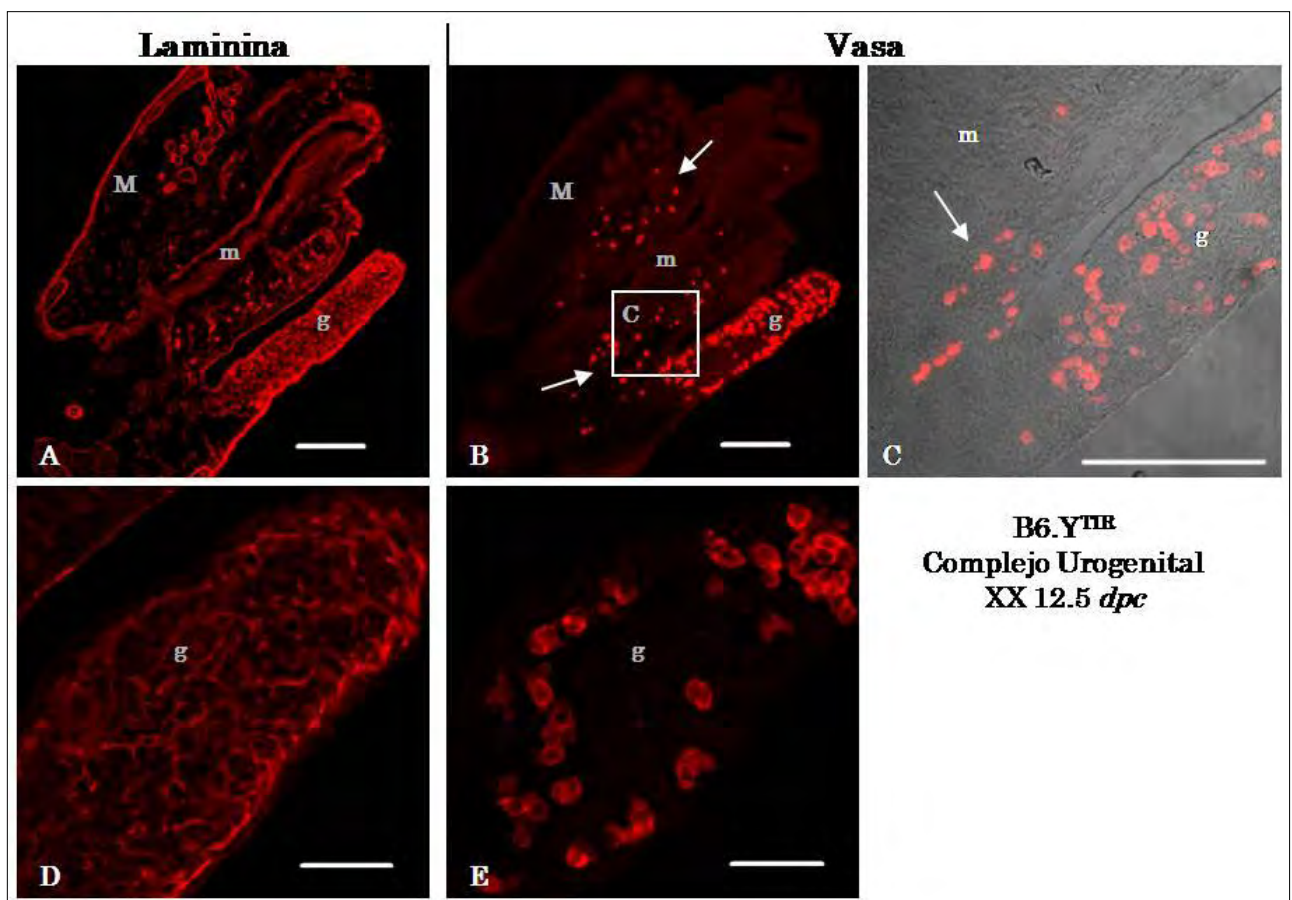
**Figura 12.** Fenotipos gonadales en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>. Inmunofluorescencias dobles y triples en gónadas XY de las cepas CD-1 (A), B6 (B) y B6.Y<sup>TIR</sup> (C-F), mostrando los niveles de diferenciación gonadal a los 13.5 *dpc*. Imágenes de lado izquierdo muestran la detección de SOX9 (azul), MIS (verde) y VASA (rojo); en el lado derecho se muestra la localización de  $3\beta$ -HSD1 (azul) y Laminina (rojo).

A los 13.5 *dpc* las gónadas XY de embriones CD-1 y B6 ya se han diferenciado en testículos (Fig. 13, A y B). La formación de cordones testiculares se evidencia por la acumulación de Laminina en la membrana basal. Las células de Sertoli son marcadas con SOX9 y MIS y las células de Leydig con la proteína  $3\beta$ -HSD1. Las gónadas XY de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 13.5 *dpc* no presentan la morfología observada en las cepas normales (Fig. 13, C-F). La morfología que puede distinguirse según la expresión de los marcadores testiculares muestra que las gónadas XY de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 13.5 *dpc* no forma testículos normales. Solo aquellas gónadas que expresan SOX9 y MIS llegan a formar cordones testiculares que se localizan en la región medular y pueden o no estar expresando la  $3\beta$ -HSD1. En la región medular se encuentran células expresando SOX9 y MIS pero en la región cortical las células somáticas solo expresan SOX9 o ninguno de los dos marcadores (Fig. 13, E y F).



**Figura 13.** Fenotipos gonadales en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>. Inmunofluorescencias dobles y triples en gónadas XY de las cepas CD-1 (A), B6 (B) y B6.Y<sup>TIR</sup> (C-F), mostrando a detalle una comparación entre los fenotipos gonadales de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> con la diferenciación gonadal de las cepas normales CD-1 y B6 a los 13.5 *dpc*. Imágenes de lado izquierdo muestran la detección de SOX9 (azul), MIS (verde) y VASA (rojo); en el lado derecho se muestra la localización de  $3\beta$ -HSD1 (azul) y Laminina (rojo).

Se realizaron cortes histológicos que abarcaron complejos urogenitales, lo que permitió un mejor manejo de las muestras. En la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 12.5 *dpc* se evidenció la gónada por el marcaje de Laminina (Fig. 14, A y D) y se detectó la proteína VASA dentro de la gónada. Estos cortes del complejo urogenital permitieron detectar fluorescencia de la proteína VASA en las regiones del mesenterio adyacente a la gónada. Lo que sugiere que en esta cepa las células germinales a los 12.5 *dpc* continúan migrando y no han terminado de colonizar la gónada embrionaria (Fig. 14, B, C, E).



**Figura 14.** Inmunofluorescencias en complejos urogenitales. Detección de Laminina y VASA en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>. Se localizó la proteína de VASA dentro y fuera de la gónada (B, C, E) a los 12.5 *dpc*. Se detectó el mesonefros (M), el mesenterio (m) y la gónada (g) evidenciados con la fluorescencia de la proteína Laminina (A, D).

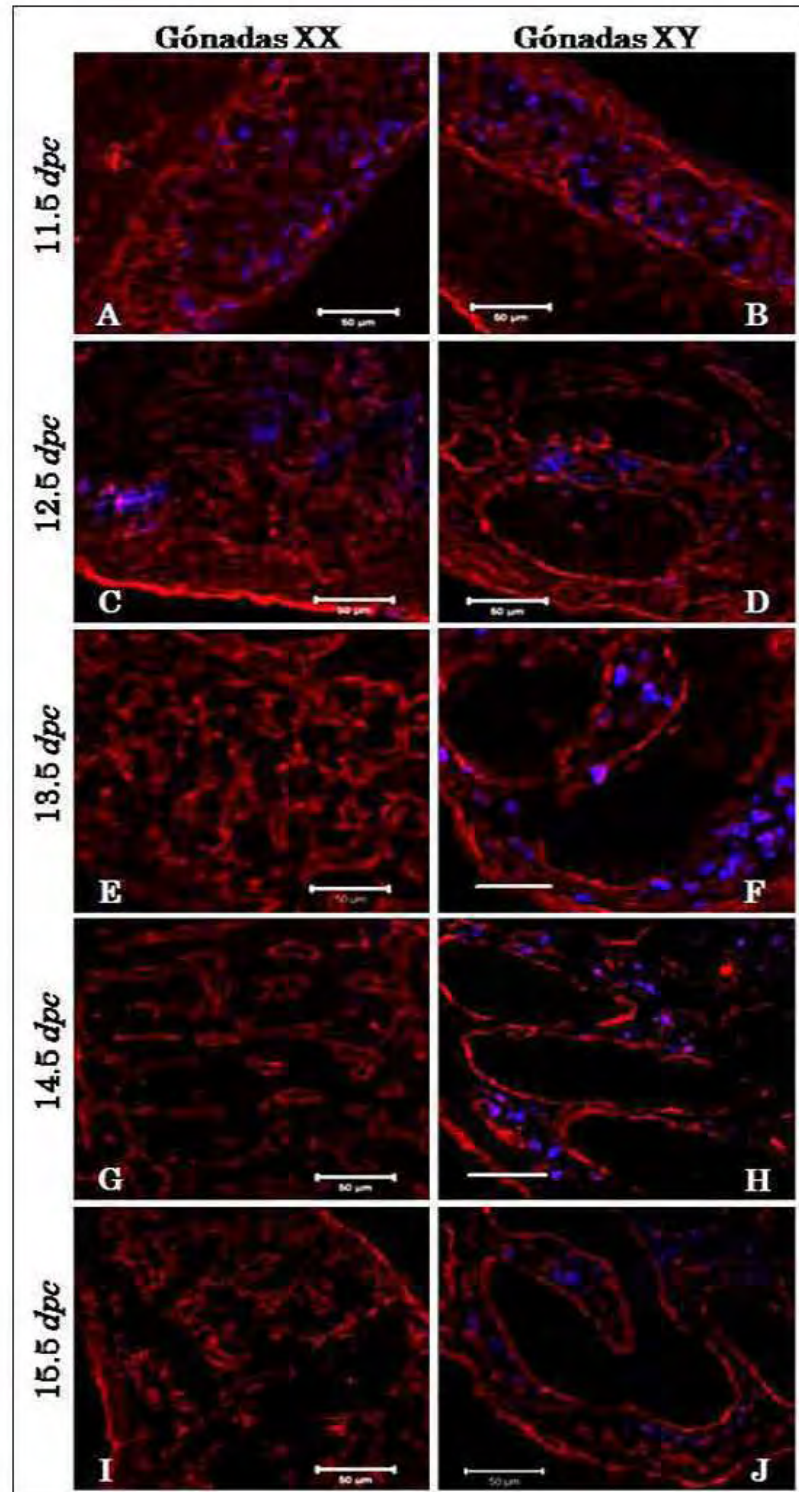
---

---

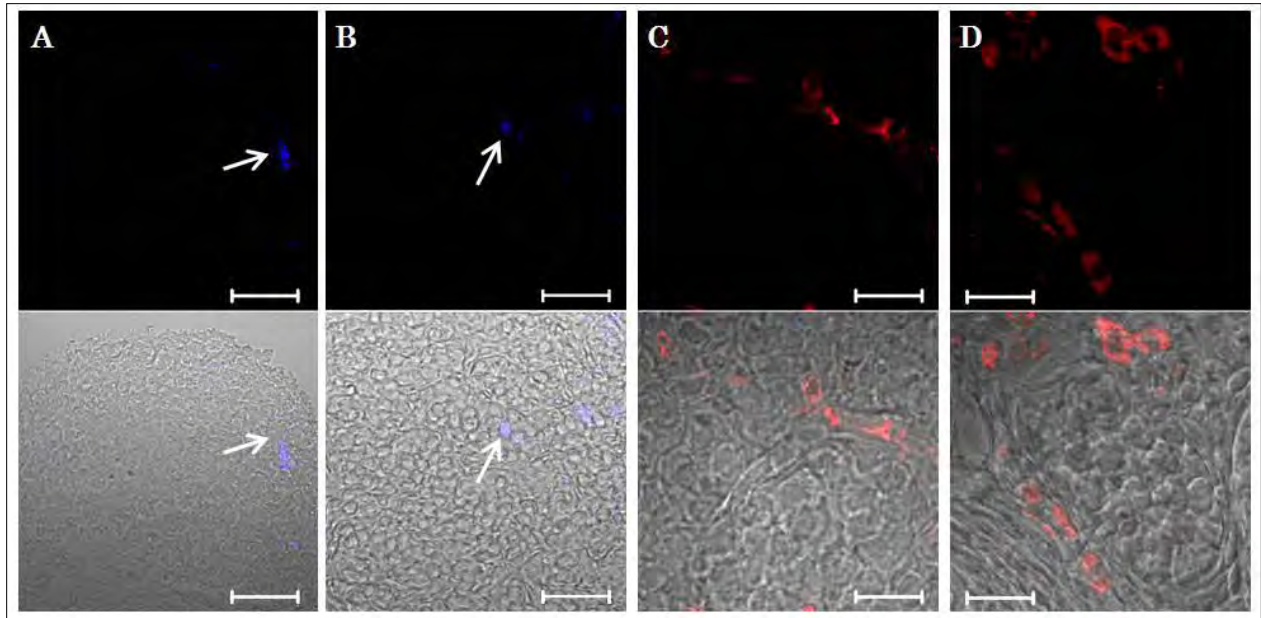
### ❖ Dimorfismo Sexual en gónadas CD-1 normales.

Las inmunofluorescencias dobles realizadas con los anticuerpos para  $3\beta$ -HSD1 y Laminina (Fig. 15) mostraron que la enzima se expresa tanto en hembras como en machos en un patrón dimórfico. Las gónadas XY expresan la proteína  $3\beta$ -HSD1 desde los 11.5 *dpc* y continúa su expresión hasta los 15.5 *dpc*. A partir de los 12.5 *dpc* se localiza específicamente en la región intersticial marcando a las células de Leydig. La detección de Laminina hace evidentes los cordones testiculares que se han diferenciado a partir de los 12.5 *dpc*. Las gónadas XX a los 11.5 y 12.5 *dpc* también expresaron  $3\beta$ -HSD1, aunque a los 13.5 y 14.5 *dpc* la marca se detectó en pocas células (Fig. 16, A, B). A los 11.5 *dpc* la fluorescencia se detecta distribuida en toda la gónada de forma similar a las gónadas XY. Sin embargo a los 12.5 *dpc* la marca se observa en grupos celulares reduciendo el área de expresión. A los 15.5 *dpc* no se observó marca para la proteína. En general, a partir de los 13.5 *dpc* las gónadas XX no expresan la enzima y la localización de Laminina permite observar la formación de cordones ováricos.

La detección de  $3\beta$ -HSD1 se utilizó como marcador testicular, sin embargo se observó que la enzima se detecta en ovarios. Con el objetivo de establecer si el ovario es esteroidogénico se realizaron inmunofluorescencias para detectar la hormona Testosterona y el regulador ovárico WNT4. Se realizaron inmunofluorescencias dobles para la detección de Testosterona y VASA (Fig. 17). Los cordones testiculares fueron evidenciados por la detección de la proteína VASA en las células germinales. Las gónadas XY muestran síntesis de Testosterona a partir de los 12.5 *dpc* y se localiza distribuida en la región intersticial donde se localizan las células de Leydig. En las gónadas XX se detectaron algunas células con marca de Testosterona a los 13.5 y 14.5 *dpc*, antes y después de estas edades no se detectó la proteína. Las marcas de Testosterona detectadas en ovarios se localizaron en células somáticas que se encontraron rodeando a cordones ováricos de manera similar a su distribución en las gónadas XY (Fig. 16, C, D).



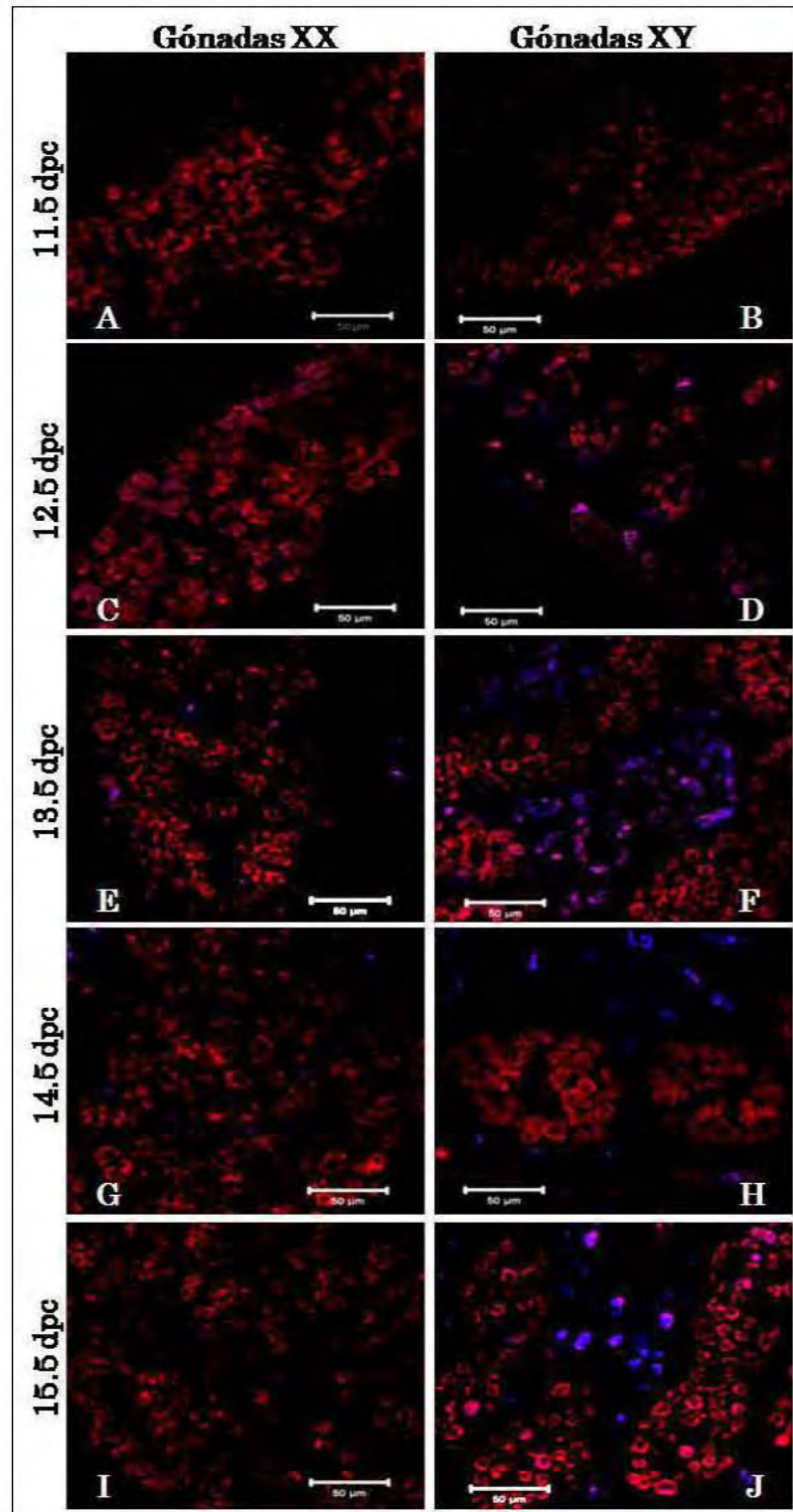
**Figura 15.** Detección de  $3\beta$ -HSD1 y Laminina. Inmunofluorescencia doble marcando la proteína de  $3\beta$ -HSD1 (azul) y Laminina (rojo) en gónadas XX (Panel izquierdo) y gónadas XY (Panel derecho) provenientes de embriones de la cepa CD-1. Las gónadas XY expresan la proteína de  $3\beta$ -HSD1 en todos los estadios analizados y en las gónadas XX se detectó a los 11.5 y 12.5 *dpc*. Los cordones ováricos y testiculares fueron evidenciados por la detección de Laminina en las membranas basales. Barra = 50  $\mu$ m.



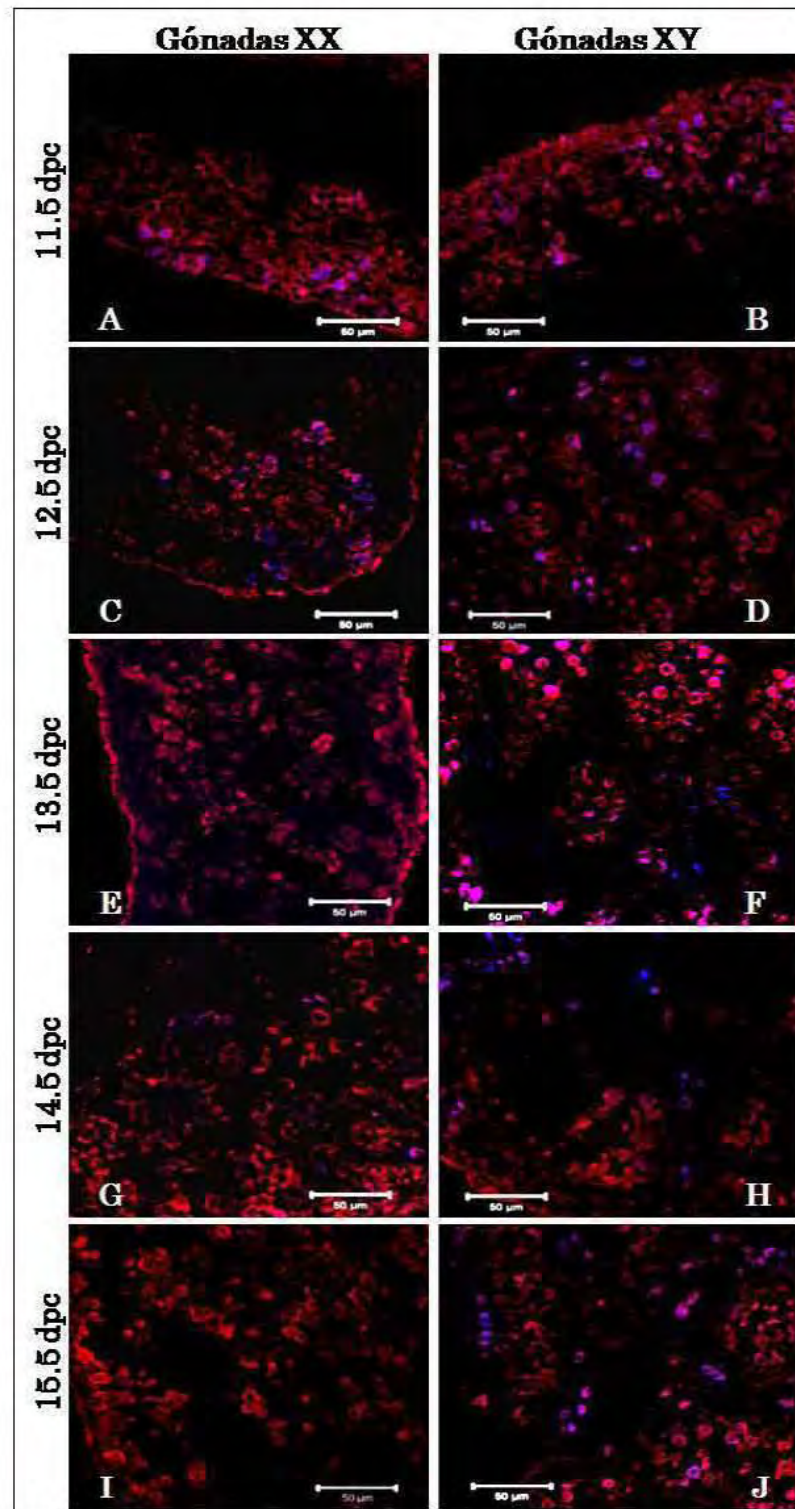
**Figura 16.** Detección de  $3\beta$ -HSD1 y Testosterona. Inmunofluorescencias de  $3\beta$ -HSD1 (Azul) y Testosterona (Rojo). Se muestra la detección de la enzima en algunas células (flechas) dentro de las gónadas XX a los 13.5 (A) y 14.5 (B) *dpc*. Barra = 50 micras. La Testosterona se detectó en gónadas XX (C) a los 14.5 *dpc* en células localizadas en un patrón similar al observado en las gónadas XY (D). Barra = 20 micras.

Se analizó el patrón de expresión del factor de señalización WNT4. La proteína de WNT4 se detectó en las gónadas de ambos sexos en todas las edades analizadas. En la inmunofluorescencia doble para WNT4 /  $3\beta$ -HSD1 (Fig. 18) se observó que estas dos proteínas se expresan en los mismos linajes celulares a los 11.5 y 12.5 *dpc*. La  $3\beta$ -HSD1 se localiza en la región citoplásmica y WNT4 en la membrana plasmática. De los 13.5 a los 15.5 *dpc* la enzima desaparece en las gónadas XX y WNT4 parece ser expresado principalmente en las células germinales siendo mas evidente en el caso de los machos donde la marca se detecta dentro de los cordones testiculares. En las gónadas XX se localiza distribuida ampliamente y no se observa regionalización como ocurre en el caso de los machos. 🐭





**Figura 17.** Detección de Testosterona y VASA. Inmunofluorescencias de Testosterona (Azul) y VASA (Rojo). Se muestra el patrón de expresión dimórfico sexual de la hormona Testosterona. Los machos sintetizan la hormona a partir de los 12.5 *dpc* (Panel derecho) y las hembras la producen a los 13.5 y 14.5 *dpc* (Panel izquierdo). La detección de VASA permite observar la morfología de las gónadas. Barra = 50 μm.



**Figura 18.** Detección de  $3\beta$ -HSD1 y WNT4. Inmunofluorescencias de las proteínas  $3\beta$ -HSD1 (Azul) y WNT4 (Rojo). Se muestra el patrón de expresión de la proteína Wnt4; en los machos su distribución se restringe al interior de los cordones testiculares (Panel derecho) y en las hembras se detecta en toda la gónada (Panel izquierdo). La proteína  $3\beta$ -HSD1 se detecta a los 11.5 y 12.5 *dpc* en hembras y en todas las edades en machos. Barra = 50 micras.

---

---

## 2. Cuantificación de la fluorescencia.

Se realizó la cuantificación de la fluorescencia detectada en las inmunotinciones para obtener una aproximación de la expresión de la proteína correspondiente. Los datos de cada proteína se compararon por edades y por cepas (Fig. 19).

### ❖ Cuantificación de VASA.

No se observaron diferencias significativas entre las gónadas XX y las XY de las mismas edades (Fig. 19, A). En la cepa CD-1 no hay diferencias entre las edades analizadas, manteniéndose los niveles de fluorescencia constantes. En las cepas B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> se obtuvieron diferencias significativas que demostraron que a los 11.5 *dpc* los niveles de fluorescencia son menores que a los 12.5 y 13.5 *dpc*.

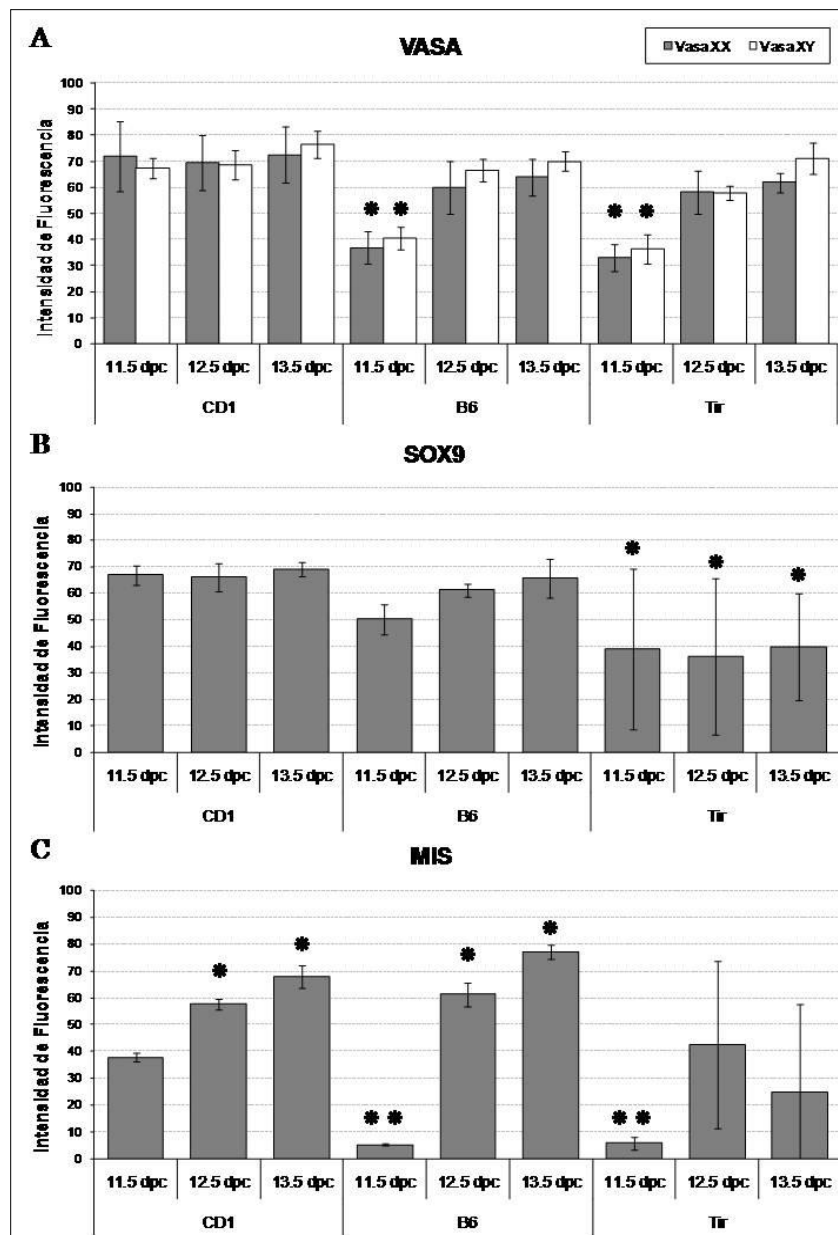
### ❖ Cuantificación de SOX9.

El análisis de fluorescencia de SOX9 (Fig. 19, B) se realizó únicamente para las gónadas XY debido a que en las gónadas XX no se detectó expresión de esta proteína. Aunque los niveles de intensidad de fluorescencia que se obtuvieron en la cepa B6 parecen ser ligeramente menores que en la cepa CD-1, entre estas dos cepas no se encontraron diferencias significativas. La cepa B6.Y<sup>TIR</sup> mostró diferencias con las cepas normales. Los niveles de fluorescencia fueron menores en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> que en las cepas CD-1 y B6.

### ❖ Cuantificación de MIS.

En las gónadas XX tampoco se detectó expresión de la proteína MIS. El análisis de fluorescencia que se realizó para las gónadas XY (Fig. 19, C) mostró que en las cepas CD-1 y B6 se hay un aumento en la expresión conforme avanza la edad, encontrándose diferencias significativas entre los 11.5 y 13.5 *dpc*. En la cepa B6 a los 11.5 *dpc* la proteína de MIS no se detectó por lo que los valores presentados corresponden a la fluorescencia basal. Esta fluorescencia basal se detectó también en las muestras de los controles negativos. Se observaron diferencias significativas

entre la cepa B6 y CD-1 a los 11.5 *dpc*. En la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> los niveles de fluorescencia a los 11.5 *dpc* fueron basales ya que no se detectó expresión de la proteína. A los 12.5 y 13.5 *dpc* los niveles de fluorescencia aumentan pero no alcanzan los valores observados en la cepa CD-1 o B6 y se obtuvieron diferencias significativas. 🐭



**Figura 19.** Graficas de cuantificación de fluorescencia. Intensidad de fluorescencia de las proteínas VASA (A), SOX9 (B) y MIS (C) en gónadas de embriones de 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. Comparaciones entre las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup>. Se muestran las diferencias significativas entre las tres cepas estudiadas (\*) y las diferencias significativas entre edades en cada cepa (\*\*).

### 3. Expresión de genes y análisis molecular.

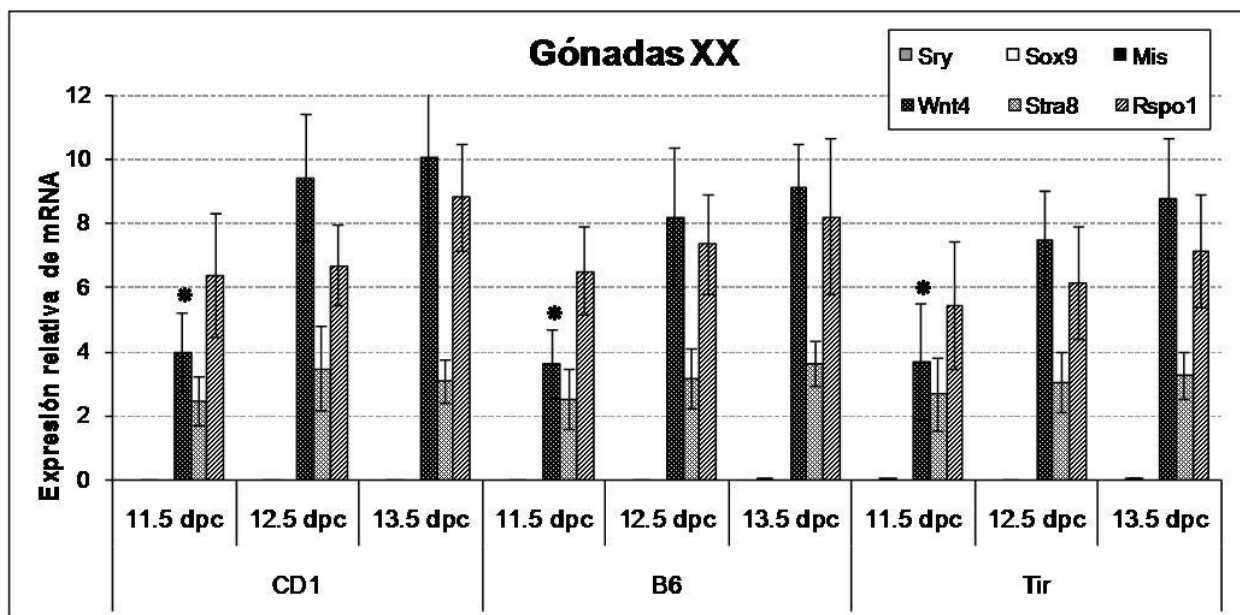
La expresión relativa de los genes *Sry*, *Sox9*, *Mis*, *Wnt4*, *Stra8* y *Rspo1* relacionados con la diferenciación sexual se obtuvo mediante la amplificación por RT-PCR de los transcritos correspondientes. Se encontraron diferencias significativas entre las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> y se observó que existen diferencias en el patrón de expresión de estos genes entre las gónadas XX y las XY.

#### ❖ Gónadas XX.

Las gónadas XX de las tres cepas mostraron un patrón de expresión similar en todos los genes analizados por RT-PCR. Considerando las mismas edades, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las tres cepas. Los transcritos de los genes *Sry* y *Mis* no se detectaron en ninguna de las edades y cepas estudiadas. Los valores detectados para el gen *Sox9* fueron bajos comparados con las gónadas XY. Los valores obtenidos para *Wnt4*, *Stra8* y *Rspo1* muestran que estos genes se expresan en ambos sexos; sin embargo, las gónadas XX presentan mayor expresión que las gónadas XY. Los tres genes presentan menores niveles de expresión a los 11.5 *dpc* en las tres cepas y estos aumentan conforme avanza la edad. El gen *Wnt4* mostró diferencias significativas a los 11.5 *dpc*, observándose niveles de expresión menores que a los 12.5 y 13.5 *dpc* (Fig. 20).

#### ❖ Gónadas XY.

Las gónadas XY de las cepas CD-1 y B6 presentan patrones de expresión similares, mostrando que en la mayoría de los genes no se presentan diferencias significativas. Sin embargo, las gónadas XY de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> presentan variabilidad en la expresión de los genes por lo que se obtuvieron diferencias significativas en varios casos al ser comparados con las cepas normales (Fig. 21 y 22). Se observó expresión de todos los genes analizados. La expresión de *Sox9* fue mayor que en las gónadas XX. *Wnt4*, *Stra8* y *Rspo1* mostraron expresión menor que en las gónadas XX.



**Figura 20.** Expresión relativa de mRNA en gónadas XX. Grafica mostrando la expresión relativa de los genes Sry, Sox9, Mis, Wnt4, Stra8 y Rspo1 en gónadas XX de las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> a los 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*. No se detectó expresión de Sry y Mis. Sox9 presentó niveles de expresión bajos. Wnt4 mostró diferencias significativas a los 11.5 *dpc* con respecto a los 12.5 y 13.5 *dpc* en las tres cepas. En los genes Stra8 y Rspo1 no se detectaron diferencias significativas.

#### ❖ Expresión del gen Sry.

En las gónadas XY de CD-1 y B6 se observó expresión del gen Sry (Fig. 21, A) a los 11.5 y 12.5 *dpc*. En ambos casos la mayor expresión se detectó a los 11.5 *dpc*. No se observaron diferencias significativas entre estas dos cepas pero si hubo diferencias con la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> en las tres edades. Las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> presentaron niveles variables de expresión a los 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*, los cuales no alcanzan los niveles detectados en las cepas CD-1 y B6.

#### ❖ Expresión del gen Sox9.

El gen Sox9 (Fig. 21, B), en las cepas CD-1 y B6 mostró diferencias significativas a los 11.5 *dpc* con respecto a los 12.5 y 13.5 *dpc*. En las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> a los 12.5 y 13.5 *dpc* detectaron niveles de expresión menores a los observados en las cepas CD-1 y B6, mostrando diferencias significativas con estas. A los 11.5 *dpc* no se observaron diferencias con las cepas normales.

---

---

#### ❖ Expresión del gen Mis.

El patrón de expresión del gen Mis (Fig.21, C) en gónadas XY es similar al de Sox9, observándose un aumento en los niveles conforme avanza la edad de los embriones de las cepas CD-1 y B6. No hay diferencias significativas entre estas dos cepas, sin embargo sí se tienen diferencias con la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 12.5 y 13.5 *dpc*. Los niveles de expresión detectados en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> son bajos y no alcanzan los valores encontrados en las cepas CD-1 y B6.

#### ❖ Expresión del gen Wnt4.

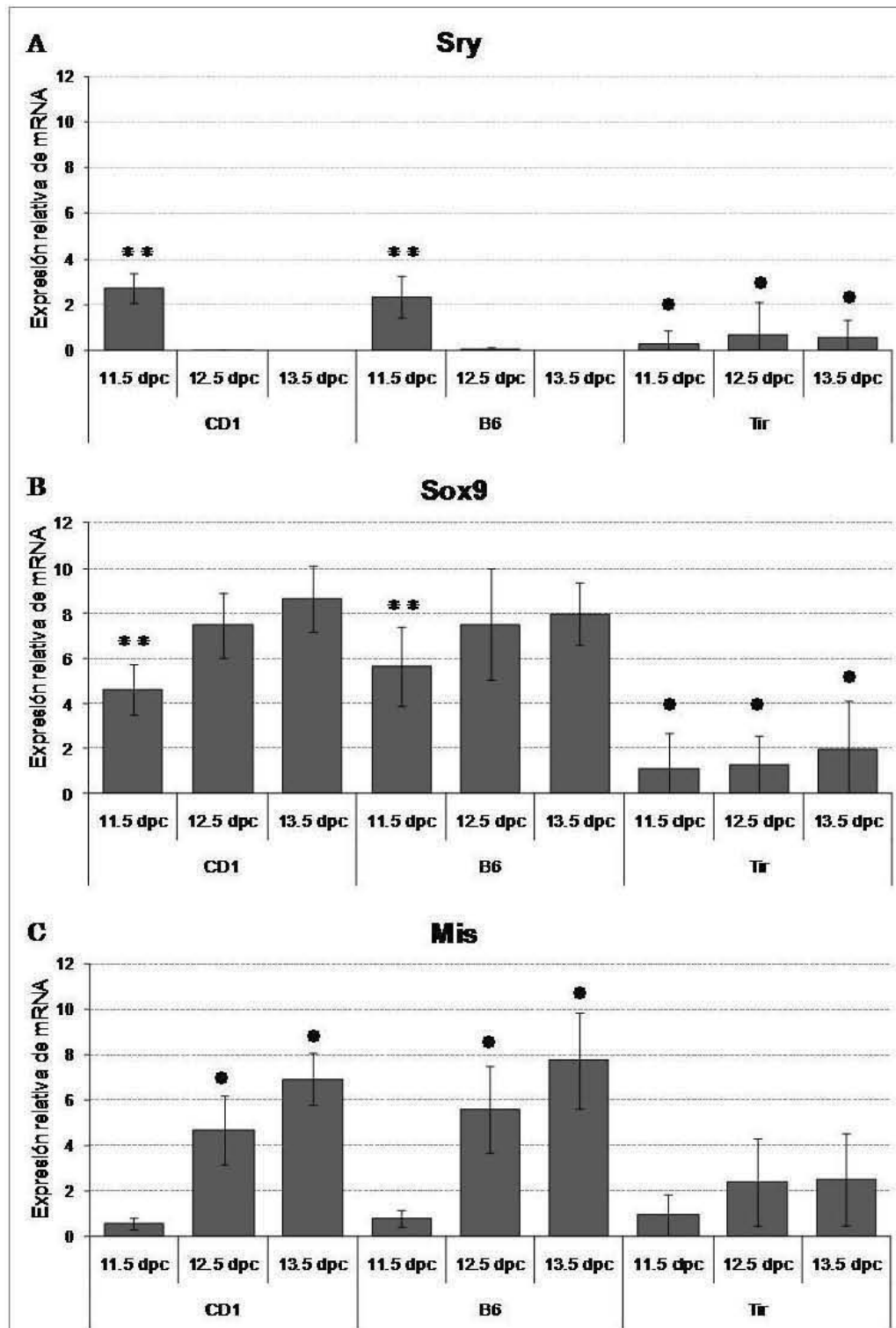
El patrón de expresión del gen Wnt4 es similar entre las gónadas XY de las tres cepas (Fig. 22, A). No se encontraron diferencias significativas. En la cepa CD-1 y B6 se observa un ligero aumento en la expresión conforme avanza la edad. Los valores presentes en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> son similares que en las cepas normales.

#### ❖ Expresión del gen Stra8.

La expresión del gen Stra8 no mostró diferencias significativas entre las cepas CD-1 y B6 en ninguna de las edades estudiadas (Fig. 22, B). Se encontraron diferencias significativas entre la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> y las cepas normales. La cepa B6.Y<sup>TIR</sup> presentó niveles de expresión mayores en las tres edades analizadas. Sin embargo, estos valores no alcanzan a los que se observan en las gónadas XX, en las que este gen presenta los niveles de expresión mayores.

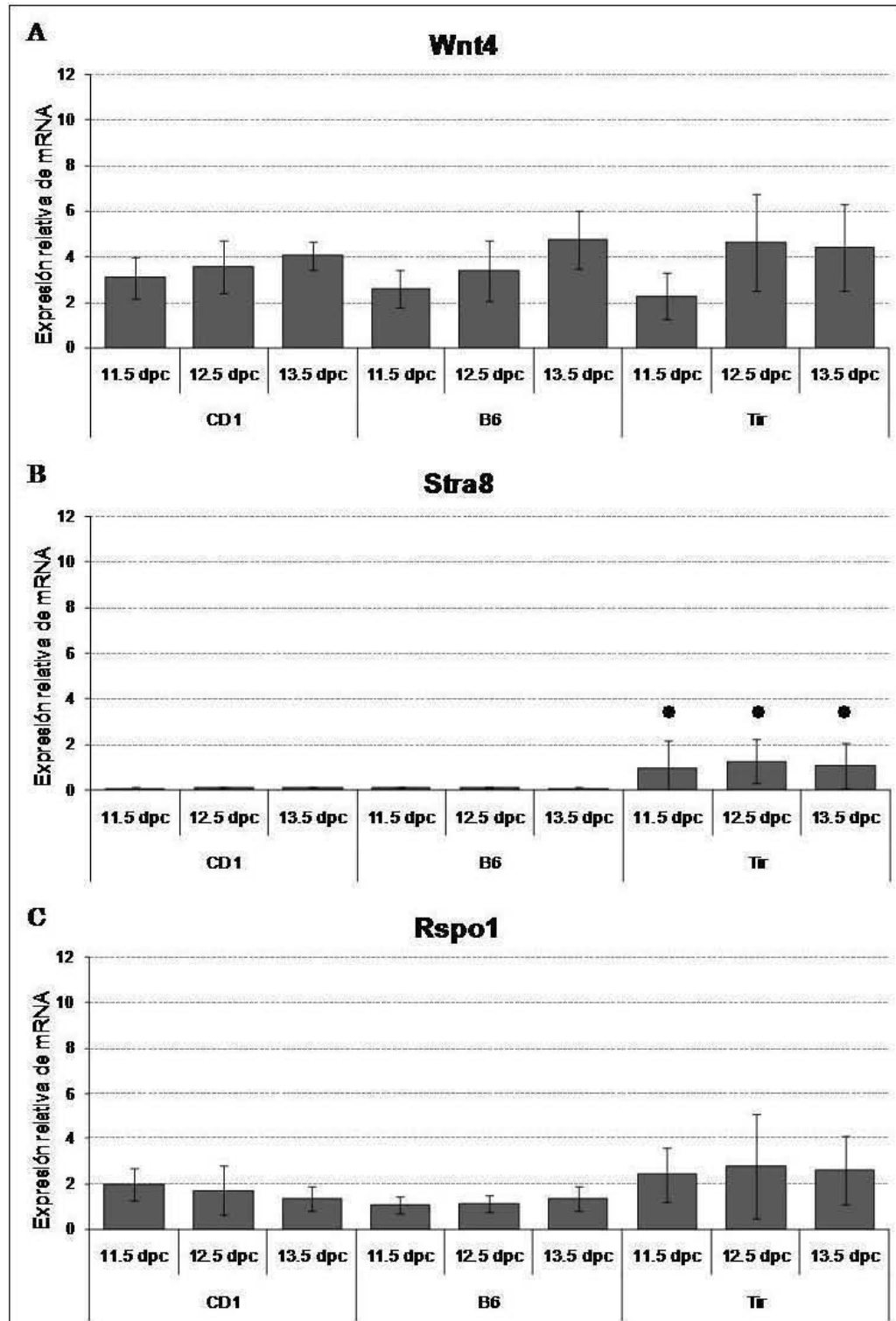
#### ❖ Expresión del gen Rspo1.

No se observaron diferencias significativas en la expresión del gen Rspo1 en ninguna de las edades de las tres cepas (Fig. 22, C). Sin embargo, los niveles de expresión encontrados en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> son ligeramente mayores que los de las cepas CD-1 y B6 pero estos tampoco alcanzan los valores detectados en las gónadas XX.



**Figura 21.** Expresión relativa de mRNA en gónadas XY. Graficas que muestran la expresión relativa de los genes Sry (A), Sox9 (B) y Mis (C) en gónadas XY de las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> a los 11.5, 12.5 y 13.5 dpc. En las gónadas XY se detectó expresión de todos los genes analizados. Se muestran las diferencias significativas entre las tres cepas estudiadas (\*) y las diferencias significativas entre edades en cada cepa (\*\*).





**Figura 22.** Expresión relativa de mRNA en gónadas XY. Graficas que muestran la expresión relativa de los genes Wnt4 (A), Stra8 (B) y Rspo1 (C) en gónadas XY de las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> a los 11.5, 12.5 y 13.5 dpc. En las gónadas XY se detectó expresión de todos los genes analizados. Se muestran las diferencias significativas entre las tres cepas estudiadas (\*). Los niveles de expresión de Wnt4 y Rspo1 no presentaron diferencias significativas.

### ❖ Análisis de correlación entre genes.

En cada cepa se realizó un análisis de correlación entre genes y se obtuvo el resumen estadístico de cada variable. En este resumen estadístico se incluyen medidas de tendencia central, de variabilidad y de distribución. Se presentan los valores de Asimetría (“Skewness”) y Curtosis estándar que pueden ser usados para determinar si las muestras vienen de una distribución normal. Los valores de estos estadísticos por fuera del rango de -2 a +2 indican desviaciones significativas de la normalidad, que pueden tender a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos normalmente aplicados a los datos.

En la Tabla 1 se muestra un resumen estadístico para cada una de las variables analizadas en la cepa CD-1. En esta cepa ninguna de las variables mostró valores de Asimetría o Curtosis estándar por fuera del rango esperado.

**Tabla 1.** Resumen estadístico de la cepa CD1.

	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Número de datos	15	15	15	15	15	15
Promedio	0.935	6.934	4.063	3.556	0.093	1.685
Desviación estándar	1.372	2.143	2.900	0.948	0.044	0.794
Coefficiente de variación	146.72	30.91	71.38	26.67	47.83	47.12
Mínimo	3.8E-10	3.434	0.441	2.297	0.032	0.758
Máximo	3.811	10.778	8.694	5.540	0.174	3.555
Rango	3.811	7.344	8.253	3.243	0.142	2.798
Asimetría estándar	1.620	-0.090	-0.171	0.985	0.762	1.548
Curtosis estándar	-0.501	-0.517	-1.226	-0.023	-0.657	0.547

Ninguna de las variables presento valores de Asimetría o Curtosis fuera del rango esperado.

El resumen estadístico para los genes analizados en la cepa B6 se muestra en la Tabla 2. Los valores obtenidos en la cepa B6 son semejantes a los observados en la cepa CD-1, con excepción del gen Sry, el cual mostró valores de Asimetría estándar por fuera del rango esperado.

**Tabla 2.** Resumen estadístico de la cepa B6.

	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Número de datos	15	15	15	15	15	15
Promedio	0.826	7.062	4.718	3.567	0.102	1.183
Desviación estándar	1.230	2.069	3.368	1.418	0.047	0.423
Coefficiente de variación	148.93	29.30	71.39	39.76	46.35	35.77
Mínimo	2.E-10	3.531	0.361	1.729	0.028	0.578
Máximo	3.681	11.236	10.056	6.320	0.184	2.099
Rango	3.681	7.705	9.695	4.591	0.157	1.521
Asimetría estándar	2.088 *	0.225	0.170	1.055	-0.145	0.560
Curtosis estándar	0.439	-0.064	-0.993	-0.338	-0.652	0.020

\* Sry presento valores de Asimetría o Curtosis fuera del rango esperado.

El resumen estadístico para la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> se muestra en la Tabla 3. Con excepción de Sry, los coeficientes de variación obtenidos en esta cepa presentan valores mayores a los obtenidos en las cepas normales. Lo que indica que en esta cepa la expresión de cada gen es más variable en comparación con la cepa CD-1 y B6. Ninguna de las variables mostró valores de Asimetría o Curtosis estándar por fuera del rango esperado.

**Tabla 3.** Resumen estadístico de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>.

	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Número de datos	15	15	15	15	15	15
Promedio	0.721	1.451	1.949	3.752	1.120	2.613
Desviación estándar	0.780	1.626	1.739	1.942	0.986	1.606
Coefficiente de variación	108.11	112.09	89.24	51.76	87.98	61.45
Mínimo	4.E-10	0.002	6.89E-8	1.347	0.016	0.521
Máximo	1.972	5.242	5.090	6.543	3.053	5.352
Rango	1.972	5.240	5.090	5.196	3.037	4.830
Asimetría estándar	0.767	1.457	0.854	0.534	0.971	0.837
Curtosis estándar	-1.193	0.214	-0.707	-1.220	-0.804	-0.905

Ninguna de las variables presento valores de Asimetría o Curtosis fuera del rango esperado.

Los coeficientes de correlación se obtuvieron para conocer la dinámica de expresión de los genes en cada una de las cepas. En la Tabla 4 se muestra el producto de las correlaciones de Pearson entre cada par de variables analizadas en la cepa CD1.

Los valores de coeficientes de correlación se encuentran en el rango de -1 a +1 y miden la fuerza de las relaciones lineales entre las variables. Se muestra el valor de P que prueba la significancia estadística de las correlaciones estimadas. Un valor de P por debajo de 0.05 indica que existe correlación estadísticamente significativa con 95% de nivel de confianza. Para el análisis de correlación se usaron 15 pares de datos por cada variable. Los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos para las cepas B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> se presentan en las Tablas 5 y 6 respectivamente.

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación en la cepa CD-1.

	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Sry	1					
Sox9	-0.8056 (0.0003)*	1				
Mis	-0.8578 (0.0000)*	0.8015 (0.0003)*	1			
Wnt4	-0.4207 (0.1184)	0.1672 (0.5514)	0.4444 (0.0970)	1		
Stra8	-0.2992 (0.2786)	0.0163 (0.9541)	0.1297 (0.6449)	0.2362 (0.3966)	1	
Rspo1	0.2046 (0.4644)	-0.1124 (0.6901)	-0.1724 (0.5390)	-0.3856 (0.1557)	-0.1663 (0.5536)	1

Se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para cada par de genes en la cepa CD-1. En paréntesis se muestra el valor de P para cada par de variables.

\* P < 0.05 indica correlación estadísticamente significativa.

La correlación entre los genes ováricos (Wnt4, Stra8 y Rspo1) y testiculares (Sry, Sox9 y Mis) en las cepas CD-1 y B6 es menor o igual a 0.6 y en algunos casos la relación es negativa. La comparación entre los genes ováricos en ambas cepas mostro una relación menor a 0.5 y no presentaron correlación estadísticamente significativa. Con excepción de Wnt4, los coeficientes de correlación entre genes testiculares y ováricos en las cepas CD-1 y B6 no son estadísticamente significativos. En la cepa CD-1 se observó que la relación entre los genes testiculares es mayor a 0.8, observándose correlación estadísticamente significativa. La relación entre Sry con Sox9 y Mis es negativa indicando que la expresión de Sry disminuye mientras Sox9 y Mis aumentan su expresión y la relación entre Sox9 y Mis es positiva.

En la cepa B6 la relación entre los genes testiculares difiere con la observada en la cepa CD-1. Los coeficientes de correlación de Sry/Sox9 y Sox9/Mis son menores a 0.5 indicando que la relación entre estos genes es menor a la observada en la cepa CD-1. Sin embargo, en este caso la correlación no fue estadísticamente significativa.

Los coeficientes de correlación entre Sry y Mis son similares en ambas cepas y son estadísticamente significativos. En la cepa B6 se obtienen valores de correlación de 0.527 y 0.597 entre los genes testiculares (Sox9 y Mis) y Wnt4 que son estadísticamente significativos. Lo anterior indica que la expresión de los genes Sox9 y Mis aumenta con respecto a Wnt4.

**Tabla 5.** Coeficientes de correlación en la cepa B6.

	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Sry	1					
Sox9	-0.4323 (0.1075)	1				
Mis	-0.7973 (0.0004)*	0.4413 (0.0996)	1			
Wnt4	-0.5039 (0.0555)	0.5276 (0.0432)*	0.5971 (0.0188)*	1		
Stra8	0.3423 (0.2117)	-0.1309 (0.6418)	-0.1818 (0.5168)	-0.2306 (0.4084)	1	
Rspo1	-0.0917 (0.7451)	0.0658 (0.8159)	0.1115 (0.6923)	-0.1602 (0.5684)	-0.4527 (0.0902)	1

Se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para cada par de genes en la cepa B6. En paréntesis se muestra el valor de P para cada par de variables.

\* P < 0.05 indica correlación estadísticamente significativa.

En la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> se observó correlación estadísticamente significativa en varios casos. Los valores del coeficiente de correlación entre los genes testiculares (Sry y Sox9) y ováricos (Rspo1 y Stra8) fueron negativos indicando que mientras un gen aumenta su expresión, el otro la disminuye. Con respecto a los genes testiculares se observa que Sry presenta coeficientes de correlación positivos con respecto a Sox9 y Mis indicando que estos genes aumentan su expresión conforme aumenta la expresión de Sry. Este patrón difiere al observado en las cepas normales en donde la relación entre estos genes es negativa. Sox9 presentó correlación estadísticamente

significativa con respecto a *Mis*, *Stra8* y *Rspo1*. En el caso de *Stra8* y *Rspo1* la relación fue negativa con respecto a *Sox9*. *Wnt4*, *Stra8* y *Rspo1* dentro de las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> mostraron coeficientes de correlación mayores a los encontrados en las cepas normales y presentaron correlación estadísticamente significativa.

**Tabla 6.** Coeficientes de correlación en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>.

	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Sry	1					
Sox9	0.8370 (0.0001)*	1				
Mis	0.7571 (0.0011)*	0.5468 (0.0349)*	1			
Wnt4	-0.5882 (0.0211)*	-0.4640 (0.0814)	-0.3081 (0.2639)	1		
Stra8	-0.7830 (0.0006)*	-0.6969 (0.0039)*	-0.3889 (0.1520)	0.7695 (0.0008)*	1	
Rspo1	-0.8455 (0.0001)*	-0.7061 (0.0033)*	-0.4803 (0.0700)	0.7441 (0.0015)*	0.9182 (0.0000)*	1

Se muestran los coeficientes de correlación obtenidos para cada par de genes en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>. En paréntesis se muestra el valor de P para cada par de variables.

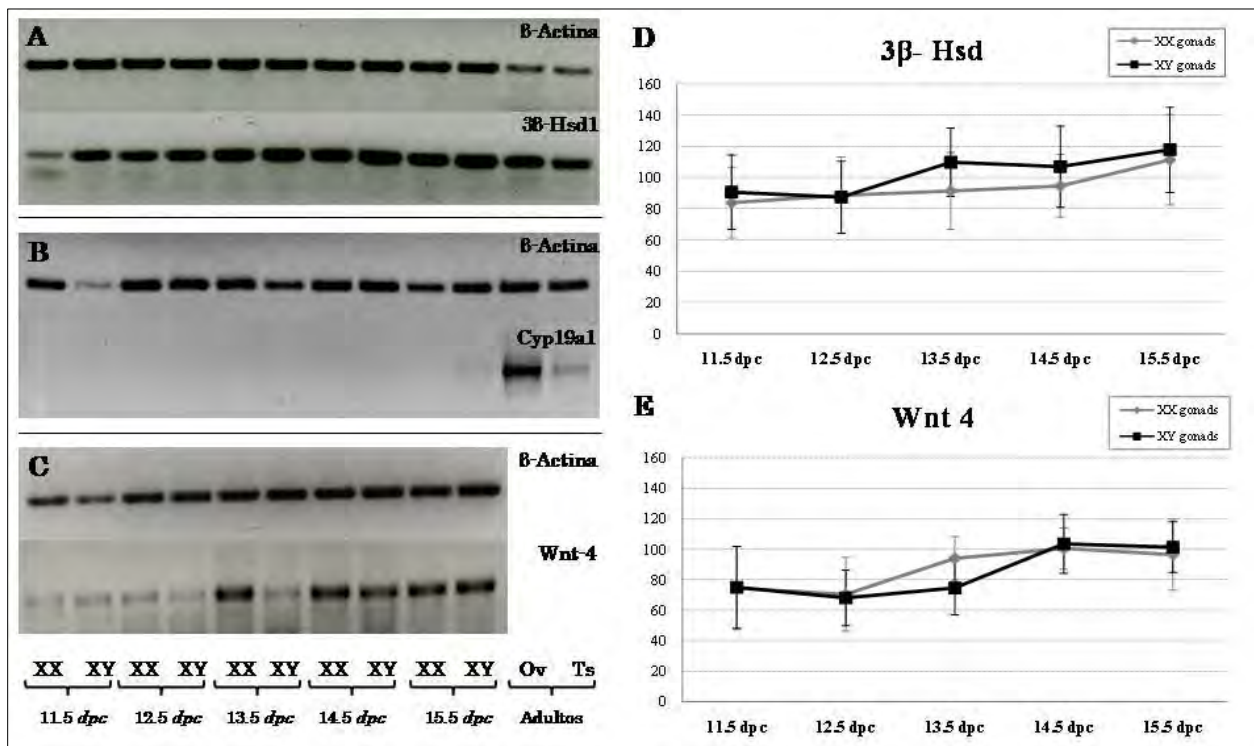
\* P < 0.05 indica correlación estadísticamente significativa.

#### ❖ Expresión de los genes 3 $\beta$ -Hsd1, P450 arom y Wnt4 en la cepa CD-1.

Se analizó el patrón de expresión de las enzimas 3 $\beta$ -Hsd1 y P450arom (participantes en la esteroidogénesis) y de la molécula de señalización Wnt4 (relacionada con la inhibición de la esteroidogénesis) en gónadas de ambos sexos de embriones de 11.5 a 15.5 *dpc* provenientes de la cepa CD-1 (Fig. 22). Su expresión se analizó por densitometría de los productos obtenidos por RT-PCR. Los transcritos de la enzima P450arom no se detectaron en etapas embrionarias de ningún sexo. La expresión de esta enzima se detectó únicamente en ovarios y testículos adultos (Fig. 22 B). Tanto la 3 $\beta$ -Hsd1 como Wnt4 se expresan en todas las edades trabajadas de ambos sexos y se observó que la expresión de estos dos genes aumenta ligeramente conforme aumenta la edad (Fig. 22, D, E). El análisis estadístico mostro que no existen diferencias significativas en los niveles de expresión detectados en ambos genes.

En el caso de la enzima  $3\beta$ -Hsd1 las gónadas XY presentan niveles de expresión mayores a los detectados en las gónadas XX en todas las edades analizadas; sin embargo, no se presentan diferencias significativas entre los dos sexos.

Los niveles de expresión de Wnt4 son similares entre hembras y machos en la mayoría de la edades, excepto a los 13.5 *dpc* cuando se observó que lo niveles de expresión son mayores en hembras. Sin embargo, estas diferencias no son significativas estadísticamente. 🐭



**Figura 23.** Expresión de los genes  $3\beta$ -Hsd1, Cyp19a1 y Wnt4. Gónadas XX y XY de embriones CD-1 de los 11.5 a los 15.5 *dpc*. Geles representativos teñidos con bromuro de etidio mostrando la expresión de los transcritos de  $3\beta$ -Hsd1 (A; 129 pb), Cyp19a1 (B; 579 pb) y Wnt4 (C; 345 pb) con sus respectivos normaleses para  $\beta$ -Actina (254 pb). Las graficas muestran la expresión relativa de los genes  $3\beta$ -Hsd1 (D) y Wnt4 (F). No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los casos analizados.

---

---

## ❖ Discusión.

### ❖ Expresión de marcadores testiculares.

El ratón B6.Y<sup>TIR</sup> ha sido utilizado como un excelente modelo de estudio por varios laboratorios para conocer eventos del desarrollo sexual. En este trabajo, se analizaron genes relacionados con el desarrollo ovárico y testicular con el objetivo de conocer eventos involucrados con el fenómeno de reversión del ratón B6.Y<sup>TIR</sup>. Los resultados mostraron que la expresión de los genes relacionados con el proceso de diferenciación sexual está alterada en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>, tanto a nivel de transcritos como de proteínas cuando se compara su expresión con las cepas normales CD-1 y B6.

El análisis de proteínas permitió observar la presencia de cuatro fenotipos gonadales en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>, los cuales presentan un nivel de diferenciación retrasado con respecto a las gónadas CD-1 y B6. Estos resultados apoyan los trabajos de Taketo *et al.* (1991) quienes demostraron que el periodo de diferenciación morfológico del testículo ocurre 24 horas después que en cepas normales. La ausencia de marcadores testiculares como SOX9, MIS y 3 $\beta$ -HSD1 y la variabilidad en el análisis por RT-PCR de las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> sugiere que Sry no es producido o que no es capaz de activar a Sox9 y, por lo tanto, la cascada de diferenciación testicular para que estas gónadas se desarrollen como un ovario.

La localización de SOX9 en la región medular de las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> concuerda con el patrón de expresión observado previamente por Moreno-Mendoza *et al.* (2004) quienes sugieren que estas gónadas pueden llegar a formar ovotestis si Sox9 es regulado positivamente o formar ovarios si este es inhibido. El análisis de las gónadas con otros marcadores, como MIS y 3 $\beta$ -HSD1, muestra que la propuesta anterior puede estarse llevando a cabo debido a que sólo aquellas gónadas que expresan SOX9 pueden expresar MIS. La localización de este gen también es medular y se observó que sólo aquellas células que expresan SOX9 expresan MIS. Sin embargo, en las células con SOX9 que se encuentran hacia la región cortical



parece no ser suficiente para inducir la producción de MIS y probablemente otros factores testiculares. Lo anterior sugiere que dentro de la gónada las células somáticas requieren que Sox9 se exprese por encima de cierto umbral para poder producir MIS. Por otro lado, los niveles de diferenciación observados sugieren la existencia de un mecanismo de competencia entre la región cortical y medular dentro de la gónada B6.Y<sup>TIR</sup>.

En la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> no se forman testículos normales en etapas adultas, este proceso se explica por la formación de ovotestis en etapas embrionarias (Eicher y Washburn, 2001), en los cuales la región ovárica degenera y se desarrollan testículos pequeños. En el presente trabajo, la formación de ovotestis es evidente por la distribución de los marcadores testiculares Sox9, Mis y 3 $\beta$ -Hsd1 en la región medular de la gónada.

La existencia de los diferentes fenotipos gonadales se ve reflejado en el análisis por RT-PCR en el cual se encontró que los niveles de expresión de genes testiculares están reducidos y los niveles de genes ováricos están ligeramente aumentados. Lo anterior sugiere que están siendo regulados positivamente en toda la gónada para formar un ovario o en la región cortical en donde inhiben la expresión de factores testiculares, como Sox9, Mis y 3 $\beta$ -Hsd1, y permiten la formación de un ovotestis. Esta hipótesis podría ser apoyada con un estudio de la localización de factores ováricos dentro de la gónada B6.Y<sup>TIR</sup>. En general, estos datos muestran que la expresión de genes testiculares está siendo inhibida a diferentes niveles, permitiendo la expresión de genes ováricos que alteran la diferenciación de un testículo normal.

La expresión de las proteínas de SOX9, MIS y 3 $\beta$ -HSD1 varía entre cada cepa. Considerando a la cepa CD-1 como nuestra cepa de comparación, se observó que el patrón de expresión de estas proteínas se encuentra alterado tanto en la cepa B6 (considerada normal) como en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> (con reversión sexual).

A los 13.5 *dpc* las gónadas XY de embriones CD-1 y B6 ya se han diferenciado en testículos. Las inmunofluorescencias en estos casos muestran la formación de cordones testiculares bien definidos, evidenciados por la acumulación de la proteína Laminina en la membrana basal. Las células de Sertoli son marcadas con SOX9 y MIS y las células de Leydig con la proteína  $3\beta$ -HSD1. Las gónadas XY de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 13.5 *dpc* no presentan la morfología observada en las cepas normales. La morfología que puede distinguirse según la expresión de los marcadores testiculares muestra que las gónadas XY de la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> a los 13.5 *dpc* no forma testículos normales. Sólo aquellas gónadas que expresan SOX9 y MIS llegan a formar cordones testiculares que se localizan en la región medular y pueden o no estar expresando la  $3\beta$ -HSD1. También se puede observar que en la región medular se encuentran células expresando SOX9 y MIS, pero en la región cortical las células somáticas sólo expresan SOX9 o ninguno de los dos marcadores testiculares.

Las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> presentaron niveles variables de expresión a los 11.5, 12.5 y 13.5 *dpc*, lo cual concuerda con datos reportados por Lee y Taketo en 1994, quienes encontraron que el periodo de expresión de Sry en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> se encuentra extendido 36 horas más comparado con cepas normales como la B6 o CD-1. Además los valores observados en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> en las tres edades no alcanzan los niveles detectados en las cepas CD-1 y B6 a los 11.5 *dpc*.

Trabajos previos han reportado la expresión de  $3\beta$ -Hsd1 a partir de los 13.5 *dpc* en cepas normales (Greco y Payne, 1994; Lee y Taketo, 1994). Sin embargo, en este estudio se observó que la proteína de  $3\beta$ -Hsd1 es expresada a partir de los 11.5 *dpc*, lo que puede indicar que la línea celular esteroideogénica se puede determinar temprano en el desarrollo gonadal y que su mantenimiento depende de la diferenciación del linaje celular de soporte indicado por la expresión de factores testiculares como Sox9 y Mis.

### ❖ **Expresión de marcadores ováricos.**

Cuando se analizó la expresión de genes ováricos como un promedio, no se observaron niveles de expresión con diferencias significativas. Sin embargo, la expresión de los genes ováricos *Wnt4* y *Rspo1* se incrementa en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> independientes, por lo tanto, esos genes parecen jugar un papel importante en el desarrollo de los ovarios XY y ovotestis. Actualmente, el número de genes que se conoce que participan en el desarrollo ovárico va en aumento, por lo que la participación de otros genes que inhiban la diferenciación testicular no se puede descartar.

Se ha observado que la expresión de *Rspo1* es requerida en las gónadas XX normales para regular positivamente a *Wnt4* y por lo tanto activar la vía de señalización de  $\beta$ -Catenina e inducir la diferenciación de un ovario (Chassot *et al.*, 2008). Los datos obtenidos muestran un ligero aumento en la expresión de estos dos genes en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> sugiriendo que la vía de diferenciación ovárica se está activando en ausencia o disminución de los factores de diferenciación testicular.

En este trabajo mostramos que los niveles de expresión de *Sry*, *Sox9* y *Mis* son menores a los encontrados en cepas normales y que la expresión de *Stra8* y *Rspo1* es ligeramente mayor indicando que la vía de diferenciación ovárica puede estar siendo activada. Estos resultados apoyan la propuesta que ha sugerido que dentro de cada célula se requiere que *Sry* se exprese por encima de cierto umbral para que se active *Sox9*, de no sobrepasar este umbral, se inhibe la vía de diferenciación testicular y se activa la vía de diferenciación ovárica (Wilhelm *et al.*, 2009). Los coeficientes de correlación obtenidos confirman que en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> la expresión de *Sry*, *Sox9* y *Mis* disminuye, mientras que la expresión de *Stra8* y *Rspo1* aumenta. Este patrón de expresión es contrario al observado en las cepas B6 y CD-1. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> se activa el mecanismo de diferenciación ovárica en relación a la disminución de genes testiculares.

Trabajos previos han reportado que todas las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> expresan Sry, sin importar que sean clasificadas como ovarios u ovotestis (Lee y Taketo, 1994). La presencia de gónadas XY que no expresan marcadores testiculares sugiere que en algunos casos, Sry no es capaz de activar a Sox9 y en consecuencia la vía de diferenciación testicular, lo que permite la formación de un ovario y la diferenciación de una hembra fenotípica con cromosomas XY.

Recientemente se reportó que dentro de las gónadas B6.Y<sup>POS</sup> se detecta expresión de Foxl2 en regiones ováricas y testiculares; dentro de la región testicular, células que expresan Foxl2 no expresan Sox9 sugiriendo que se activa la vía de diferenciación ovárica en aquellas células que fallan para activar a Sox9 (Wilhelm *et al.*, 2009). En el presente trabajo se observó un aumento en la expresión de Rspo1 en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup>, lo sugiere que la vía de diferenciación ovárica puede estar siendo activada, apoyando la propuesta anterior.

#### ❖ Células germinales y diferenciación meiótica.

Estudios previos han demostrado que la expresión de Sry es importante para la migración de las células del mesonefros hacia la cresta genital (Capel *et al.*, 1999) y para la formación de los cordones testiculares (Tilman y Capel, 1999; Buehr *et al.*, 1993b). Estos dos procesos inducidos por acción de Sry están alterados en la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> (Albrecht *et al.*, 2000). Un evento importante en el establecimiento de la gónada indiferenciada, y que se lleva a cabo antes de la migración de las células del mesonefros, es el arribo de las células germinales primordiales (Tooyuka *et al.*, 2000). En todas las gónadas analizadas de las cepas CD-1, B6 y B6.Y<sup>TIR</sup>, la proteína VASA fue detectada en el citoplasma de las células germinales. Sin embargo, en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> la marca de esta proteína también fue detectada en células que se localizaron fuera de la gónada a los 12.5 *dpc*, lo cual muestra que en esta cepa las células germinales siguen arribando hacia la gónada cuando en otras cepas como, la CD-1, ya se han establecido. Este fenómeno indica que no sólo el patrón de expresión de genes como Sry (Lee y Taketo, 1994), Sox9 (Moreno-Mendoza *et al.*, 2004) y Mis

(Taketo *et al.*, 1991) está alterado en esta cepa sino que eventos que son importantes para el establecimiento de la gónada como la llegada de las células germinales también se encuentra alterado.

El análisis de fluorescencia para VASA mostró que en las cepas B6 y B6.Y<sup>TIR</sup> se presenta un aumento de células germinales. Estos datos son consistentes con estudios que han reportado que entre los 11.5 y 12.5 *dpc* se presenta un incremento en el número de células germinales positivas a VASA dentro de las gónadas de ambos sexos (Tooyuka *et al.*, 2000).

Las células germinales juegan un papel importante en la vía de diferenciación sexual. Se ha reportado que en las gónadas del ratón 129; B6Dax1-*/Y* con reversión sexual se expresa el gen *Stra8* a los 13.5 *dpc*, cuando su expresión no está presente en las gónadas XY normales (Park *et al.*, 2008). Los resultados obtenidos son consistentes con esos datos y muestran activación de *Stra8* en gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> sugiriendo que la vía de diferenciación ovárica puede estar actuando.

Trabajos previos han propuesto que *Rspo1* participa en la sobrevivencia de células germinales meióticas mediante la regulación positiva de la vía de señalización de *Wnt4* (Tomizuka *et al.*, 2008) y que participa en la pérdida de las uniones adherentes de las células germinales femeninas antes de que inicie la meiosis (Chassot *et al.*, 2008). Por lo tanto, si *Rspo1* regula estos dos procesos en las gónadas XX normales, se puede explicar el ligero aumento en los niveles de expresión de *Stra8* cuando *Rspo1* también es regulado positivamente en las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup>.

El análisis de expresión de *Stra8* sugiere que las células germinales B6.Y<sup>TIR</sup> se han activado para iniciar el proceso de meiosis debido a la disminución o ausencia de factores testiculares. Estos datos apoyan las propuestas surgidas de estudios realizados con cultivos celulares que llevaron a sugerir que las células germinales de ambos sexos tienen el potencial de iniciar la meiosis y que la cresta genital masculina produce un factor que inhibe el inicio de la meiosis de las células germinales (McLaren y Southee, 1997). A los 11.5 *dpc* las células germinales son

sensibles a factores que inhiban o promuevan el inicio de la meiosis (Adams y McLaren, 2002). En los últimos años, se han reportado varios factores que participan en la diferenciación sexual de las células germinales. Se ha observado que ácido retinoico producido en el mesonefros induce el inicio de la meiosis en las CGP de las hembras mediante la activación de *Stra8* (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006). En los machos la enzima CYP26B1 degrada el ácido retinoico inhibiendo la meiosis (Bowles *et al.*, 2006; Li *et al.* 2009). Aunado a lo anterior, se ha reportado que otros factores como *Nanos2*, *FGF9* (Barrios *et al.*, 2010) y *DMRT1* (Krentz *et al.*, 2011) participan en la vía de diferenciación de las CGPs. En el presente trabajo se observo que en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup>, el gen *Stra8* es activado desde los 11.5 *dpc* en las gónadas XY, por lo que la expresión de los factores antes mencionados también puede estar siendo alterada. En este sentido, la producción de ácido retinoico y CYP26B1 puede ser similar a las gónadas XX. *FGF9* y *DMRT1* participan en la diferenciación testicular por lo que resultan ser de interés para el entendimiento del proceso de reversión sexual presente en el modelo estudiado en el presente trabajo.

La expresión de *Stra8* en gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> muestra la presencia de células germinales premeióticas XY, por lo que están preparadas para iniciar dicho proceso. Estos resultados son consistentes con datos que reportan que la primera división meiótica se lleva cabo de manera aparentemente normal, observándose alteraciones durante la segunda división meiótica probablemente debido a la presencia del cromosoma Y (Villemure *et al.*, 2007). Dado que el aumento en la expresión de *Stra8*, el cual es un factor importante para que se lleve a cabo la meiosis en el ovario, futuros estudios podrían estar enfocados a buscar factores que participen en este fenómeno propio de la gónada femenina.

La expresión de los genes testiculares *Sry*, *Sox9*, *Mis* y  $3\beta$ -*Hsd1* parece estar inhibida permitiendo la expresión de genes ováricos como *Stra8*. Sin embargo, el estudio de otros genes involucrados en la diferenciación del ovario permitirá establecer las causas por las que se lleva a cabo el fenómeno de reversión sexual en el ratón B6.Y<sup>TIR</sup>.

---

---

❖ **Esteroidogénesis en la gónada embrionaria del ratón normal.**

En el presente trabajo se analizó la expresión de factores involucrados con el proceso de esteroidogénesis en gónadas femeninas en etapas embrionarias. Nuestros resultados mostraron que la enzima  $3\beta$ -Hsd1 se detecta en las células intersticiales del testículo en desarrollo donde se diferencian las células de Leydig, principales productoras de la Testosterona requerida para la masculinización del embrión. La detección de la enzima observada en testículos embrionarios coincide con su localización en testículos postnatales (Baker *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2007).

Lo anterior muestra que el anticuerpo utilizado es específico para la detección de la isoforma I de la  $3\beta$ -Hsd que es expresada en gónadas y glándulas adrenales (Bain *et al.*, 1991). En gónadas XX se expresa antes y durante el periodo de diferenciación sexual (11.5 y 125. *dpc*) lo cual indica que en estas etapas hay células esteroidogénicas que pueden estar produciendo otro de los metabolitos intermedios catalizados por la enzima. La detección de esta enzima importante en la síntesis de Progesterona y Testosterona sugiere que alguno de estos metabolitos se está produciendo; sin embargo, el análisis inmunohistoquímico para la detección de Testosterona mostró que la hormona no se produce a los 11.5 y 12.5 *dpc* cuando se detecta la  $3\beta$ -Hsd1. Lo que sugiere que la Testosterona no es el metabolito principal que sintetiza la enzima.

En los ovarios embrionarios de oveja se observó que la Progesterona y el Estradiol son las hormonas que se producen en mayores niveles (Quike *et al.*, 2001) por lo que el análisis de estos metabolitos o de otros como la Androstenediona debe ser considerado. La localización de la Testosterona en gónadas XY coincide con la ubicación intersticial de la enzima  $3\beta$ -Hsd1 en células esteroidogénicas, lo que permite confirmar la especificidad del anticuerpo utilizado contra Testosterona.

Greco y Payne (1994) mostraron que en el 28% de los ovarios de ratón a los 13 *dpc* y en el 50% a los 15 *dpc* se detectó la expresión del gen  $3\beta$ -Hsd1 a diferencia de nuestros resultados en donde se encontró que el 100% (n = 6) de las muestras

---

---

analizadas expresan los transcritos de la enzima. Las diferencias de nuestros resultados a cerca de la expresión de la enzima  $3\beta$ -Hsd1 con los datos reportados por Greco y Payne (1994) pueden deberse a la sensibilidad de las técnicas utilizadas. La detección de la  $3\beta$ -Hsd1 en etapas tempranas del desarrollo ovárico y la ausencia de Testosterona sugieren que esta enzima puede tener un papel diferente, probablemente puede estar participando en la especificación de la línea somática que en etapas post-natales producirá hormonas esteroides. Por otra parte la detección de pocas células marcadas con Testosterona sugiere que la enzima  $3\beta$ -Hsd1 es funcional y puede estar catalizando en mayor cantidad algún otro metabolito intermedio como la Progesterona.

El periodo de desarrollo embrionario entre los 10.5 y 13.5 *dpc* en el ratón es crucial debido a que durante esta etapa se ha observado que las células somáticas de las gónadas sobre-expresan una gran cantidad de genes dependiendo de su sexo; en hembras se sobre-expresan 1223 genes durante este periodo (Nef *et al.*, 2005), por lo que la expresión de  $3\beta$ -Hsd1 puede estar siendo regulada negativamente por uno o más de dichos genes. Aunado a lo anterior, la ausencia de la proteína y la presencia de los transcritos de  $3\beta$ -HSD1 observados en el presente estudio permiten proponer trabajos encaminados al análisis de factores que tengan como función la regulación de la expresión a nivel de traducción de proteínas.

La enzima  $3\beta$ -Hsd1 controla reacciones esteroidogénicas críticas en la biosíntesis de hormonas esteroides, participando en la formación de glucocorticoides, mineralocorticoides, Progesterona, andrógenos y estrógenos en varios tejidos. El ovario post-natal consta de folículos y cuerpos lúteos, los cuales tienen funciones específicas que dependen de la expresión diferencial de las enzimas esteroidogénicas resultando en la producción selectiva de hormonas. En este sentido, la regulación de la expresión de las enzimas esteroidogénicas como la  $3\beta$ -Hsd1 es de gran interés, por lo que, la participación de las hormonas folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) en la regulación de la expresión de  $3\beta$ -Hsd1 ha sido evidenciada en varios trabajos (O'Shaughnessy *et al.*, 1998; Simard *et al.*, 2005). Sin embargo, en etapas



embrionarias, la inducción de esteroidogénesis en el testículo se lleva a cabo en ausencia de FSH y LH, por lo que la expresión de las enzimas esteroidogénicas se encuentra bajo el control de factores gonadales como Sf1, Star (Dong *et al.*, 2007), Dax1 y miembros de la familia GATA (LaVoie y King, 2009). De manera similar, en el ovario embrionario, la expresión de enzimas esteroidogénicas debe ser controlado por factores intragonadales.

De manera general, se analizan los niveles de expresión de los transcritos de un gen específico y se utilizan como una aproximación de los niveles de expresión que se pueden estar produciendo; sin embargo, en este trabajo se observó que la expresión de los transcritos de la enzima  $3\beta$ -Hsd1 no coincide con la expresión de la proteína detectada por inmunofluorescencia. Actualmente se conocen varios procesos que regulan la expresión de un gen a nivel post-transcripcional. Entre los procesos más conocidos se encuentran el control del “splicing” y la estabilidad, traducción y localización de los transcritos de mRNA. Trabajos recientes han mostrado nuevos mecanismos de regulación post-transcripcional tales como los microRNAs (miRNAs) y la presencia de proteínas con dominios de reconocimiento de RNA (RRM) y proteínas de unión a RNA (RBPs) que regulan eventos post-transcripcionales (Keene, 2007). Se ha observado que en el testículo adulto de ratón, se encuentra un grupo de miRNAs que se encuentran asociados a polisomas, sugiriendo que juegan un papel importante en el proceso de traducción (Grivna *et al.*, 2006). En el ovario de rata, también se ha reportado la presencia de regulación post-transcripcional del receptor para LH. En este caso participa una proteína de unión a mRNA, la cual se une a la región codificante del mRNA del receptor a LH induciendo su degradación (Menon *et al.*, 2007; Nair *et al.*, 2002). Recientemente se reportó un análisis global del proteoma de la gónada del ratón durante el periodo de determinación sexual (11.5 y 12.0 *dpc*) en donde se identificaron proteínas cuyas funciones principales son 1) la modificación y transporte post-transcripcional del RNA, 2) el plegamiento y síntesis de proteínas y 3) la modificación post-traduccional (Ewen *et al.*, 2009). El grupo de proteínas cuya función es la modificación post-transcripcional de RNA

incluye 31 genes que pueden ser de gran interés en la regulación de genes como la  $3\beta$ -Hsd, la cual ha mostrado ser regulada de manera post-transcripcional en el presente estudio. Sin embargo, la regulación de la enzima por acción de miRNAs no debe descartarse debido a que dicho proceso ya ha sido observado en testículos de ratón adultos (Grivna *et al.*, 2006).

El análisis de RT-PCR para detectar los transcritos del gen Cyp19a1 (P450arom) mostró que la enzima no se está produciendo en gónadas embrionarias de ratón. Estos resultados concuerdan con el análisis de Greco y Payne (1994) realizado en gónadas de 13 y 15 *dpc* de ratón. A diferencia del ovario de oveja, conejo o humano, la ausencia de la enzima P450arom y de Testosterona indica que no se produce Estradiol en los ovarios embrionarios de ratón.

Se ha propuesto que, en especies en las que la meiosis inicia de manera retrasada, los estrógenos pueden ser importantes en la proliferación de las células germinales (Pailhoux *et al.*, 2002) y en la formación de los cordones ováricos (Quike *et al.*, 2001), mientras que en especies con meiosis inmediata la producción de estrógenos no es requerida. Esta propuesta es apoyada por los resultados presentados, en los que la diferenciación ovárica se lleva a cabo de manera normal en ausencia de estrógenos.

Dax1 es un gen que se expresa en gónadas XX, es regulado por Wnt4 (Mizusaki *et al.*, 2003) y puede bloquear la síntesis de esteroides *in vitro* mediante la inhibición de P450scc,  $3\beta$ -Hsd y StAR (Lalli *et al.*, 1998) por lo que es un buen candidato en la regulación negativa de esteroidogénesis en el ovario embrionario de ratón. Además, junto con Dax1, el gen Wnt4 inhibe la actividad de P450arom mediante Sf1 (Gurates *et al.*, 2003), siendo otro candidato para la regulación negativa de esteroidogénesis en el embrión de ratón. Por otro lado, se ha reportado que la ausencia de Dax1, induce la expresión de P450arom y un aumento en los niveles intra-testiculares de Estradiol, lo que sugiere que Dax1 regula negativamente la expresión de la enzima (Wang *et al.*, 2001). La ausencia de transcritos de Cyp19a1 en el presente estudio puede ser explicada por la acción de Dax1 y Wnt4 en etapas embrionarias.

Los resultados en el presente estudio junto con trabajos previos con ratones “Knock out” para Aromatasa muestran que la expresión de esta enzima y la síntesis de Estradiol en etapas embrionarias no tiene un papel importante durante el periodo de diferenciación sexual del ratón (Britt *et al.*, 2004a).

Trabajos previos han demostrado la importancia que tiene la síntesis de Estradiol por acción de Aromatasa para el funcionamiento del ovario (Toda *et al.*, 2004), en particular para controlar el tamaño de los ovocitos y el “pool” de folículos primordiales en ratón (Britt *et al.*, 2004b). Se han reportado varios reguladores de la expresión de P450arom, donde se ha observado que en testículo adulto de rata el factor de transcripción LRH-1 está implicado en la regulación de Aromatasa en células de Leydig (Pezzi *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de Aromatasa es específica de tejido y está bajo el control de diferentes promotores en ovario, testículo y cerebro de ratones post-natales (Golovine *et al.*, 2003). La expresión de Aromatasa en etapas fetales no ha sido reportada en ratones silvestres y su expresión solo ha sido detectada por inducción de FSH en cultivos de órganos. En ausencia de FSH, los ovarios producen Estradiol a partir de los tres días de edad indicando que esta hormona estimula la actividad de la enzima en el ovario de ratón (Terada *et al.*, 1984).

Estudios realizados con ratones mutantes que carecen de Wnt4 han mostrado que las gónadas XX producen Testosterona y que esta hormona no se detecta en gónadas XX normales (Heikkila *et al.*, 2005) lo que coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo en los que no se observó producción evidente de la hormona.

El análisis de Wnt4 mostró que este gen se expresa tanto en hembras como en machos, sin presentarse diferencias significativas en los niveles de expresión del mRNA. En los machos, la expresión de la proteína se mantiene y su distribución en la gónada se restringe al interior de los cordones testiculares. Estos resultados difieren con las observaciones de trabajos previos en gónadas de ratones normales, en los que se ha mostrado que Wnt4 se detecta en etapas indiferenciadas (~ 11 *dpc*)

de ambos sexos y que posteriormente su expresión es regulada negativamente en las gónadas XY y mantenida en las gónadas XX (Vainio *et al.*, 1999; Barrionuevo *et al.*, 2006).

Wnt4 es un factor de señalización que participa en la estabilización de  $\beta$ -Catenina, lo cual induce la activación de genes sensibles. La localización de  $3\beta$ -Hsd1 y Wnt4 en el mismo linaje celular a los 11.5 y 12.5 *dpc* sugiere que Wnt4 está induciendo la activación de genes reguladores que pueden estar involucrados en la regulación de la expresión de  $3\beta$ -Hsd1. Lo anterior apoya la hipótesis de que Wnt4 participa en la inhibición de la diferenciación de células esteroideogénicas en los ovarios en desarrollo (Vainio *et al.*, 1999). Wnt4 se detectó principalmente en las células germinales de las gónadas de ambos sexos a partir de los 13.5 *dpc*, lo que apoya la hipótesis de que este factor junto con Folistatina es importante en el mantenimiento de la línea germinal (Vainio *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2004). Además, la localización de Wnt4 dentro de los cordones testiculares apoya la propuesta de que actúa junto con Sry para aumentar la diferenciación apropiada de las células de Sertoli (Jeays-Ward *et al.*, 2004).

Estos datos muestran que hay relación entre la localización de Wnt4 y la diferenciación de células esteroideogénicas como se ha reportado previamente; sin embargo, su participación en la regulación de la esteroideogénesis no es clara, por lo que otros genes que pueden estar o no regulados por Wnt4 deben ser considerados.



### ❖ Conclusiones.


De las observaciones de los fenotipos gonadales en la cepa B6.Y<sup>TIR</sup> se concluye que:

- 1) De manera similar a Sry, el gen Sox9 puede actuar en un periodo específico para regular positivamente la expresión de genes como Mis que se encuentran cascada abajo de la vía de diferenciación testicular.
- 2) El linaje esteroidogénico es especificado temprano en el desarrollo y su mantenimiento depende de la diferenciación del linaje de soporte evidenciado por la expresión de Sox9 y Mis.

Del análisis molecular de las gónadas B6.Y<sup>TIR</sup> se concluye que:

- 1) La inhibición del mecanismo de diferenciación testicular permite la activación de la vía de diferenciación ovárica.
- 2) La expresión de Stra8 indica que las células germinales se han programado para iniciar el proceso de meiosis en ausencia o disminución de los factores testiculares.
- 3) El aumento en la expresión de Wnt4 y Rspo1 sugiere que la vía de diferenciación ovárica se activa probablemente en una región de la gónada (región ovárica) debido a que no se alcanzan los niveles de expresión que se detectan en un ovario normal.

Del estudio en ratones normales CD-1 se concluye que:

- 1) Los transcritos del gen  $3\beta$ -Hsd1 se expresan durante el periodo de diferenciación gonadal de ambos sexos y que posteriormente la proteína es regulada negativamente en los ovarios diferenciados.
- 2) Lo anterior, aunado a la detección esporádica de Testosterona y la ausencia de la enzima P450arom apoyan las propuestas previas de que el ovario embrionario de ratón no es esteroidogénico. 

## ❖ Referencias.

- [1] **Abbaszade** IG, J Arensburg, CHJ Park, JZ Kasa-Vubu, J Orly y AH Payne. 1997. Isolation of a new mouse 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase isoform, 3 $\beta$ -HSD VI, expressed during early pregnancy. *Endocrinology*. 138: 1392-1399.
- [2] **Achermann** JC, JJ Meeks y JL Jameson. 2001. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF1. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 185: 17–25.
- [3] **Adams** IR y A McLaren. 2002. Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*. 129:1155–1164.
- [4] **Albrecht** KH y EM Eicher. 1997. DNA sequence analysis of Sry alleles (subgenus Mus) implicates misregulation as the cause of C57BL/6J-Y(POS) sex reversal and defines the SRY functional unit. *Genetics*. 147: 1267-1277.
- [5] **Albrecht** KH y EM Eicher. 2001. Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental Biology*. 240: 92-107.
- [6] **Albrecht** KH, B Capel, LL Washburn y EM Eicher. 2000. Defective Mesonephric Cell migration is associated with abnormal testis cord development in C57BL/6J XY Mus domesticus mice. *Developmental Biology*. 225: 26–36.
- [7] **Albrecht** KH, M Young, LL Washburn y EM Eicher. 2003. Sry expression level and protein isoform differences play a role in abnormal testis development in C57BL/6J mice carrying certain Sry alleles. *Genetics*. 164: 277-288.
- [8] **Amleh** A y T Taketo. 1998. Live-borns from XX but not XY oocytes in the chimeric mouse ovary composed of B6.Y<sup>TIR</sup> and XX cells. *Biology of Reproduction*. 58: 574–582.
- [9] **Amleh** A, L Smith, H Chen y T Taketo. 2000. Both nuclear and cytoplasmic components are defective in oocytes of the B6.Y(TIR) sex-reversed female mouse. *Developmental Biology*. 219: 277-286.
- [10] **Amleh** A, N Ledee, J Saeed y T Taketo. 1996. Competence of oocytes from the B6.Y<sup>DOM</sup> sex-reversed female mouse for maturation, fertilization, and embryonic development in vitro. *Developmental Biology*. 178: 263–275.
- [11] **Anderson** R, TK Copeland, H Scholer, J Heasman y C Wylie. 2000. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 91: 61-68.
- [12] **Arango** NA, R Lovell-Badge y RR Behringer. 1999. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: In Vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*. 99: 409–419.
- [13] **Baccetti** B y G Collodel. 1999. Sex Chromosomes. *Encyclopedia of Reproduction*. 4: 387-401.
- [14] **Bain** PA, MH Meisler, BA Taylor y AH Payne. 1993. The genes encoding gonadal and nongonadal forms of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase are closely linked on mouse chromosome 3. *Genomics*. 16: 219-223.

- [15] **Bain** PA, M Yoo, T Clarke, SH Hammond y AH Payne. 1991. Multiple forms of mouse 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase / $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 8870-8874.
- [16] **Baker** PJ, JA Sha, MW McBride, L Peng, AH Payne y PJ O'Shaughnessy. 1999. Expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *European Journal of Biochemistry*. 260: 911-917.
- [17] **Barrionuevo** F, S Bagheri-Fam, J Klattig, R Kist, MM Taketo, C Englert y G Scherer. 2006. Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biology of Reproduction*. 74: 195-201.
- [18] **Barríos** F, D Filipponi, M Pellegrini, MP Paronetto, SD Siena, R Geremia, P Rossi, M De Felici, EA Jannini y S Dolci, 2010. Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of Cell Science*. 123: 871-880.
- [19] **Behringer** RB, RL Cate, GJ Froelick, RD Palmite y RL Brinster. 1990. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature*. 345: 167-170.
- [20] **Berta** P, JR Hawkins, AH Sinclair, A Taylor, BL Griffiths, PN Goodfellow y M Fellous. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*. 348: 448-450.
- [21] **Beverdam** A y P Koopman. 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. *Human Molecular Genetics*. 15: 417-431.
- [22] **Biddle** FG y Y Nishioka. 1988. Assay of testis development in the mouse distinguish three classes of domesticus-type Y chromosome. *Genome*. 30: 870-878.
- [23] **Bishop** CE, A With, MG Mattei y C Roberts. 1988. Molecular aspects of sex determination in mice: an alternative model for the origin of the Sxr region. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*. 322:119-124.
- [24] **Bouma** GJ, GT Hart, LL Washburn, AK Recknagel y EM Eicher. 2004. Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expression Patterns*. 5: 141-149.
- [25] **Bowles** J, D Knight, C Smith, D Wilhelm, J Richman, S Mamiya, K Yashiro, K Chawengsaksophak, MJ Wilson, J Rossant, H Hamada y P Koopman. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*. 312: 596-600.
- [26] **Britt** KL, PK Saunders, SJ McPherson, ML Misso, ER Simpson y JK Findlay. 2004a. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biology of Reproduction*. 71:1712-1723.

- [27] **Britt** KL, PG Stanton, M Misso, ER Simpson y JK Findlay. 2004b. The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad. *Endocrinology*. 145:3950-3960.
- [28] **Buehr** M, A McLaren, A Bartley y S Darling. 1993a. Proliferation and migration of primordial germ cells in We/We mouse embryos. *Developmental Dynamics*. 198: 182-189.
- [29] **Buehr** M, S Gu, y A McLaren. 1993b. Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*. 117: 273-281.
- [30] **Bullejos** M y P Koopman. 2001. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Developmental Dynamics*. 221: 201-205.
- [31] **Bullejos** M y P Koopman. 2005. Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal. *Developmental Biology*. 278:473-81.
- [32] **Canto** P, S Razo, D Soderlund, R Calzada-Leon, M de la Luz Ruiz-Reyes, G Ramon, G Braun-Roth y JP Mendez. 2004. Screening for mutations in the WNT-4 gene in patients with 46,XX true hermaphroditism. *Molecular Genetics and Metabolism*. 83: 341-343.
- [33] **Capel** B, KH Albrecht, LL Washburn y EM Eicher. 1999. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mechanisms of Development*. 84: 127-131.
- [34] **Capel** B. 2000. The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*. 92: 89-103.
- [35] **Chassot** AA, F Ranc, EP Gregoire, HL Roepers-Gajadien, MM Taketo, G Camerino, DG de Rooij, A Schedl y MC Chaboissier. 2008. Activation of  $\beta$ -catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Human Molecular Genetics*. 17: 1264-1277.
- [36] **Copelli** SB, C Bergada, AE Billerbeck, AC Goldberg, J kalil, D Damiani y HM Targovnik. 1996. Molecular analysis of sex determination in sex-reversed and true hermaphroditism. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 29: 743-748.
- [37] **De la Chapelle** A. 1987. The Y-chromosomal and autosomal testis-determining genes. *Development*. 101 Suppl:33-8.
- [38] **Dong** L, SA Jelinsky, JN Finger, DS Johnston, GS Kopf, CM Sottas, MP Hardy, RS Ge. 2007. Gene expression during development of fetal and adult Leydig cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1120:16-35.
- [39] **Dubin** RA, y H Ostrer. 1994. Sry is a transcriptional activator. *Molecular Endocrinology*. 8: 1182-1192.
- [40] **Eicher** EM y LL Washburn. 1983. Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene. *Journal of Experimental Zoology*. 228: 297-304.
- [41] **Eicher** EM y LL Washburn. 1986. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annual Review of Genetics*. 20: 327-360.
- [42] **Eicher** EM y LL Washburn. 2001. Does one gene determine whether a C57BL/6J-Y (POS) mouse will develop as a female or as an hermaphrodite? *Journal of Experimental Zoology*. 290: 322-326.



- [43] **Eicher** EM, EP Shown y LL Washburn. 1995. Sex reversal in C57BL/6J-Y<sup>POS</sup> mice corrected by a Sry transgene. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*. 350: 263-269.
- [44] **Eicher** EM, LL Washburn, JB III Whitney y KE Morrow. 1982. Mus poshiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science*. 217: 535-537.
- [45] **Enders** GC y JJ May. 1994. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Developmental Biology*. 163:331-340.
- [46] **Ewen** K, M Baker, D Wilhelm, RJ Aitken y P Koopman. 2009. Global survey of protein expression during gonadal sex determination in mice. *Molecular and Cellular Proteomics*. 8:2624-2641.
- [47] **Foster** JW, MA Dominguez-Steglich, S Guili, G Kowk, PA Weller, M Stefanovic, J Weissenbach, S Mansour, ID Young y PN Goodfellow. 1994. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*. 372: 525-530.
- [48] **George** FW y JD Wilson. 1978. Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 47: 550-555.
- [49] **Gilbert** SF. 2005. *Biología del Desarrollo / Developmental Biology*. Séptima edición. Editorial Médica Panamericana S.A. España 881 pp.
- [50] **Golovine** K, M Schwerin y J Vanselow. 2003. Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome P450 gene (cyp19) in mouse gonads and brain. *Biology of Reproduction*. 68:978-984.
- [51] **Gondos** B, FW George y JD Wilson. 1983. Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Biology of Reproduction*. 29: 791-798.
- [52] **González** LJ, GL Fonseca, AJ Caraballo-Mata y L De Abreu-Rodríguez. 2001 Ambigüedad Sexual. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*. 64: 68-75.
- [53] **Graves** PE y RP Erickson. 1995. Sequence variation in the 5', putative promoter of Sry and its enzymes relevance to the C57BL/6J-YDOM sex reversal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 208: 624-628.
- [54] **Greco** TL y AH Payne. 1994. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 Side-Chain Cleavage, 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase, P450 17 $\alpha$ -Hydroxylase/C17-20 Lyase, and P450 Aromatase in fetal Mouse Gonads. *Endocrinology*. 135: 262-268.
- [55] **Grivna** ST, E Beyret, Z Wang y H Lin. 2006. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes and Development*. 20:1709-1714.
- [56] **Gurates** B, A Amsterdam, M Tamura, S Yang, J Zhoua, Z Fang, S Amina, S Sebastian, SE Bulun. 2003. WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom gene expression in gonadal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 208: 61-75.

- [57] **Hacker** A, B Capel, P Goodfellow y R Lovell-Badge. 1995. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*. 121: 1603–1614.
- [58] **Hanley** NA, DM Hagan, M Clement-Jones, SG Ball, T Strachan, L Salas-Cortes, K McElreavey, S Lindsay, S Robson, P Bullen, H Ostrer y DI Wilson. 2000. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of Development*. 91: 403-407.
- [59] **Harley** VR, DI Jackson, PJ Hextall, JR Hawkins, GD Berkovitz, S Sockanathan, R Lovell-Badge y PN Goodfellow. 1992. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*. 255: 453–455.
- [60] **Hawkins** JR, A Taylor, P Berta, J Levilliers, B Van der Auwera y PN Goodfellow. 1992. Mutational analysis of SRY: Nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Human Genetics*. 88: 471–474.
- [61] **Hawkins** JR. 1993. Mutational analysis of SRY in XY females. *Human Mutation*. 2: 347-350.
- [62] **Heikkila** M, R Prunskaitė, F Naillat, P Itaranta, J Vuoristo, J Leppaluoto, H Peltoketo y S Vainio. 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.
- [63] **Hiramatsu** R, S Matoba, M Kanai-Azuma, N Tsunekawa, Y Katoh-Fukui, M Kurohmaru, K Morohashi, D Wilhelm, P Koopman, Y Kanai. 2009. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*. 136:129–138.
- [64] **Hiramatsu** R, K Harikae, N Tsunekawa, M Kurohmaru, I Matsuo, Y Kanai. 2010. FGF signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation. *Development*. 137:303–312.
- [65] **Houle** AM y TT Taketo. 1992. True hermaphrodites: an experimental model in the mouse. *Journal of Urology*. 148: 672-676.
- [66] **Huang** B, S Wang, Y Ning, AN Lamb y J Bartley. 1999. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American Journal of Human Genetics*. 87: 349-53.
- [67] **Ikeda** Y, WH Shen, HA Ingraham y KL Parker. 1994. Developmental expression of mouse Steroidogenic Factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Molecular Endocrinology*. 8: 654-662.
- [68] **Jeays-Ward** K, C Hoyle, J Brennan, M Dandonneau, G Alldus, B Capel y A Swain. 2003. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*. 130: 3663–3670.
- [69] **Jeays-Ward** K, M Dandonneau y A Swain. 2004. Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Developmental Biology*. 276: 431– 440.

- [70] **Jeyasuria** P, Y Ikeda, SP Jamin, L Zhao, DG De Rooij, APN Themmen, RR Behringer y KL Parker. 2004. Cell-Specific Knockout of Steroidogenic Factor 1 Reveals Its Essential Roles in Gonadal Function. *Molecular Endocrinology* 18: 1610–1619.
- [71] **Jordan** BK, M Mohammed, ST Ching, E Délot, XN Chen, P Dewing, A Swain, PN Rao, BR Elejalde y E Vilain. 2001. Up-Regulation of WNT-4 Signaling and Dosage-Sensitive Sex Reversal in Humans. *American Journal of Human Genetics*. 68: 1102–1109.
- [72] **Jordan** BK, Shen JHC, Olaso R, Ingraham HA y Vilain E. 2003. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ $\beta$ -catenin synergy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 10866–10871.
- [73] **Josso** N, C Racine, N di Clemente, R Rey y F Xavier. 1998. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145: 3–7.
- [74] **Juneau** C, E Dupont, V Luu-The, F Labrie y G Pelletier. 1993. Ontogenesis of  $3\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase  $\Delta 5$ - $\Delta 4$  Isomerase in the rat ovary as studied by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Biology of Reproduction*. 48: 226-234.
- [75] **Katoh-Fukui** Y, R Tsuchiya, T Shiroishi, Y Nakahara, N Hashimoto, K Noguchi y T Higashinakagawa. 1998. Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*. 393:688-692.
- [76] **Keene** JD. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nature Reviews Genetics*. 8:533-543.
- [77] **Kent** J, SC Wheatley, JE Andrews, AH Sinclair y P Koopman. 1996. A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. 122: 2813-2822.
- [78] **Kidokoro** T, S Matoba, R Hiramatsu, M Fujisawa, M Kanai-Azuma, C Taya, M Kurohmaru, H Kawakami, Y Hayashi, Y Kanai y H Yonekaw. 2005. Influence on spatiotemporal patterns of a male-specific Sox9 activation by ectopic Sry expression during early phases of testis differentiation in mice. *Developmental Biology*. 278: 511–525.
- [79] **Kim** Y, A Kobayashi, R Sekido, L DiNapoli, J Brennan, MC Chaboissier, F Poulat, RR Behringer, R Lovell-Badge y B Capel. 2006a. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biology*. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040187.
- [80] **Kim** KA, J Zhao, S Andarmani, M Kakitani, T Oshima, ME Binnerts, A Abo, K Tomizuka y WD Funk. 2006b. R-spondin proteins. A novel link to  $\beta$ -catenin activation. *Cell Cycle*. 5: 23-26.
- [81] **Kolon** TF, FA Ferrer y PH McKenna. 1998. Clinical and molecular analysis of XX sex reversed patients. *Journal of Urology*. 160: 1169-1172.
- [82] **Koopman** P, A Munserberg, B Capel, N Vivian, R Lovell-Badge. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 348: 450–452.
- [83] **Koopman** P, J Gubbay, N Vivian, P Goodfellow, y R Lovell-Badge. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 351: 117–121.

- [84] **Koubova** J, DB Menke, Q Zhou, B Capel, MD Griswold y DC Page. 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 2474-2479.
- [85] **Krentz** AD, MW Murphy, AL Sarver, MD Griswold, VJ Bardwell y D Zarkower. 2011. DMRT1 promotes oogenesis by transcriptional activation of *Stra8* in the mammalian fetal ovary. *Developmental Biology*. 356: 63–70.
- [86] **Lalli** E, MH Melner, DM Stocco, P Sassone-Corsi. 1998. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinology* 139: 4237-4243.
- [87] **Lang**-Muritano M, A Biason-Lauber, C Gitzelmann, C Belville, Y Picard y EJ Schoenle. 2001. A novel mutation in the anti-müllerian hormone gene as cause of persistent müllerian duct síndrome. *European Journal of Pediatrics*. 160: 652-654.
- [88] **LaVoie** HA y SR King. 2009. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: *STARD1*, *CYP11A1* and *HSD3B*. *Experimental Biology and Medicine*. 234:880-907.
- [89] **Lee** CH y T Taketo. 1994. Normal onset, but prolonged expression, of *Sry* gene in the B6.YDOM sex-reversed mouse gonad. *Developmental Biology*. 165: 442–452.
- [90] **Lee** CH y T Taketo. 2001. Low levels of *Sry* transcripts cannot be the sole cause of B6-Y(TIR) sex reversal. *Genesis*. 30: 7-11.
- [91] **Li** H, G MacLean, D Cameron, M Clagett-Dame y M Petkovich. 2009. *Cyp26b1* expression in murine Sertoli Cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis. *PLoS ONE*. 4(10): e7501. doi:10.1371/journal.pone.0007501.
- [92] **Livak** KJ y TD Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-DDCT}$  method. *Methods*. 25: 402–408.
- [93] **Lorence** MC, BA Murry, JM Trant y JI Mason. 1990. Human  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ -4 isomerase from placenta: expression in non steroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinology* 126: 2493-2498.
- [94] **Luo** X, Y Ikeda y KL Parker. 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*. 77: 481–490.
- [95] **MacGregor** GR, BP Zambrowicz y P Soriano. 1995. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development*. 121: 1487-1496.
- [96] **Marmolejo**-Valencia A, Y Nishioka, N Moreno-Mendoza, H Merchant-Larios. 1999. Fertility of Y(TIR).B6 sex-reversal females with XX orthotopic ovarian transplants. *Biology of Reproduction*. 61: 1426-30.
- [97] **Marshall** OJ y VR Harley. 2000. Molecular mechanisms of *SOX9* action. *Molecular Genetics and Metabolism*. 71: 455-462.

- [98] **McLaren** A. 2003. Primordial germ cells in the mouse. *Developmental Biology*. 262: 1-15.
- [99] **McLaren** A y D Southee. 1997. Entry of Mouse Embryonic Germ Cells into Meiosis. *Developmental Biology*. 187: 107–113.
- [100] **McLaren** A y M Buehr. 1990. Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differentiation and Development*. 31: 185-195.
- [101] **Menke** DB y DC Page. 2002. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expression Patterns*. 2: 359–367.
- [102] **Menon** KMJ, AK Nair, L Wang y H Peegel. 2007. Regulation of luteinizing hormone receptor mRNA expression by a specific RNA binding protein in the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 260-262:109-116.
- [103] **Merchant** H. 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Developmental Biology*. 44: 1-21.
- [104] **Merchant-Larios** H y T Taketo. 1991. Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 19: 158-171.
- [105] **Merchant-Larios** H y V Díaz-Hernández. 2011. Cap 4, Gonadal Development. *Topics in Animal and Plant Development: From Cell Differentiation to Morphogenesis*. 2011: 75-91.
- [106] **Merchant-Larios** H, N Moreno-Mendoza y M Buehr. 1993. The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *International Journal of Developmental Biology*. 37: 407-15.
- [107] **Merchant-Larios** H, HJ Clarke, y T Taketo. 1994. Developmental arrest of fertilized eggs from the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Developmental Genetics*. 15: 435–442.
- [108] **Miyamoto** N, M Yoshida, S Kuratani, I Matsuo y S Aizawa. 1997. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development*. 124: 1653-1664.
- [109] **Miyamoto** T, K Sengoku, N Takuma, S Hasuike, H Hayashi, T Yamauchi, T Yamashita y M Ishikawa. 2002. Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, *STRA8*, stimulated by retinoic acid gene 8. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 19: 531-535.
- [110] **Mizusaki** H, K Kawabe, T Mukai, E Ariyoshi, M Kasahara, H Yoshioka, A Swain y K Morohashi. 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. *Molecular Endocrinology*. 17: 507–519.
- [111] **Mohamed** OA, D Dufort y HJ Clarke. 2004. Expression and Estradiol regulation of *Wnt* genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signaling at implantation. *Biology of Reproduction*. 71: 417-424.
- [112] **Morales** E. 2004. Apoptosis y diferenciación celular durante el desarrollo del ovario del ratón B6.Y<sup>TIR</sup> con reversión sexual. Tesis. Facultad de Ciencias, UNAM.

- [113] **Moreno-Mendoza** N, V Harley, H Merchant-Larios. 2003. Cell aggregation precedes the onset of Sox9-expressing preSertoli cells in the genital ridge of mouse. *Cytogenetic and Genome Research*. 101: 219-23.
- [114] **Moreno-Mendoza** N, L Torres-Maldonado, J Chimal-Monroy, V Harley y H Merchant-Larios. 2004. Disturbed expression of Sox9 in pre-sertoli cells underlies sex-reversal in mice B6.Y<sup>TIR</sup>. *Biology of Reproduction*. 70: 114-122.
- [115] **Munsterberg** A y R Lovell-Badge. 1991. Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*. 113: 613-624.
- [116] **Nagamine** CM, T Taketo y GC Koo. 1987. Studies on the genetics of tda-1 XY sex reversal in the mouse. *Differentiation*. 33: 223-231.
- [117] **Nagamine** CM, J Capehart, C Carlisle y D Chang. 1998. Ototestes in B6-XXSxr sex-reversed mice. *Developmental Biology*. 196: 24-32.
- [118] **Nair** AK, JC Kash, H Peegel y KMJ Menon. 2002. Post-transcriptional regulation of luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary by a novel mRNA binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*. 277:21468-21473.
- [119] **Nam** JS, JT Turcotte, PF Smith, S Choi y JK Yoon. 2006. Mouse Cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate  $\beta$ -Catenin-dependent gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 13247-13257.
- [120] **Nam** JS, TJ Turcotte y JK Yoon. 2007. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expression Patterns*. 7: 306-312.
- [121] **Nef** S, O Schaad, NR Stallings, CR Cederroth, JL Pitetti, G Schaer, S Malki, M Dubois-Dauphin, B Boizet-Bonhoure, P Descombes, KL Parker y JD Vassalli. 2005. Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Developmental Biology*. 287: 361-377.
- [122] **Obata** Y, M Villemure, T Kono y T Taketo. 2008. Transmission of Y chromosomes from XY female mice was made possible by the replacement of cytoplasm during oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 13918-13923.
- [123] **Ottolenghi** C, M Uda, L Crisponi, S Omari, A Cao, A Forabosco y D Schlessinger. 2007. Determination and stability of sex. *Bioessays*. 29: 15-25.
- [124] **O'Shaughnessy** PJ, P Baker, U Sohnius, AM Haavisto, HM Charlton y I Huhtaniemi. 1998. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*. 139: 1141-1146.
- [125] **Pailhoux** E, B Vigier, D Vaiman, N Servel, S Chaffaux, EP Cribiu y C Cotinot. 2002. Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Developmental Dynamics*. 224: 39-50.

- [126] **Palmer** SJ y PS Burgoyne. 1991. The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. *Development*. 113: 709-714.
- [127] **Park** SY, EJ Lee, D Emge, CL Jahn, JL Jameson. 2008. A Phenotypic Spectrum of Sexual Development in *Dax1* (*Nr0b1*)-Deficient Mice: Consequence of the C57BL/6J Strain on Sex Determination. *Biology of Reproduction*. 79: 1038-1045.
- [128] **Park** S, K Zeidan, JS Shin, T Taketo. 2011. SRY upregulation of SOX9 is inefficient and delayed, allowing ovarian differentiation, in the B6.YTIR gonad. *Differentiation* 82: 18–27.
- [129] **Parker** KL, BP Schimmer y A Schedl. 1999. Genes essential for early events in gonadal development. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 831-838.
- [130] **Parma** P, O Radi, V Vidal, MC Chaboissier, E Dellambra, S Valentini, L Guerra, A Schedl, y G Camerino. 2006. R-spondin 1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nature Genetics*. DOI: 10.1038/ng1907.
- [131] **Pelliniemi** LJ y K Frojzman. 2001. Structural and Regulatory Macromolecules in Sex Differentiation of Gonads. *Journal of Experimental Zoology*. 290: 523–528.
- [132] **Pepling** ME y AC Spradling. 1998. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*. 125: 3323-3328.
- [133] **Pezzi** V, R Sirianni, A Chimento, M Maggiolini, S Bourguiba, C Delalande, S Carreau, S Ando, ER Simpson y CD Clyne. 2004. Differential expression of Steroidogenic Factor-1/Adrenal 4 Binding Protein and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)/Fetoprotein Transcription Factor in the rat testis: LRH-1 as a potential regulator of testicular aromatase expression. *Endocrinology*. 145:2186–2196.
- [134] **Ponchel** F, C Toomes, K Bransfield, FT Leong, SH Douglas, SL Field, SM Bell, Valerie Combaret, A Puisieux, AJ Mighell, PA Robinson, CF Inglehearn, JD Isaacs y AF Markham. 2003. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3:18.
- [135] **Puertas** MJ. 1999. *Genética. Fundamentos y perspectivas*. 2ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Madrid. 913 pp.
- [136] **Qin** Y y CE Bishop. 2005. Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Human Molecular Genetics*. 14: 1221-1229.
- [137] **Quirke** LD, JL Juengel, DJ Tisdall, S Lun, DA Heath y KP McNatty. 2001. Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biology of Reproduction*. 65: 216–228.
- [138] **Roberts** LM, JA Visser y HA Ingraham. 2002. Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. *Development*. 129: 1487-1496.

- [139] **Salas-Cortes** L, F Jaubert, S Barbaux, C Nessmann, MR Bono, M Fellous, K McElreavey, M Roseblatt. 1999. The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *International Journal of Developmental Biology*. 43: 135-40.
- [140] **Salas-Cortes** L, F Jaubert, MR Bono, M Fellous, M Roseblatt. 2001. Expression of the human SRY protein during development in normal male gonadal and sex-reversed tissues. *Journal of Experimental Zoology*. 290: 607-15.
- [141] **Schmahl** J, EM Eicher, LL Washburn, y B Capel. 2000. Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*. 127: 65 -73.
- [142] **Sekido** R y R Lovell-Badge. 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*. 453: 930-934.
- [143] **Sekido** R, I Bar, V Narvaez, G Penny y R Lovell-Badge. 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Developmental Biology*. 274: 271–279.
- [144] **Simard** J, ML Ricketts, S Gingras, P Soucy, FA Feltus y MH Melner. 2005. Molecular biology of the 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerase gene family. *Endocrine Reviews*. 26: 525–582.
- [145] **Simpson** ER, MS Mahendroo, GD Means, MW Kilgore, MM Hinshelwood, S Graham-Lorence, B Amarneh, Y Ito, CR Fisher y MD Michael. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*. 15: 342–355.
- [146] **Sinclair** AH, P Berta, MS Palmer, JR Hawkins, BL Griffiths, MJ Smith, JW Foster, AM Frischauf, R Lovell-Badge y PN Goodfellow. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 346: 240-244.
- [147] **Stromstedt** M, DS Keeney, MR Waterman, BC Paria, AJ Conley y SK Dey. 1996. Preimplantation mouse blastocysts fail to express CYP genes required for estrogen biosynthesis. *Molecular Reproduction and Development*. 43: 428-436.
- [148] **Styrna** J. 1999. Sex Determination, Genetic. *Encyclopedia of Reproduction*. 4: 409-414.
- [149] **Sugawara** T, JA Holt, M Kiriakidou y JF III Strauss. 1996. Steroidogenic Factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry*. 35: 9052-9059.
- [150] **Taketo** T, J Saeed, Y Nishioka y PK Donahoe. 1991. Delay of testicular differentiation in the B6.YDOM ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for müllerian inhibiting substance. *Developmental Biology*. 146: 386-395.
- [151] **Taketo-Hosotani** T, Y Nishioka, C Nagamine, I Villalpando y H Merchant-Larios. 1989. Development and fertility of ovaries in the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Development*. 197: 95–105.
- [152] **Terada** N, M Kuroda, M Namiki, Y Kitamura y K Matsumoto. 1984. Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. *Journal of Steroid and Biochemistry*. 20:741-745.



- [153] **Tevosian** SG, KH Albrecht, JD Crispino, Y Fujiwara, EM Eicher y SH Orkin. 2002. Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*. 129: 4627-34.
- [154] **Tilman** C y B Capel. 1999. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*. 126: 2883–2890.
- [155] **Toda** K, Y Okada, M Zubair, KI Morohashi, T Saibara y T Okada. 2004. Aromatase-knockout mouse carrying an estrogen-inducible enhanced green fluorescent protein gene facilitates detection of estrogen actions in vivo. *Endocrinology*. 145:1880–1888.
- [156] **Tomizuka** K, K Horikoshi, R Kitada, Y Sugawara, Y Iba, A Kojima, A Yoshitome, K Yamawaki, M Amagai, A Inoue, T Oshima y M Kakitani. 2008. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Human Molecular Genetics*. 17: 1278–1291.
- [157] **Toyooka** Y, N Tsunekawa, Y Takahashi, Y Matsui, M Satoh y T Noce. 2000. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*. 93: 139-149.
- [158] **Vainio** S, M Heikkila, A Kispert, N Chin, y AP McMahon. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*. 397: 405-409.
- [159] **Vigier** B, F Watrin, S Magre, D Tran y N Josso. 1987. Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development*. 100: 43-55.
- [160] **Vilain** E y ERB McCabe. 1998. Minireview. Mammalian Sex Determination: From Gonads to Brain. *Molecular Genetics and Metabolism*. 65: 74–84.
- [161] **Villalpando** I, Y Nishioka y T Taketo. 1993. Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 45: 265-273.
- [162] **Villemure** M, HY Chen, M Kurokawa, RA Fissore y T Taketo. 2007. The presence of X- and Y-chromosomes in oocytes leads to impairment in the progression of the second meiotic division. *Developmental Biology*. 301: 1–13.
- [163] **Wagner** KD, N Wagner y A Schedl. 2003. The complex life of WT1. *Journal of Cell Science*. 116: 1653-1658.
- [164] **Wagner** T, J Wirth, J Meyer, B Zabel, M Held, J Zimmer, J Pasantes, FD Bricarelli, J Keutel, E Hustert, U Wolf, N Tommerup, W Schempp y G Scherer. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*. 79: 1111–1120.



## ❖ Anexos.

## 1. Oligonucleótidos y condiciones de PCR para sexado.

Oligo nucleótido	Secuencia	Fragmento (pb)	Programa
Zfy (1)	5' AAG ATA AGC TTA CAT AAT CAC ATG GA 3'	600	94°C por 10 min (1 ciclo),
Zfy (2)	5' CCT ATG AAA TCC TTT GCT GCA CAT GT 3'		94°C por 15 seg
Act (1)	5' GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3'	243	60°C por 15 seg } (34 ciclos)
Act (2)	5' GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3'		72°C por 30 seg }
			72°C por 10 min (1 ciclo)

## 2. Condiciones de RT-PCR para genes específicos.

Gen	Fragmento (pb)	Referencia	Programa
Sry	124	Bouma <i>et al.</i> , 2004	50°C por 30 min (1 ciclo),
Mis	117	Bouma <i>et al.</i> , 2004	94°C por 5 min (1 ciclo),
3β-Hsd1	129	Bouma <i>et al.</i> , 2004	94°C por 30 seg } (35 ciclos)
			60°C por 40 seg }
			72°C por 30 seg }
Wnt4	345	Mohamed <i>et al.</i> , 2004	72°C por 5 min (1 ciclo)
Stra8	151	Koubova <i>et al.</i> , 2006	50°C por 30 min (1 ciclo),
Rspo1	346	Nam <i>et al.</i> , 2007	94°C por 5 min (1 ciclo),
Cyp19a1	579	Stromstedt <i>et al.</i> , 1996	94°C por 30 seg } (35 ciclos)
			58°C por 50 seg }
			72°C por 30 seg }
			72°C por 5 min (1 ciclo)
Sox9	310	Moreno-Mendoza <i>et al.</i> , 2004	50°C por 30 min (1 ciclo),
			94°C por 5 min (1 ciclo),
			94°C por 30 seg } (32 ciclos)
			56°C por 60 seg }
			72°C por 60 seg }
			72°C por 5 min (1 ciclo)

### 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en RT-PCR.

Con el fin de verificar su especificidad, cada par de los oligonucleótidos utilizados en RT-PCR se localizaron en la secuencia de RNA mensajero reportada para cada gen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>) La localización se realizó utilizando el programa localizado en la pagina de Oligo Finder ([http://www.cellbiol.com/scripts/oligo/oligo\\_finder.html](http://www.cellbiol.com/scripts/oligo/oligo_finder.html)). Los datos generales y referencias de acceso en el Banco de Genes de cada par de oligonucleótidos son los siguientes:

#### ❖ Sry.

Locus NM\_011564 1188 bp mRNA linear.

Definición Sex determining region of Chr Y (Sry), mRNA.

Acceso NM\_011564. Versión NM\_011564.1 GI:6755760

Organismo *Mus musculus*. Cepa 129 Cromosoma Y.

Sry A 5' TTA TGG TGT GGT CCC GTG GT 3' 20 PB

Sry B 5' GGC CTT TTT TCG GCT TCT GT 3' 20 PB

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Bouma *et al.*, 2004.

Fragmento de 124 pares de bases.

#### ❖ Sox9.

Locus NM\_011448 4123 bp mRNA linear.

Definición SRY-box containing gene 9 (Sox9), mRNA.

Acceso NM\_011448. Versión NM\_011448.3 GI:142368547

Organismo *Mus musculus*. Cepa C57BL/6. Cromosoma 11.

Sox9 A 5' GTG GCA AGT ATT GGT CAA 3' 18 PB.

Sox9 B 5' GAA CAG ACT CAC ATC TCT 3' 18 PB.

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Moreno-Mendoza *et al.*, 2004.

Fragmento de 310 pares de bases.

❖ **Mis (Amh).**

Locus NM\_007445 1676 bp mRNA linear.

Definición Anti-Müllerian hormone (Amh), mRNA.

Acceso NM\_007445. Versión NM\_007445.1 GI:6680685

Organismo *Mus musculus*. Cepa 129. Cromosoma 10.

Mis A 5'CTA TTT GGT GCT AAC CGT GGA CTT 3' 24 PB.

Mis B 5' AAG GCT TGC AGC TGA TCG AT 3' 20 PB

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Bouma *et al.*, 2004.

Fragmento de 117 pares de bases.

❖ **Wnt4.**

Locus NM\_009523 1101 bp mRNA linear.

Definición Wingless-related MMTV integration site 4 (Wnt4), mRNA.

Acceso NM\_009523. Versión NM\_009523.1 GI:6678594

Organismo *Mus musculus*. Cepa C57BL/6. Cromosoma 4.

Wnt4 A 5' TGT ACC TGG CCA AGC TGT CAT 3' 21 PB

Wnt4 B 5' TCC GGT CAC AGC CAC ACT T 3' 19 PB

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Mohamed *et al.*, 2004.

Fragmento de 345 pares de bases.

❖ **Stra8.**

Locus NM\_009292 1455 bp mRNA linear.

Definición Stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8), mRNA.

Acceso NM\_009292. Versión NM\_009292.1 GI:6678172

Organismo *Mus musculus*. Cromosoma 6.

Stra8 A 5' GTT TCC TGC GTG TTC CAC AAG 3' 21 PB

Stra8 B 5' CAC CCG AGG CTC AAG CTT C 3' 19 PB

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Koubova *et al.*, 2006.

Fragmento de 151 pares de bases.

❖ **Rspo1.**

Locus NM\_138683 1834 bp mRNA linear.

Definición R-spondin homolog (*Xenopus laevis*) (Rspo1), mRNA.

Acceso NM\_138683 XM\_908508. Versión NM\_138683.1 GI:20149775

Organismo *Mus musculus*. Cromosoma 4.

Rspo1 A 5' TGT GAA ATG AGC GAG TGG TCC 3' 21 PB

Rspo1 B 5' TCT CCC AGA TGC TCC AGT TCT 3' 21 PB

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Nam *et al.*, 2007.

Fragmento de 436 pares de bases.

❖ **3 beta HSD, Isoforma 1.**

Locus NM\_008293 1628 bp mRNA linear.

Definición Hydroxysteroid dehydrogenase-1, delta<5>-3-beta (Hsd3b1), mRNA.

Acceso NM\_008293. Versión NM\_008293.1 GI:6680288

Organismo *Mus musculus*. Cromosoma 3.

3β HSD 5' ACA TGG CTC TGG GAG TTA TAA GGT 3' 24 pb

3β HSD 5' TTA GTG ACT GGC AAG GCT TCT G 3' 22 pb

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Bouma *et al.*, 2004.

Fragmento de 129 pares de bases.

❖ **Cyp19a1, P450arom.**

Locus NM\_007810 2373 bp mRNA linear.

Definición Cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1, (Cyp19a1), mRNA.


Acceso NM\_007810 Versión NM\_007810.3 GI:156139071

Organismo *Mus musculus*. Cromosoma 9.

Cyp19a1 5' ATA ATG TCA CCA TCA TGG TCC CGG 3' 24 pb

Cyp19a1 5' GCA TGA TGT GTC TCA TGA GGG TCA 3' 24 pb

Secuencias de oligonucleotidos tomadas de Stromstedt *et al.*, 1996.

Fragmento de 579 pares de bases. 











## Expression of $3\beta$ -HSD1 and P450 Aromatase enzymes during mouse gonad differentiation

N. R. Antonio-Rubio · S. M. Guerrero-Estévez ·  
E. Lira-Romero · N. Moreno-Mendoza

Received: 5 July 2011 / Accepted: 9 September 2011 / Published online: 20 September 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** In sheep embryos, steroidogenic activity has been reported as taking place during the period of sexual differentiation. In the case of mouse embryos, the sporadic detection or absence of steroidogenic enzymes suggests that the ovary is inactive. The purpose of this work was to establish if mouse undifferentiated gonads express steroidogenic enzymes in a similar way as in sheep embryos. To know this, we analyzed the mRNA expression pattern of  $3\beta$ -Hsd1 and P450arom as well as protein expression pattern of  $3\beta$ -HSD1 and Testosterone in normal undifferentiated and differentiated gonads from both male and female mice embryo. Our data indicate that there is expression of  $3\beta$ -Hsd1 in XX gonads during gonad differentiation period. Nevertheless the Testosterone which would indicate steroidogenic activity is not produced. Besides, the absence of P450arom indicates that the production of Estradiol as observed in the ovaries of sheep does not occur. The detection of  $3\beta$ -Hsd1 in the early stages of ovarian development, as well as the absence of Testosterone suggests that XX gonads are not steroidogenic and that  $3\beta$ -Hsd1 enzyme may play a different role than in the steroidogenesis process.

**Keywords**  $3\beta$ -Hsd1 · P450arom · Gonad differentiation · Testosterone · XY gonad · XX gonad

### Introduction

In postnatal stages, the gonads of mammals produce three essential groups of steroidal hormones: progestin (Progesterone P4), estrogens (Estrone E1 and Estradiol E2) and androgens (Androstenedione A and Testosterone T). These metabolites are produced from cholesterol in the steroidogenic pathway and are synthesized by the activity of various enzymes (Revised in Wilson et al. 1981; Simard et al. 2005). The  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$  isomerase enzyme ( $3\beta$ -HSD) is important in the synthesis of Progesterone and Testosterone (Lorence et al. 1990), and the P450 aromatase (P450arom), product of the Cyp19a1 gene participates in the synthesis of Estrone and Estradiol (Simpson et al. 1994). In embryonic stages it is known that the production of Testosterone is a crucial event in masculine differentiation, however the production of steroid hormones in females is not well understood. Some studies describe the synthesis of Estradiol and Progesterone in female fetal gonads of human (George and Wilson 1978), rabbit (Gondos et al. 1983) and sheep (Quirke et al. 2001). In female fetal sheep gonads, the greatest expression of the  $3\beta$ -Hsd mRNA and protein was detected in the developing ovary beginning at day 30 of gestation period of sexual differentiation in sheep. Subsequently its intensity diminished after 35 days of gestation (dg). The analysis of the level of Progesterone, Androstenedione, Testosterone and Estradiol in sheep gonads shows that steroidogenic activity is manifested during the period of morphological differentiation, as much in the case of females, as in males (Quirke et al. 2001). In other mammals studied such as the rat (Juneau et al. 1993) and the mouse (Greco and Payne 1994) it has been suggested that the fetal ovaries do not have the capacity to synthesize steroid hormones. Although the sporadic detection of

N. R. Antonio-Rubio · S. M. Guerrero-Estévez ·  
E. Lira-Romero · N. Moreno-Mendoza (✉)  
Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de  
Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de  
México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF, Mexico  
e-mail: angelica@biomedicas.unam.mx

$3\beta$ -Hsd1 mRNA has been detected in embryonic mouse ovaries at 13, 15, 17, and 20 *days postcoitum* (*dpc*), the absence of the expression of P450arom, P450scc and P450c17 steroidogenic enzymes might explain the steroidogenic quiescence of the female gonad (Greco and Payne 1994). The aim of the present study was to establish if mouse undifferentiated gonads express steroidogenic enzymes in a similar way as in sheep embryos. To know this, we analyzed the mRNA expression pattern of  $3\beta$ -Hsd1 and P450arom as well as the protein expression pattern of  $3\beta$ -HSD1 and Testosterone in embryonic gonads of normal mice.

## Materials and methods

### Animals and sex of the embryos

Mouse embryos from the normal CD-1 strain were kept according to the Guide for Maintaining and Using Laboratory Animals, provided by the Ethics Committee of the Biomedical Institute, UNAM. Embryos between 11.5 and 15.5 *dpc* were obtained and their stage was verified by counting the number of tail somites (E 11.5 is ~18ts; E 12.5 ~30ts) according to Hacker et al. (1995). At 11.5 *dpc*, the gonads are morphologically undifferentiated and the sex was determined by the presence or absence of sex chromatin in amniotic cells (Palmer and Burgoyne 1991) and checked by PCR amplification of the 600 bp fragment of the Y-encoded gene *Zfy* (Nagamine et al. 1989). Following 12.5 *dpc* the sex of the embryos was defined by morphological observation of the gonads.

### Immunofluorescences and confocal microscopy

Bilateral gonads with mesonephros were embedded in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA) and serial sections of 20  $\mu$ m thick were obtained to be used for immunofluorescence by conventional techniques. The sections were then incubated overnight with the primary antibodies and were treated with the secondary corresponding

antibody diluted 1:100 in fbovine serum albumin (Gibco, USA). As a negative control, samples without primary antibody were incubated. Subsequently, these were washed with PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco, USA) and double consecutive immunofluorescences were carried out, in order to simultaneously detect different proteins. Finally these were mounted in Dako paramount aqueous mounting medium (Dako North America, INC. USA). The antibodies and dilutions used are presented in Table 1. The sections were analyzed in a confocal microscope (LSM 5 Pascal, Zeiss) equipped with Argon-Krypton and Helium–Neon laser using filters BP 450–490 and 546/12. The double immunofluorescences were detected simultaneously.

### Extraction of RNA and RT-PCR

Pairs of fetal gonads without mesonephros were obtained and the extraction of total RNA was carried out using the Trizol/Chloroform technique. The “One Step” RT-PCR kit (Invitrogen) was used for the amplification of the fragments corresponding to the chosen genes. The protocol for amplification consisted of 38 cycles of 1 min at corresponding melting temperature. Six experiments were carried out using independent samples. RNA primers that flanked a 243 bp fragment of  $\beta$ -actin was used as the internal expression control and as negative control samples without RNA were used. The RT-PCR reactions were electrophoresed on a 1.5% agarose gel (Sigma) with 0.25 mg/ml Ethidium Bromide (Bio-Rad Laboratories) in TAE 1X (Tris-Acetate-EDTA). Gels were visualized by UV transillumination and photographed with a DS-34 Polaroid camera (Polaroid, Waltham, MA). The intensity of each band was quantified by densitometry using the Quantity One (Bio-Rad) program. The optical density (Intensity/ $\text{mm}^2$ ) for each amplified product was normalized with the corresponding  $\beta$ -actin values, taken as 100%. Thus, the values for each gene are presented as arbitrary units of expression relative to the  $\beta$ -actin signal. The primers used for RT-PCR and references are detailed in Table 2.

**Table 1** Antibodies and dilutions

Antibody	Brand	Dilution
Mouse monoclonal to HSD3B1	Abcam MA, USA (ab55268)	1:500
Rabbit polyclonal to Laminin	Sigma, Missouri, USA (L9393)	1:500
Rabbit polyclonal to Testosterone	Abcam MA, USA (ab8557)	1:50
Rabbit polyclonal to DDX4/MVH (Vasa)	Abcam MA, USA (ab13840)	1:250
Anti-mouse IgG FITC conjugate	Zymed, San Francisco, Cal. USA (61-6511)	1:100
Anti-rabbit IgG CyTM5 conjugate	Zymed, San Francisco, Cal. USA (81-6116)	1:100
Anti-rabbit IgG Rhodamine conjugate	Calbiochem, La Jolla, CA. USA (401321)	1:100

Primary and secondary antibodies used for immunofluorescence. All dilutions were prepared in bovine serum albumin

**Table 2** Sequence of primers and melting temperatures used for RT-PCR

Gene	Primers 5'→3'	AL	MT	Reference
3 $\beta$ -Hsd1	F: ACATGGCTCTGGGAGTTATAAGGT R: TTAGTGACTGGCAAGGCTTCTG	129 pb	60°C	Bouma et al. (2004)
Cyp19a1	F: ATAATGTCACCATCATGGTCCCGG R: GCATGATGTGTCTCATGAGGGTCA	579 pb	58°C	Stromstedt et al. (1996)
$\beta$ -Actin	F: GGGTCAGAAGGATTCTATG R: GGCTCTAAACATGATCTGGG	254 pb	56°C	Moreno-Mendoza et al. (2004)

Primer sequences employed for RT-PCR. *F* Forward sequence, *R* Reverse sequence, *bp* Base pairs of amplified fragment, *MT* Melting temperature, *AL* Amplicon Length. The amplification of  $\beta$ -Actin was used as a positive control

### Statistical analysis

The values of relative expression for each gene are presented as the averages for six independent amounts  $\pm$  their standard deviation. The statistical differences between gene expression were evaluated using a one way variance analysis (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test with a confidence interval of 95%. The ANOVA was carried out using the statistical Stat Plus 2007 Professional Software.

## Results

### 3 $\beta$ -HSD1 protein expression

The protein expression of the 3 $\beta$ -HSD1 was analyzed using double staining of 3 $\beta$ -HSD1 and Laminin proteins (Fig. 1). Laminin staining revealed the basement membrane and provides evidence that from 12.5 *dpc* the testicular cords have differentiated. The protein expression of 3 $\beta$ -HSD1 was detected in the cytoplasm of the cells. 3 $\beta$ -HSD1 positive cells were identified as a dimorphic pattern between males and females. In XY gonads, histochemical activity of 3 $\beta$ -HSD1 was detected in clusters of cells in all the ages analyzed. Following 12.5 *dpc* its localization is restricted to the interstitial cells which surround the testicular cords and correspond to fetal Leydig cell differentiating. Interestingly, in the XX gonads the expression of the 3 $\beta$ -HSD1 protein was detected between 11.5 and 12.5 *dpc*. At 11.5 *dpc* the distribution of the positive cells showed a similar pattern observed in XY gonads, while at 12.5 *dpc* 3 $\beta$ -HSD1 positive cells appeared to be randomly distributed in the central stromal region. However, between 13.5 and 15.5 *dpc* this enzymatic activity was not found any more in the ovaries.

### Testosterone protein expression

The Testosterone hormone activity was analyzed in embryonic gonads by immunofluorescent staining in XY

and XX gonads between 11.5 and 15.5 *dpc* (Fig. 2). Detection of Testosterone and Vasa were performed in the same section. Vasa protein expression appears specific for germ cells of both sexes at the developmental stages currently studied. The protein expression of Testosterone was detected in the cytoplasm of the cells throughout the interstitial region. In XY gonads, Testosterone activity was detected from 12.5 to 15.5 *dpc*, where the labeled cells were observed distributed in the stromal compartment and identified as Leydig cells. In XX gonads only some Testosterone positive cells were detected at 13.5 and 14.5 *dpc*. The Testosterone staining was detected in the cytoplasm region of somatic cells which were found surrounding the ovarian cords, in a similar way as the XY gonads.

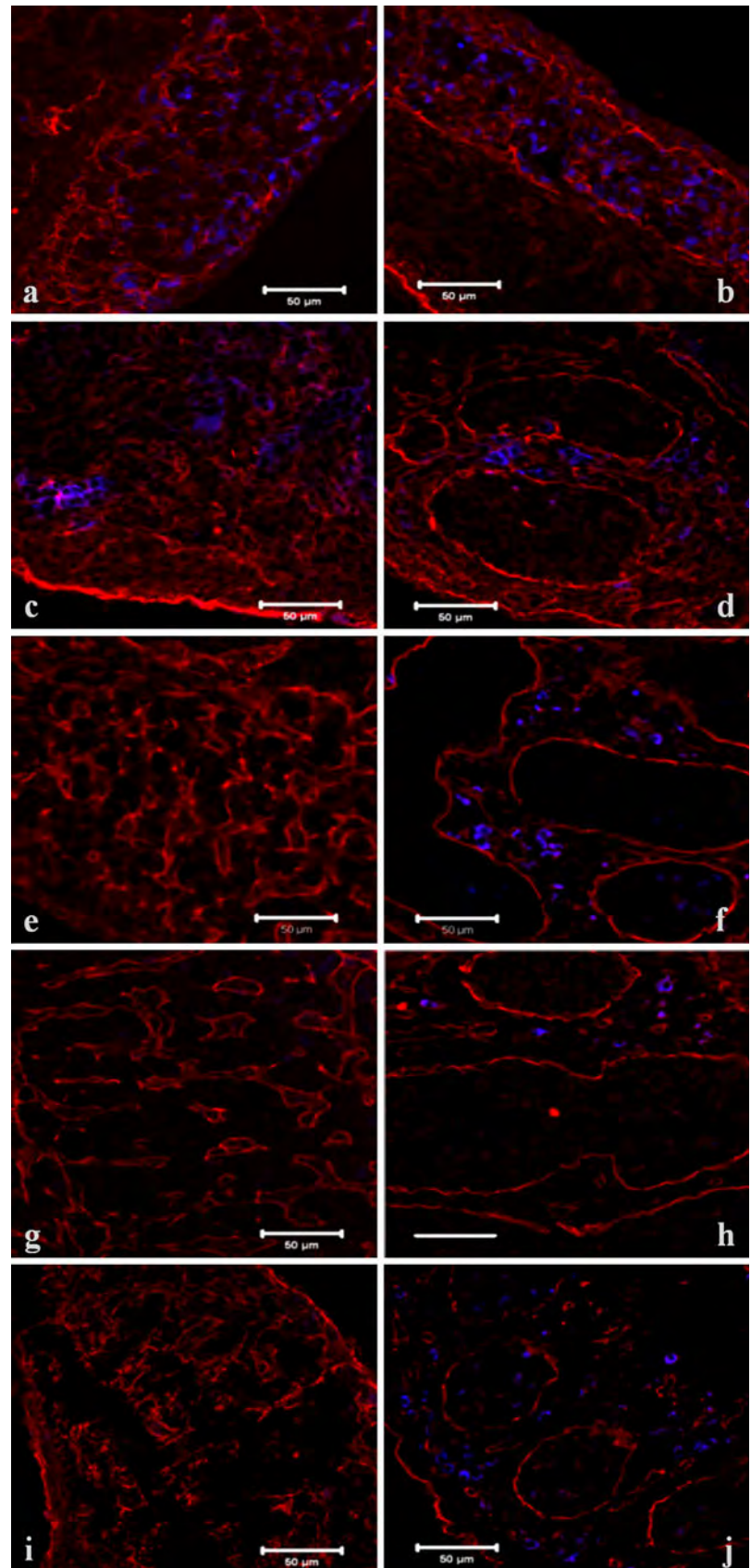
### Expression of 3 $\beta$ -Hsd1 and P450arom

The expression of the 3 $\beta$ -Hsd1 and Cyp19a1 (P450arom) was analyzed in the gonads of embryos between 11.5 and 15.5 *dpc* (Fig. 3a). The amplification by RT-PCR of these genes showed that 3 $\beta$ -Hsd1 was expressed in XX and XY gonads, in all the stages studied. The transcripts for the P450arom enzyme were not detected in embryonic stages of either sex. The expression of this enzyme was detected only in adult ovaries and testicles. A semi quantitative densitometry analysis revealed that the levels of 3 $\beta$ -Hsd1 increased slightly in relation to age in both XY and XX gonads (Fig. 3b). Nevertheless, statistical analysis did not indicate significant differences between the ages analyzed or between sexes. The levels of expression of 3 $\beta$ -Hsd1 appeared similar between females and males, but the transcripts detected in the XX gonads are lower than those detected in the XY gonads.

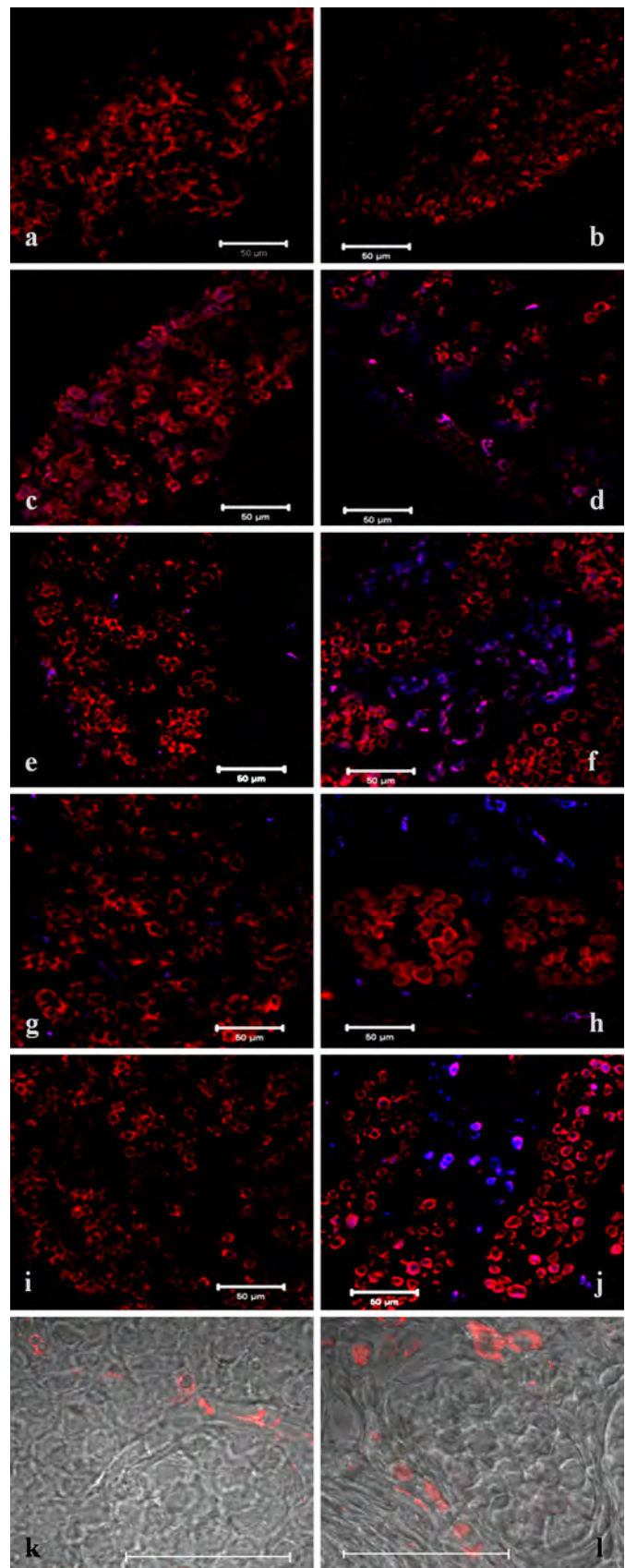
## Discussion

In the present work we analyze the expression of two enzymes involved in the process of steroidogenesis as much in female as in male gonads in embryonic stages. Our results showed that 3 $\beta$ -HSD1 enzyme is localized in the

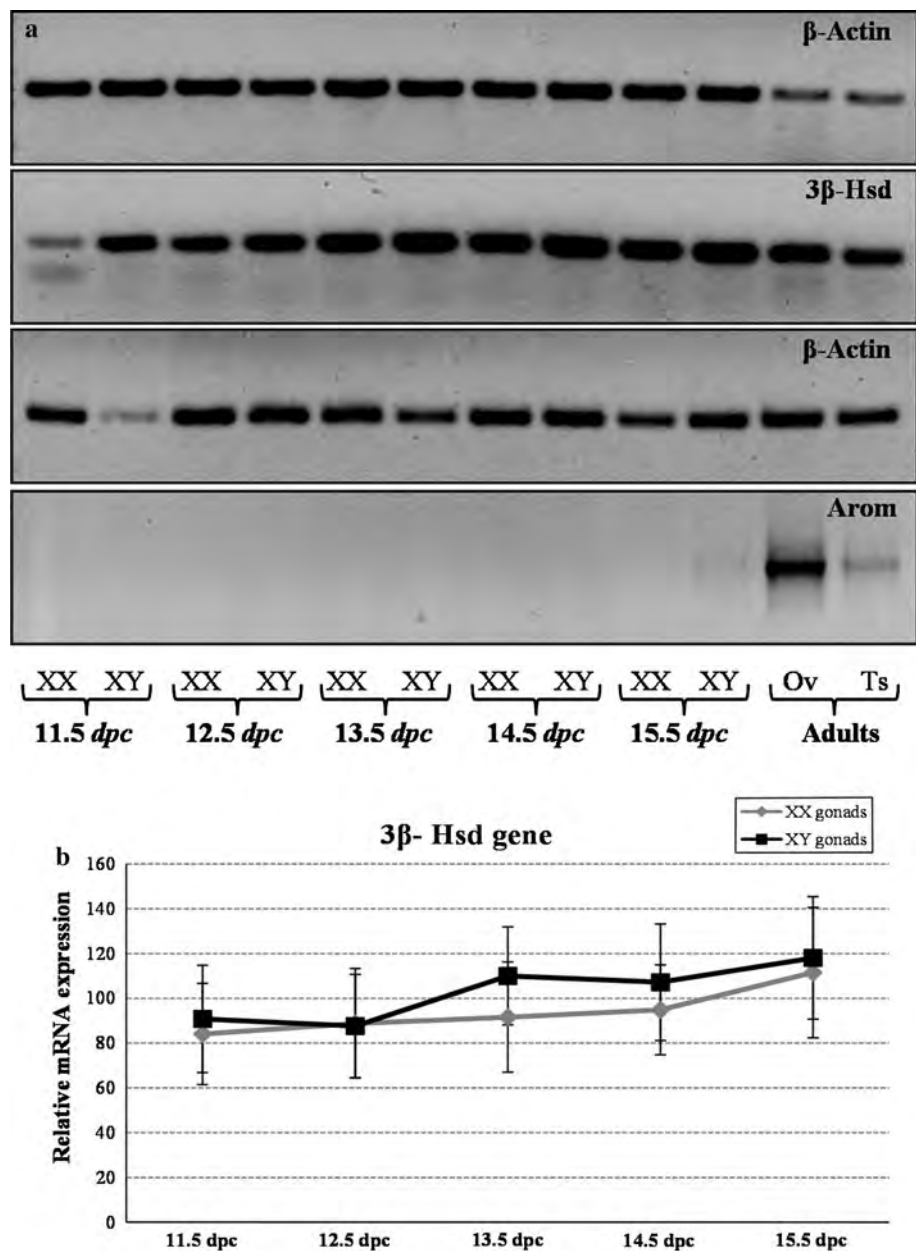
**Fig. 1** Detection of  $3\beta$ -HSD1 (blue) and Laminin (red) proteins were performed in the same section of XX (a, c, e, g, i) and XY (b, d, f, h, j) gonads at 11.5 (a, b), 12.5 (c, d), 13.5 (e, f), 14.5 (g, h) and 15.5 (i, j) *dpc*. The XY gonads express the  $3\beta$ -HSD1 protein in all the stages analyzed. In the XX gonads the protein was detected at 11.5 and 12.5 *dpc*. The ovarian and testicular cords are indicated by detection of the Laminin protein in basement membranes. *Bar* = 50  $\mu$ m. (Color figure online)



**Fig. 2** Detection of Testosterone (*blue*) and Vasa (*red*) proteins were performed in the same section. Gonads obtained from embryos at 11.5 (a, b), 12.5 (c, d), 13.5 (e, f), 14.5 (g, h, k, l) and 15.5 (i, j) *dpc*. The males (*right panel*) synthesize the hormone after 12.5 *dpc* and the females (*left panel*) produce it at 13.5 (e) and 14.5 *dpc* (g, k). The detection of Vasa in the cytoplasm of germ cells permits observing the morphology of the gonads. In XX gonads, some cells are positive to Testosterone in a similar way that the XY gonads (k, l). Bar = 50  $\mu$ m. (Color figure online)



**Fig. 3** Expression of  $3\beta$ -Hsd1 and P450arom transcripts in XY and XX gonads. Representative ethidium bromide gel electrophoresis of gonads from embryos at 11.5–15.5 *dpc* and ovary (Ov) and testis (Ts) was showed (a). The corresponding bands are shown for the  $3\beta$ -Hsd1 (129 pb) and P450arom (579 pb) genes.  $\beta$ -actin (254 pb) served as loading control. Graphic below gel show a semi quantitative data from densitometric profile of the  $3\beta$ -Hsd1/ $\beta$ -actin ratio obtained in RT-PCR assay (b). An increase in the levels of expression is evident as much among females, as among males. There was no evidence of significant statistical differences between the sexes. Values are given as mean  $\pm$  SD of at least six independent determinations (ANOVA followed by Tukey's test)



interstitial cells of the developing testes where Leydig cells differentiate, these being the principal producers of Testosterone required for the masculinization of the embryo. The detection of the enzyme observed in embryonic testes coincides with its localization in postnatal testicles (Baker et al. 1999; Dong et al. 2007). The former indicates that the antibody used is specific to the detection of isoform I of the  $3\beta$ -HSD which is expressed in gonads and adrenal glands (Bain et al. 1991). In XX gonads it is expressed before and during the period of sexual differentiation (11.5 and 12.5 *dpc*), which indicates that in these stages there are steroidogenic cells which may be producing intermediate metabolites catalyzed by the enzyme. The detection of this

important enzyme in the synthesis of Progesterone and Testosterone suggests that one of these metabolites is being produced; however the immunohistochemical analysis for the detection of Testosterone shows that the hormone does not produce at 11.5 and 12.5 *dpc*, when  $3\beta$ -Hsd1 is detected. This suggests that the Testosterone is not the principal metabolite being produced by the enzyme. In the ovarian embryos of sheep it has been observed that Progesterone and Estradiol are the hormones which are produced in greater amounts (Quirke et al. 2001), so that the analysis of these metabolites or others such as Androstenedione should be considered. The localization of Testosterone in XY gonads coincides with the interstitial



location of the  $3\beta$ -Hsd1 enzyme in steroidogenic cells, which allows us to confirm the specificity of the antibody which was used against Testosterone.

Greco and Payne (1994) showed that in 28% of mice ovaries at 13 *dpc*, and in 50% at 15 *dpc* the expression of type I  $3\beta$ -Hsd gene was detected, in contrast to our results where we found that in 100% ( $n = 6$ ) of the samples analyzed, the transcripts of the gene are expressed. The differences in our results concerning to the expression of the  $3\beta$ -Hsd1 gene compared to the data reported by Greco and Payne (1994) may be due to the sensitivity of the techniques employed, or to the strain of mice employed.

The detection of  $3\beta$ -HSD1 in the early stages of ovarian development, as well as the absence of Testosterone suggests that this enzyme may play a different role, and is likely to be participating in the specification of the somatic line that will produce steroidal hormones in postnatal stages. On the other hand, the detection of some cells stained with Testosterone suggests that the  $3\beta$ -HSD1 enzyme is functional and can be catalyzing in major quantity some other intermediate metabolite as the Progesterone.

It has been proposed that the process of sex differentiation between the 10.5 and 13.5 *dpc* in the mouse is crucial due to the fact that during this time the somatic cells of the gonads express a great number of genes depending on genetic sex. In females it is expressing close to 1,223 genes during this period (Nef et al. 2005), so that the expression of  $3\beta$ -Hsd can be regulated negatively by one or more of the above mentioned genes. Therefore, the absence of the protein and the presence of the transcripts of  $3\beta$ -Hsd1 observed in the present study, allow us to propose works directed to the analysis of factors that take the regulation of the expression as a function to protein translation level.

The  $3\beta$ -HSD enzyme controls critical steroidogenic reactions in the biosynthesis of steroid hormones, involved in the formation of glucocorticoids, mineralcorticoids, Progesterone, androgens and estrogens in a number of tissues (Simard et al. 2005). Postnatal ovary consists of follicles and corpora lutea, which have specific functions and depend on the differential expression of steroidogenic enzymes resulting in the selective production of hormones (Simard et al. 2005). In this sense, the regulation of the expression of steroidogenic enzymes such as  $3\beta$ -HSD is of great interest, particularly the involvement of the follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) in regulating the expression of  $3\beta$ -Hsd1 has been observed in several studies (O'Shaughnessy et al. 1998; Simard et al. 2005). However, in embryonic stages, the induction of steroidogenesis in the testis takes place in the absence of FSH and LH, so the expression of steroidogenic enzymes is under the control of gonadal factors such as SF-1, Star (Dong et al. 2007), Dax-1 and members of the GATA

family (LaVoie and King 2009). Similarly in the embryonic ovary, the expression of steroidogenic enzymes must be controlled by intragonadal factors. Generally, the expression levels of transcripts for a specific gene are analyzed, so they can be used as an approximation of the levels of protein expression that may be occurring, however in our study we observed that the expression of the transcripts of the  $3\beta$ -Hsd1 gene does not match the expression of the protein detected by immunofluorescence. Currently, several processes which regulate gene expression at a post-transcriptional level have been identified. Among the best known process are those which involve the control of splicing and stability, as well as translation and localization of mRNA transcripts. Recent works have revealed new mechanisms for post-transcriptional regulation, such as microRNAs (miRNAs) and the presence of protein with RNA recognition motif (RRM) and RNA-binding proteins (RBPs) which regulate post-transcriptional events (Revised in Keene 2007). It has been observed in the adult mouse testis, that a group of miRNAs associated with polysomes are present, suggesting that they play an important role in the translation process (Grivna et al. 2006). In the rat ovary, the presence of post-transcriptional regulation of the receptor for LH has also been reported. In this case, an mRNA binding protein (LH receptor mRNA-binding protein, LRBP) also participates, which binds the coding region of mRNA of the LH receptor inducing its degradation (Menon et al. 2007; Nair et al. 2002). Recently a global analysis of the proteome of mouse gonads during the period of sex determination was presented (11.5 and 12.0 *dpc*), where proteins were identified whose main functions are (1) modification and transport of post-transcriptional RNA, (2) the folding and synthesis of proteins and (3) post-translational modification (Ewen et al. 2009). The group of proteins whose function is post-transcriptional modification of RNA includes 31 genes which may be of great interest for the regulation of genes such as  $3\beta$ -Hsd, which in this study has been shown to be regulated in a post-transcriptional way. However, regulation of the enzyme by miRNAs activity should not be dismissed because this process has already been observed in adult mouse testes (Grivna et al. 2006).

Our analysis of RT-PCR to detect the transcripts of the Cyp19a1 gene (P450arom) showed that the enzyme is not being produced in the embryonic gonads of the mouse. These results coincide with Greco and Payne's analysis (1994) carried out on mouse gonads at 13 and 15 *dpc*. In comparison with sheep, rabbit or human ovaries, the absence of the P450arom enzyme and Testosterone indicates that Estradiol is not produced in the embryonic ovaries of mice. It has been proposed that in species where meiosis begins at a late stage, estrogens may be important for the proliferation of germ cells (Pailhoux et al. 2002) as

well as for the formation of the ovarian cords (Quirke et al. 2001), whereas in species which undergo immediate meiosis, the production of estrogens is not required. This proposal is upheld by our results where we observed that ovarian differentiation takes place normally in the absence of estrogens.

Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1 (Dax1) is an orphan nuclear receptor that is preferentially expressed in XX gonads (Mizusaki et al. 2003) and it has been observed that in vitro it is able to block the synthesis of steroids by inhibition of P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -Hsd and StAR (Lalli et al. 1998). It is thus a good candidate for the negative regulation of steroidogenesis in the mouse embryo. On the other hand it has been reported that the absence of Dax1, induces the expression of P450<sub>arom</sub> and an increase in the intratesticular levels of Estradiol, suggesting that Dax1 negatively regulates the expression of the enzyme (Wang et al. 2001). The absence of Cyp19a1 transcripts (P450<sub>arom</sub>) in the current study may be explained by Dax1 activity in embryonic stages.

Our results together with previous works employing Knockout mice for Aromatase demonstrates that the expression of this enzyme and the synthesis of Estradiol does not play an important role during the period of sexual differentiation of the mouse (Britt et al. 2004a). However, previous studies have demonstrated the importance of the synthesis of Estradiol in the functions of the adult ovary (Toda et al. 2004), particularly for controlling the size of the oocyte and the pool of primordial follicles in mice (Britt et al. 2004b).

A number of regulators in the expression of P450<sub>arom</sub> have been reported and it has been shown that in adult rat testis the transcription factor LRH-1 (Liver Receptor Homolog-1) is involved in the regulation of Aromatase in Leydig cells (Pezzi et al. 2004). Likewise, it has shown that Aromatase expression is tissue specific and is under the control of different promoters in the ovary, testis and brain of postnatal mice (Golovine et al. 2003). Our results show that in embryonic stages these promoters are not being activated even though it has been observed that during the differentiation of the gonads, genes are expressed which are involved in the regulation of Aromatase, for example LRH-1, DAX1 and SF-1. Aromatase expression in fetal stages has not been reported in wild mice and its expression has only been detected by induction of FSH in the culture organs. In the absence of FSH, the ovaries produce Estradiol from 3 days old, indicating that this hormone stimulates enzymatic activity in the mouse ovary (Terada et al. 1984).

In conclusion, our work shows that the transcripts of the 3 $\beta$ -Hsd1 gene are expressed during the gonadal differentiation in both sexes and subsequently the protein is

negatively regulated in the differentiated ovaries. This, together with the sporadic detection of Testosterone and the absence of the P450<sub>arom</sub> enzyme concurs with previous theories stating that the embryonic ovary is not steroidogenic.

**Acknowledgments** This work was supported by CONACyT (No. 81269) and DGAPA (No. IN205011). NR Antonio-Rubio is the beneficiary of a grant provided by CONACyT (195125). NR Antonio-Rubio thank to Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM for Ph.D. academic formation.

## References

- Bain PA, Yoo M, Clarke T, Hammond SH, Payne AH (1991) Multiple forms of mouse 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase and differential expression in gonads, adrenal glands, liver, and kidneys of both sexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(20):8870–8874
- Baker PJ, Sha JA, McBride MW, Peng L, Payne AH, O'Shaughnessy PJ (1999) Expression of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type I and type VI isoforms in the mouse testis during development. *Eur J Biochem* 260:911–916. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00245.x
- Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM (2004) Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 5:141–149. doi:10.1016/j.modgep.2004.05.001
- Britt KL, Stanton PG, Misso M, Simpson ER, Findlay JK (2004a) The effects of estrogen on the expression of genes underlying the differentiation of somatic cells in the murine gonad. *Endocrinol* 145(8):3950–3960. doi:10.1210/en.2003-1628
- Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, Misso ML, Simpson ER, Findlay JK (2004b) Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod* 71:1712–1723. doi:10.1095/biolreprod.104.028175
- Dong L, Jelinsky SA, Finger JN, Johnston DS, Kopf GS, Sottas CM, Hardy MP, Ge RS (2007) Gene expression during development of fetal and adult Leydig cells. *Ann NY Acad Sci* 1120:16–35. doi:10.1196/annals.1411.016
- Ewen K, Baker M, Wilhelm D, Aitken RJ, Koopman P (2009) Global survey of protein expression during gonadal sex determination in mice. *Mol Cell Proteomics* 8:2624–2641. doi:10.1074/mcp.M900108-MCP200
- George FW, Wilson JD (1978) Conversion of androgen to estrogen by the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 47:550–555. doi:10.1210/jcem-47-3-550
- Golovine K, Schwerin M, Vanselow J (2003) Three different promoters control expression of the aromatase cytochrome p450 gene (cyp19) in mouse gonads and brain. *Biol Reprod* 68:978–984. doi:10.1095/biolreprod.102.008037
- Gondos B, George FW, Wilson JD (1983) Granulosa cell differentiation and estrogen synthesis in the fetal rabbit ovary. *Biol Reprod* 29:791–798. doi:10.1095/biolreprod29.3.791
- Greco TL, Payne AH (1994) Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450: side chain cleavage, 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, P450, 17 $\alpha$ -hydroxylase C17–20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinol* 135:262–268. doi:10.1210/en.135.1.262
- Grivna ST, Beyret E, Wang Z, Lin H (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev* 20:1709–1714. doi:10.1101/gad.1434406

- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603–1614
- Juneau C, Dupont E, Luu-The V, Labrie F, Pelletier G (1993) Ontogenesis of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase  $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 Isomerase in the rat ovary as studied by immunocytochemistry and in situ hybridization. *Biol Reprod* 48:226–234. doi:10.1095/biolreprod48.2.226
- Keene JD (2007) RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8(7):533–543. doi:10.1038/nrg2111
- Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P (1998) DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. *Endocrinol* 139(10):4237–4243. doi:10.1210/en.139.10.4237
- LaVoie HA, King SR (2009) Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. *Exp Biol Med* 234:880–907. doi:10.3181/0903-MR-97
- Lorence MC, Murry BA, Trant JM, Mason JI (1990) Human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5-4 isomerase from placenta: expression in non steroidogenic cells of a protein that catalyzes the dehydrogenation/isomerization of C21 and C19 steroids. *Endocrinol* 126:2493–2498. doi:10.1210/endo-126-5-2493
- Menon KMJ, Nair AK, Wang L, Peegel H (2007) Regulation of luteinizing hormone receptor mRNA expression by a specific RNA binding protein in the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 260–262:109–116. doi:10.1016/j.mce.2006.03.046
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, 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. doi:10.1210/me.2002-0362
- Moreno-Mendoza N, Torres-Maldonado L, Chimal-Monroy J, Harley V, Merchant-Larios H (2004) Disturbed expression of Sox9 in pre-sertoli cells underlies sex-reversal in mice B6.Ytir. *Biol Reprod* 70(1):114–122. doi:10.1095/biolreprod.103.016824
- Nagamine M, Chan K, Lau F (1989) Chromosome mapping and expression of a putative testis determining gene in mouse. *Science* 243:80–83. doi:10.1126/science.2563174
- Nair AK, Kash JC, Peegel H, Menon KMJ (2002) Post-transcriptional regulation of luteinizing hormone receptor mRNA in the ovary by a novel mRNA binding protein. *J Biol Chem* 277(24):21468–21473. doi:10.1074/jbc.M111653200
- Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaefer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL, Vassalli JD (2005) Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Dev Biol* 287:361–377. doi:10.1016/j.ydbio.2005.09.008
- O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I (1998) Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinol* 139(3):1141–1146. doi:10.1210/en.139.3.1141
- Pailhoux E, Vigier B, Vaiman D, Serval N, Chaffaux S, Cribiu EP, Cotinot C (2002) Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev Dyn* 224:39–50. doi:10.1002/dvdy.10083
- Palmer SJ, Burgoyne PS (1991) The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. *Development* 113:709–714
- Pezzi V, Sirianni R, Chimento A, Maggolini M, Bourguiba S, Delalande C, Carreau S, Ando S, Simpson ER, Clyne CD (2004) Differential expression of Steroidogenic Factor-1/Adrenal 4 Binding Protein and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1)/Fetoprotein Transcription Factor in the rat testis: LRH-1 as a potential regulator of testicular aromatase expression. *Endocrinol* 145(5):2186–2196. doi:10.1210/en.2003-1366
- Quirke LD, Juengel JL, Tisdall DJ, Lun S, Heath DA, McNatty KP (2001) Ontogeny of steroidogenesis in the fetal sheep gonad. *Biol Reprod* 65:216–228. doi:10.1095/biolreprod65.1.216
- Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH (2005) Molecular biology of the 3 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta$ 5- $\Delta$ 4 isomerase gene family. *Endocr Rev* 26(4):525–582. doi:10.1210/er.2002-0050
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342–355. doi:10.1210/edrv-15-3-342
- Stromstedt M, Keeney DS, Waterman MR, Paria BC, Conley AJ, Dey SK (1996) Preimplantation mouse blastocysts fail to express CYP genes required for estrogen biosynthesis. *Mol Reprod Dev* 43(4):428–436. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199604)
- Terada N, Kuroda M, Namiki M, Kitamura Y, Matsumoto K (1984) Augmentation of aromatase activity by FSH in ovaries of fetal and neonatal mice in organ culture. *J Steroid Biochem* 20:741–745
- Toda K, Okada Y, Zubair M, Morohashi KI, Saibara T, Okada T (2004) Aromatase-knockout mouse carrying an estrogen-inducible enhanced green fluorescent protein gene facilitates detection of estrogen actions in vivo. *Endocrinol* 145(4):1880–1888. doi:10.1210/en.2003-0952
- Wang ZJ, Jeffs B, Ito M, Achermann JC, Yu RN, Hales DB, Jameson JL (2001) Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(14):7988–7993. doi:10.1073/pnas.141543298
- Wilson JD, George FW, Griffin JE (1981) The hormonal control of sexual development. *Science* 211(4488):1278–1284. doi:10.1126/science.7010602

**Zimbra:**

angelica@correo.biomedicas.unam.mx

± Tamaño de fuente -

---

**CBI2011/0653 PDF created - action required**

---

**De :** Editorial Office <editorial@cellbiolint.org>

mar, 29 de nov de 2011 12:47

**Asunto :** CBI2011/0653 PDF created - action required**Para :** Norma Moreno-Mendoza <angelica@biomedicas.unam.mx>

Dear Dr Moreno-Mendoza

Thank you for submitting your manuscript "Different levels of testicular organization during gonadal differentiation in B6.YTir mice manifesting sex reversal." to Cell Biology International.

We have now created a PDF from the main manuscript files you provided. Supplementary files are not included in your PDF.

If you have not already done so, please go to:

<http://www.cellbiolint.org/submit/>

log in and review the PDF. You will be able to approve or, if necessary, request amendments to the PDF at this time. We cannot make alterations to the files you provided.

PLEASE NOTE: your manuscript will NOT be sent for peer review until you have approved this PDF.

If you have already approved the PDF please disregard this email.

Thank you for your help.

Yours sincerely,

From the Cell Biology International Editorial Office

---

## **Different levels of testicular organization during gonadal differentiation in B6.Y<sup>Tir</sup> mice manifesting sex reversal**

Nivia Rocio Antonio-Rubio and Norma Moreno-Mendoza  
Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 México, DF,  
México

### **Short running title:**

Testicular organization for B6.Y<sup>Tir</sup> mice

### **Corresponding Author:**

Norma Moreno-Mendoza.  
Department of Cell Biology and Physiology, Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228  
México, D.F. 04510 México.  
Email: angelica@biomedicas.unam.mx  
Telephone number: 52 (55) 56 22 38 66  
Fax number: 52 (55) 55 50 38 93

**Keywords:** B6.Y<sup>Tir</sup>, gene expression, ovary, sex differentiation, sex reversal, testis.

### **List of abbreviations:**

3 $\beta$ -Hsd1 = 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1.  
B6 = C57BL/6J mouse strain.  
B6.Y<sup>Tir</sup> = Mice with Y chromosome from a strain in Tirano, Italy and autosomes and X-chromosomes from the B6 strain.  
Fgf9 = Fibroblastic growth factor 9.  
Foxl2 = Forkhead box transcription factor L2.  
Mis = Müllerian-inhibiting substance, member of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily.  
Rspo1 = Cysteine-rich secretory protein containing a thrombospondin type 1 repeat.  
Sox9 = Sry-related HMG box gene 9.  
Sry = Sex-determining region of the Y chromosome.  
Stra8 = Stimulated by retinoic acid gene 8.  
VASA = ATP dependent RNA helicase of the DEAD-box protein family.  
Wnt4 = Wingless-type MMTV (murine-mammary-tumor virus) integration site family, member 4

## **Abstract**

B6.Y<sup>Tir</sup> mice have provided an excellent study model for analyzing the sex development process; however the molecular mechanisms which contribute to sex reversal are not clear. The aim of this study was to establish which ovary development events may participate in the sex reversal of the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse. The study of the pattern of expression of genes related to testicular (Sry, Sox9 and Mis) and ovarian (Wnt4, Rspo1 and Stra8) differentiation in XY gonads of the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse and the normal strains CD-1 and C57/BL6J (B6) was undertaken by applying immunofluorescence and real time RT-PCR. It was observed that the expression of genes related to the process of sex differentiation is altered in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, both at the transcript level but also in terms of the proteins which induce the differentiation of ovaries and ovotestes, but do not form normal testicles. Our results indicated that the expression of testicular genes was inhibited at various levels, permitting the expression of ovarian genes such as Wnt4, Stra8 and Rspo1. However the activity of these genes was not clear when we analyzed our data as an average. Here we present a co-relation analysis which makes evident that an ovary differentiation pathway is activated, when the testicular differentiation pathway is inhibited.

## 1. Introduction

For more than two decades there have been reports that the transfer of the Y chromosome of the *Mus musculus domesticus* mouse (from Val Poschiavo, Switzerland [ $Y^{Pos}$ ] or Tirano, Italy [ $Y^{Tir}$ ]) of the C57BL/6J (B6) strain causes alterations in the process of testicular differentiation and produces individuals with either partial or complete sex reversal (Eicher et al., 1982). This new strain was identified as B6. $Y^{Dom}$ , B6. $Y^{Pos}$  or B6. $Y^{Tir}$  by a number of laboratories (Eicher et al., 1982; Taketo-Hosotani et al., 1989; Merchant-Larios et al., 1994). Offspring with XX chromosomes develop into normal females, but individuals with XY chromosomes become hermaphrodites in embryonic and adult stages. The true hermaphrodites become fertile males with bilateral ovotestis in their embryonic stages and with small testicles in adulthood (Eicher et al., 1982; Taketo-Hosotani et al., 1989; Houle and Taketo, 1992). All the XY embryos are able to develop ovaries and/or ovotestis and it has been suggested that the incompatibility between the Sry gene (sex-determining region on the Y chromosome) and the autosomal genes is the cause of this sex reversal (Carlisle et al., 1996; Eicher and Washburn, 2001). When Sry is not expressed, the XY individuals develop into phenotypic females because the cascade of gene expression for testicular differentiation is not activated (Berta et al., 1990; Koopman et al., 1990). However, even though Sry expression in the B6. $Y^{Tir}$  mouse is low and comes later than that found in normal SJLB6F1- $Y^{SjL}$  mice, relatively low levels of Sry transcripts were also observed in the normal B6 strain. It has been suggested that the pattern of expression relating to this gene is not the only cause of sex reversal (Lee and Taketo, 2001). On the other hand, the cascade of events which follow Sry expression, such as the activation of Sox9 (Bullejos and Koopman 2005a), Mis (Taketo et al., 1991; Lee and Taketo 1994) and  $3\beta$ -Hsd (Lee and Taketo 1994) is also delayed in the B6. $Y^{Tir}$  gonads.

Genes such as Sox9 are responsible for male sex development. Translocations or mutations of this gene cause Campomelic Dysplasia, commonly associated with sex reversal (Foster et al., 1994; Wagner et al., 1994). Its expression in gonads B6. $Y^{Tir}$  is reduced in the XY ovaries, when compared with the levels expressed in ovotestis, suggesting that the lineage of Sertoli cell precursors is specified, whereas differentiation towards Sertoli cells is inhibited. The inhibition of Sox9 in the entire genital crest allows the formation of the ovaries, and likewise ovotestes are formed when Sox9 expression is located in the central region of the genital crest (Moreno-Mendoza et al., 2004). Delayed expression of Sry and Sox9 were established as the cause of sex reversal in B6. $Y^{Pos}$ . The analysis of Sry expression in B6. $Y^{Pos}$  gonads suggests that this gene may be activated during a critical time period, in order to activate Sox9 and the pattern of events involved in sex determination prior to the initiation of the pattern of ovarian differentiation (Bullejos and Koopman, 2005; Hiramatsu et al., 2009).

In the absence of Sry and/or Sox9, undifferentiated gonads develop into ovaries which until recently was considered as differentiation by default or a passive process. The discovery of genes which participate actively in ovarian development has led to the idea that in the embryonic gonad there is a molecular mechanism which acts antagonistically towards the process of testicular development (DiNapoli and Capel, 2008; Lau and Li, 2009). This mechanism has recently been studied in the gonads of mice B6. $Y^{Pos}$  with sex reversal (Wilhelm et al., 2009). During the development of the ovotestis in this model, it was observed that in the central region of the gonad, testicular markers are evident, whereas the ovarian FOXL2 marker is detected at the poles, suggesting ovarian tissue development (Wilhelm et al., 2009).

Wnt4 (Vainio et al., 1999) Rspo1 (Parma et al., 2006) and Stra8 (Baltus et al., 2006) are genes that are related to the pattern of ovarian differentiation and which are up-regulated during the period of sex differentiation. Wnt4 and Rspo1 are essential to XX gonads and inhibit the male differentiation pathway. When Wnt4 is absent, masculinization is induced and a lack of Rspo1 causes female to male sex reversal. It has been suggested that Rspo1 may be synergic with Wnt4 in the XX gonads for stabilizing  $\beta$ -Catenin, which regulates the expression of other

genes, forming a complex together with the transcription factor TCT (Kim et al., 2006a; Maatouk et al., 2008). It has been suggested that this signaling pathway may act as an antagonistic signal for negatively regulating Sox9 and FGF9 and inhibit testicular development (Kim et al., 2006b). It has been reported that in humans with a chromosomal 46,XX component, mutations which cause a decline in the Rspo1 function induce differentiation in the testicular tissue, suggesting that this plays an important role in normal ovarian development (Parma et al., 2006; Tomaselli et al., 2008).

On the other hand, Stra8 participates in the premeiotic stages of germ cells that take place in the ovary, subsequent to the sex differentiation period. It has been suggested that the Wnt4 signaling pathway is able to control meiosis by regulating Stra8 and Cyp26b1 (Naillat et al., 2010).

Morphology analysis suggests that ovarian tissue may be present in the cortical region of B6.Y<sup>Tir</sup> ovotestes (Taketo-Hosotani et al., 1989). However the gene expression pattern defined by genes such as Wnt4, Rspo1 and Stra8 and related to ovarian differentiation in B6.Y<sup>Tir</sup> is poorly understood.

Based on these antecedents, we suggest that the expression of Sry probably initiates the pattern of sex determination in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, but is not sufficient either to activate and/or regulate genes such as Sox9 which are related to testicular differentiation. This then permits the expression of genes such as Wnt4, Rspo1 and/or Stra8 which play a role in ovarian differentiation. The aim of the present study was to establish those ovarian development events which may contribute to sex reversal in the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse. In order to establish whether the cascade events caused by Sry are affected, we analyzed the pattern of gene expression related to testicular (Sry, Sox9, Mis and 3 $\beta$ -Hsd1) as well as those related to ovarian differentiation (Wnt4, Rspo1 and Stra8), in the XY gonads of the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse, applying immunofluorescent staining and real time RT-PCR.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals**

All procedures were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Two normal strains of mice were used; CD1 and C57BL/6J (B6) mice were obtained from Charles River Wilmington, MA, and B6.Y<sup>Tir</sup> strain manifesting sex reversal. The B6.Y<sup>Tir</sup> males which were kept in our mouse colony had the Y chromosome of the *Mus musculus domesticus* mouse (Tirano, Italy) and the genetic background of B6. Female and male animals, aged between 8 and 10 weeks from all three strains were used. They had been maintained in individual plastic cages with access to food and water, with a 12 to 12 hour light/dark cycle. Breeding between the (B6.Y<sup>Tir</sup>) males and (B6) females was encouraged during the night and the following morning the females were separated and checked by inserting a vaginal tampon; this moment was recorded as 0.5 day post coitum (dpc). Embryos were staged by counting the number of tail somites (ts) distal to the hind limbs (E 11.5 is ~18ts; E 12.5 ~30ts) (Hacker et al., 1995). The pregnant females were sacrificed by cervical rupture and the embryos by decapitation. The number of embryos used in the experiments is specified in Table 1.

### **2.2. Sex of embryos**

Owing to the fact that at 11.5 dpc, mouse gonads were as yet morphologically undifferentiated, sex was determined by the presence or absence of the sex chromatin in amniotic cells (Palmer and Burgoyne, 1991). After 12.5 dpc, the artery and testicular cords permit males to be differentiated from females. Thus the sex of normal embryos was defined by



morphological observation of their gonads. The chromosomal sex of the B6.Y<sup>Tir</sup> embryos was determined by applying PCR, resulting in the amplification of a fragment consisting of 600 base pairs (bp) corresponding to the Zfy gene of the Y chromosome (Moreno-Mendoza et al., 2004). Pairs of gonads from CD1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> embryos were dissected at 11.5, 12.5 and 13.5 dpc. Gonads with mesonephros had immunofluorescence applied and gonads without mesonephros were subjected to RT-PCR analysis.

### **2.3. Immunofluorescent staining**

Gonads with mesonephros were fixed in paraformaldehyde (PFA, Gibco, USA) at 4% in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.1) for 15 minutes at room temperature and incubated at 4 °C in 30% sucrose (Sigma Aldrich) in PBS, over night. The tissues were placed in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Torrance, CA) and frozen in hexane (J. T. Baker) on dry ice. 20 µm thick sections were subjected to immunofluorescent staining. The samples were permeated with Triton X-100 solution (Sigma Aldrich) at 0.1% in PBS for 10 minutes and blocked with bovine serum albumin (BSA, Gibco, USA) at 1% in PBS, for two hours. The sections were incubated with the primary antibodies, throughout the night. The samples were washed four times over with PBS and incubated at room temperature for an hour with a secondary corresponding antibody, diluted in BSA, at 1:100. Subsequently, they were washed with PBS and post fixed with 4% PFA at room temperature for 15 min and once again incubated in BSA for 2 hours. Double and triple consecutive immunofluorescent staining was carried out for the simultaneous detection of different proteins. Finally they were mounted in Permanent Fluorescent Medium (Dako Cytomation).

### **2.4. Antibodies and dilutions**

The following primary antibodies were employed: rabbit polyclonal anti-human SOX9 raised to the human SOX9 C-terminal 24-amino-acid epitope diluted 1:250 (gift from Dr. V. Harley), specific goat polyclonal anti-MIS diluted 1:250 (C-20 antibody; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit polyclonal anti-DDX4/MVH (VASA) diluted 1:250 (Abcam MA, USA), rabbit polyclonal anti-HSD3b1 diluted 1:500 (Abcam MA, USA) and rabbit polyclonal anti-Laminin diluted 1:500 (Sigma, Missouri, USA).

The samples were incubated with the following secondary antibodies: goat anti-rabbit IgG CyTM5 conjugate (Zymed, San Francisco, Cal. USA), rabbit anti-goat IgG FITC conjugate (Calbiochem, La Jolla, CA. USA) and goat anti-rabbit IgG Rhodamine conjugate (Calbiochem, La Jolla, CA. USA). As a negative control, samples were incubated without the primary antibody. Double staining was performed with 3β-HSD1 and Laminin antibodies, and detected with goat anti-rabbit IgG CyTM5 and anti-rabbit IgG Rhodamine respectively. Triple staining was performed with SOX9, MIS and VASA (DDX4/MVH) antibodies detected by applying the secondary antibody goat anti-rabbit IgG CyTM5, rabbit anti-goat IgG FITC and goat anti-rabbit IgG Rhodamine respectively.

### **2.5. Confocal Microscopy**

The samples treated with immunofluorescent staining were analyzed using a confocal microscope (LSM 5 Pascal, Carl Zeiss) equipped with Argon-Krypton and Helium-Neon laser, using filters BP 450-490 and 546/12. Fluorescence was detected simultaneously by applying double and triples immune dye tests. Images were obtained for each sample and saved in the LSM format image files.

## **2.6. Quantifying Fluorescence**

Images were obtained under identical conditions, taking care that the maximum signal was not saturated. Analysis of images and measurements was carried out using the Start LSM Image Browser Software. In order to measure the intensity of fluorescent staining, random lines for tests were traced onto sections of the gonads and the value of absolute intensity was measured for each one. The value for fluorescence intensity was defined as the average of all intensity values for the points along the test line. The values of five test lines for each sample were quantified. At least two sections were analyzed for each gonad. All the data were obtained from separate experiments and the results were presented as the average  $\pm$  standard deviation.

## **2.7. RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR**

Total RNA was extracted from XX and XY gonads, using the Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's directions. To prevent DNA contamination, the RNA extractions were treated with 1  $\mu$ l Deoxyribonuclease 1 enzyme (DNase 1, Invitrogen) at room temperature for 30 minutes. DNase 1 enzyme was inactivated by the addition of 1  $\mu$ l EDTA (Invitrogen). All total RNA samples (tRNA) were analyzed for concentration by spectroscopy using a BioPhotometer (Eppendorf). The real time RT-PCR technique was applied with a final volume of 20  $\mu$ l with 150 ng of RNA free of DNA, gene specific forward/reverse primer (10  $\mu$ Mol) and a mixture of "One Step" RT-PCR (Invitrogen) with fluoro phosphate SYBR Green I (Amresco). The primers and annealing temperatures used for the analysis of RT-PCR are presented in Table 2. Primers for the  $\beta$ -Actin were used as positive controls whereas substitution of RNase free water (Gibco) was used as a negative control. Five experiments were carried out using a Rotor Gene Thermocycler (RG-300, Corbett- Research) with independent samples from individual embryos. The relative expression of each gene was normalized to that of  $\beta$ -Actin and analysis of results was performed using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Livak and Schmittgen, 2001).

## **2.8. Statistical analysis**

The patterns of expression for each gene are presented as the mean  $\pm$  standard deviation, obtained from five independent experiments. A multivariate analysis was carried out using the Statistical Analysis Package "Stat Plus 2007 Professional". The significant differences were evaluated by applying a one way Variance Analysis (ANOVA), followed by a Tukey multiple comparison test, with a confidence interval of 95%.

In order to determine the extent of the relationship in terms of the dynamics of gene expression between ovarian and testicular embryonic gonads, we obtained the correlation coefficient (Pearson's R) by applying correlation analysis for continuous and independent data.

## **3. Results**

### **3.1. Protein distribution of SOX9, MIS, 3 $\beta$ -HSD1 and VASA**

The expression of the studied proteins varies with each strain. XX gonads at 13.5 dpc were used as the control; in these samples SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1 protein were not found (data not shown). In the triple immunofluorescent staining, we observed that the expression of the VASA protein was located in the cytoplasm of the germ cells, in both XY (Figure 1) and XX gonads (data not shown). The CD-1 gonads began to express the proteins SOX9 and MIS on the 11.5 dpc. At 11.5 dpc, no testicular cords were found; however SOX9 and MIS proteins were

detected, having been produced by the differentiated Sertoli cells. At 12.5 and 13.5 dpc, testicular cords were evident, when observing the Sertoli cells which surround the germ cells.

In the double immunofluorescent staining (Figure 2), the Laminin marker at 11.5 dpc revealed the sexual cords, whereas at 12.5 and 13.5 dpc, testicular cords containing germinal and Sertoli cells were evident. In the CD-1 and B6 strains, at 11.5 dpc, the gonads expressed the 3 $\beta$ -HSD1 protein manifesting a homogenous distribution and at 12.5 and 13.5 dpc, its expression was detected in the interstitial region on the Leydig cells. In contrast to the CD-1 and B6 strains, in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain the testicular cords in certain gonads did not appear to be delimited by Laminin. At 11.5 and 12.5 dpc, all the gonads expressed 3 $\beta$ -HSD1 indicating that steroidogenic cells were specified, and at 13.5 dpc, gonads were found which did not express this protein in the same form as in XX gonads (data not shown).

Considering the three testicular markers in B6.Y<sup>Tir</sup> embryos, at 13.5 dpc, four types of gonads were observed (Figure 3) with varying levels of differentiation, and, when compared with testicles from the embryos of the CD-1 and B6 strains: 1) gonads did not express SOX9, MIS or 3 $\beta$ -HSD1, if only the VASA and Laminin marker were observed; 2) some samples expressed only SOX9; 3) others expressed SOX9 and MIS; and 4) a few expressed SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1. The three markers were localized only in the medullar region of the gonads. The testicular cords were evident at 13.5 dpc and were observed only in those gonads expressing SOX9 and MIS.

The testes of embryos from normal strains had differentiated at 13.5 dpc and SOX9, MIS, 3 $\beta$ -HSD1 proteins were detected in the lineages corresponding to the entire gonad containing well defined testicular cords. However in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain well differentiated testes were not detected but the formation of ovotestis was observed, and regionalization was observed in the testicular markers analyzed. MIS and 3 $\beta$ -HSD1 were detected in the medullar region where the formation of testicular cords was observed, whereas SOX9 protein was detected in both the medullar region and also in the cortical region (Figure 4).

### 3.2. Quantification of fluorescent staining

Fluorescence quantification was undertaken, using immune dye tests, in order to estimate the expression of each corresponding protein (Figure 5).

The analysis of fluorescent staining for VASA indicated that in the CD-1 strain there are no variations at the three different ages, as all maintain constant levels of fluorescence. In the B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains, significant differences were observed, showing that at 11.5 dpc, levels of fluorescence are less than at 12.5 and 13.5 dpc. At 12.5 and 13.5 dpc, no significant differences were found between the strains. Quantification of fluorescence was carried out by tracing only those test lines within the gonad; even though at 12.5 dpc, the VASA marker was also detected outside these, as it also proved to be located in the mesentery.

The fluorescent analysis for SOX9 indicated slightly lower levels of fluorescence in the case of the B6 strain than those obtained from the CD-1 strain, but no significant differences were found between these two strains. The B6.Y<sup>Tir</sup> strain manifested differences when compared to the two control strains, exhibiting lower levels of fluorescence when compared to the CD-1 and B6 strains.

The analysis of fluorescence in MIS showed that in the CD-1 and B6 strain there was an increase in expression with age, resulting in significant differences between that found at 11.5 and 13.5 dpc. At 11.5 dpc, significant differences were evident between the CD-1 and B6 strain. Concerning the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, levels of fluorescence at 11.5 dpc were low, as no protein expression was detected. At 12.5 and 13.5 dpc, fluorescence levels increased but did not match values observed in the case of the CD-1 or B6 strain and significant differences were evident.

### 3.3. Gene expression and molecular analysis

XX gonads were used as controls for the expression of each gene. In our statistical analysis, significant differences were observed between XX and XY gonads in terms of the expression of all genes. In the XX gonads, Sry and Mis genes were not detected, whereas low levels of Sox9 was detected and Wnt4, Stra8 and Rspo1 genes were expressed at higher levels than those in the XY gonads (Figure 6).

The XY gonads for the CD-1 and B6 strains presented similar patterns of expression, indicating that the majority of genes do not present significant differences. The gonads from the B6.Y<sup>Tir</sup> strain presented variability concerning the expression of genes, so that significant differences were observed for various cases, when compared to normal strains (Figure 7). In the CD-1 and B6 gonads, expression for the Sry gene was observed at 11.5 and 12.5 dpc. In both cases, greater expression was detected at 11.5 dpc. Significant differences were not observed between two strains, but there were variations in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain at the three different ages. Statistical analysis revealed an increase in the expression of transcripts of the Sox9 gene with the advancing age of the embryo, as much in the case of the CD-1 strain as in that of the B6 strain. No significant differences were apparent between these two strains for any of the ages analyzed. Analysis for the three ages of the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads showed lower levels of expression than those in the control strains with significant differences between them. The pattern of expression for the Mis gene is similar to that for Sox9, with an evident increase in levels as the age of the embryos progresses, in the case of both the CD-1 and B6 strains. No significant differences were detected between these two strains; however there were differences in the case of the B6.Y<sup>Tir</sup> strain at 12.5 and 13.5 dpc. The levels of expression detected in B6.Y<sup>Tir</sup> were low and did not reach the levels of either the CD-1 or B6 strains.

The pattern of expression for genes related to ovarian differentiation do not present significant alterations in the majority of cases. The expression for the Wnt4 gene is similar between the three strains and no significant differences were found for any of them. In the CD-1 and B6 strain a slight increase in expression was observed as age increased, in contrast to B6.Y<sup>Tir</sup>, where the greatest expression was observed at 12.5 dpc, and at 11.5 dpc the lowest level was found. The values presented by the B6.Y<sup>Tir</sup> strain were less than those pertaining to the control strains. No significant differences were observed in the expression of the Rspo1 gene at any of the ages of the three strains, in spite of the fact that the levels of expression found in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain were slightly higher than those of the CD-1 and B6 strains. The expression of the Stra8 gene did not manifest significant differences between the CD-1 and B6 strain at either of the ages tested but differences were found between the B6.Y<sup>Tir</sup> strain and control strains. The B6.Y<sup>Tir</sup> strain presented higher levels of expression at the three ages analyzed. The values observed were relatively constant without finding any statistically significant increase or decrease.

Due to the variability of phenotypes found in the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads, it probably will not be possible to distinguish a clear pattern for gene expression, when analyzed as an average. In the analysis of levels of transcript expression, no increase or decrease in statistically significant differences was observed. An analysis of the correlation between genes was performed in order to obtain a better interpretation of the results. The values for correlation coefficients obtained from the three strains indicate the relationship which exists between the dynamics of expression of the genes analyzed and presented in Table 3. The correlation between ovarian and testicular genes in strains CD1 and B6 is less than or equal to 0.6, observing that in some cases the relationship between genes is negative. A comparison of ovarian genes in both strains showed that the relationship is negative and less than 0.5, indicating that the levels of expression of these genes have no obvious relationship. In strain B6.Y<sup>Tir</sup>, the values for the coefficient of

correlation between testicular and ovarian genes indicate a negative relationship in all cases, suggesting that as one gene expression increases, the other decreases proportionally between 0.7 and 0.85. Ovarian genes in the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads showed correlation coefficients higher than those found in normal strains, indicating that these genes increase proportionally.

## 4. Discussion

### 4.1. Altered expression pathway of testicular markers

B6.Y<sup>Tir</sup> has proved to be an excellent model used by a number of laboratories, in order to detect sex development events. In this work, we analyzed genes in relation to ovary and testis differentiation, with the aim of identifying events involved in the B6.Y<sup>Tir</sup> phenomenon of sex reversal. Our results showed that the expression of genes related to the process of sex differentiation is altered in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, as much at the level of transcripts as in the proteins, when compared to its expression in CD-1 and B6.

The analysis of proteins permitted us to observe the presence of four gonad phenotypes in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, presenting delayed differentiation when compared to the CD-1 and B6 gonads. These results are consistent with studies undertaken by Taketo et al. (1991), who demonstrated that in this case the period of morphological differentiation in the testicle occurs 24 hours later than in normal strains. The absence of testicular markers such as SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1 and the variability in the RT-PCR analysis of the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads suggests that Sry is not capable of activating Sox9 with a resulting cascade of testicular differentiation, thus permitting these gonads to develop into an ovary. The location of SOX9 in the medullar region of the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads confirms to the pattern of expression previously observed by Moreno-Mendoza et al. (2004) who suggest that these gonads may become ovotestes if Sox9 is positively regulated, and likewise may form ovaries, if it is inhibited.

Recently it was reported that in B6.Y<sup>Tir</sup> gonads, MIS expression is restricted to the population of cells that are positive to SOX9 and that Sertoli cells are in differentiated testicular cords (Park et al., 2011). In the current work, the location of MIS also appeared to be in the medullar region and it has been observed that only those cells which express SOX9 are able to express MIS. However in the case of cells containing SOX9 found near the cortical region, this would appear to be insufficient for inducing the production of MIS and probably other testicular factors.

Although a normal testis is not formed in B6.Y<sup>Tir</sup>, we observed that cells localized in the central region of the ovotestes express protein markers of Sertoli and Leydig cells such as SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1. This process of cell differentiation in some cases enables the development of a small testis. The existence of different phenotypes is reflected in our RT-PCR analysis, where we find that the levels of expression for testicular genes are reduced and the levels of ovarian genes are slightly increased. On the other hand the levels of differentiation observed suggest the existence of a competent antagonist mechanism within the cortical and medullar region, inside the B6.Y<sup>Tir</sup> gonad. This suggests that the ovarian genes are being positively regulated in the gonad as a whole, in order to form an ovary or that in the cortical region the expression of testicular factors such as Sox9, Mis y 3 $\beta$ -Hsd1 is inhibited, also permitting the formation of an ovotestis. This hypothesis will possibly be confirmed in a future study evaluating the location of ovarian factors within the B6.Y<sup>Tir</sup> gonad. Generally our data show that the expression of testicular genes is being inhibited at various levels permitting the expression of ovarian genes, thus altering the normal differentiation of a testicle.

The expression of the SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1 proteins varies for each strain. Taking CD-1 strain as our control, we observed that the pattern for expression of these proteins is found

to be altered, as much in the B6 strain (considered to be normal) as in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain (manifesting sex reversal).

At 13.5 dpc, the XY gonads of CD-1 and B6 embryos have now been differentiated as testicles. The immunofluorescent staining for these cases showed the formation of well-defined testicular cords, made evident by the accumulation of Laminin protein in the base membrane. The Sertoli cells are marked with SOX9 and MIS, and the Leydig cells with the protein 3 $\beta$ -HSD1. The XY gonads of the B6.Y<sup>Tir</sup> strain at 13.5 dpc do not present the same morphology as that observed in the control strains. The morphology which can be observed in terms of the expression of the testicular markers is that the XY gonads of the B6.Y<sup>Tir</sup> strain at 13.5 dpc do not form normal testicles. Only those gonads which express SOX9 and MIS come to form testicular cords. These are located in the medullar region and may or may not express 3 $\beta$ -HSD1. It is also possible to observe that cells expressing SOX9 and MIS are present in the medullar region, but in the cortical region, the somatic cells only express SOX9 and neither of the two testicular markers.

The B6.Y<sup>Tir</sup> gonads present varying levels of expression at 11.5, 12.5 and 13.5 dpc, conforming to data presented by Lee and Taketo (1994), who found that the period for Sry expression in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain is extended by 36 hours, when compared to normal strains such as B6 or CD-1. The values observed in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain at the three ages do not reach the levels detected in the CD-1 and B6 strains, at 11.5 dpc.

Previous studies have reported the expression of 3 $\beta$ -HSD1 in XY gonads from normal strains after 13.5 dpc (Greco and Payne 1994; Lee and Taketo 1994). However in our study we observed that the 3 $\beta$ -HSD1 protein is expressed after 11.5 dpc, which may indicate that the steroidogenic cell line is specified early in gonadal development and that maintenance may depend on the proper differentiation of the supporting cell lineage, indicated by the expression of testicular factors such as SOX9 and MIS.

#### **4.2. Altered expression pathway of ovary markers**

Recently it was reported that in the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse, the expression of the ovarian marker Wnt4 does not decrease as occurs in normal XY gonads. Therefore, has been proposed that the ovarian differentiation pathway is being activated (Park et al., 2011). Similarly, in the present study it was evident that Wnt4 is not negatively regulated in the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads.

When the ovary gene expression patterns were analyzed as an average, observed expression levels did not reveal significant differences. However, the expression of the ovarian genes Wnt4 and Rspo1 increased on independent B6.Y<sup>Tir</sup> gonads; thus these genes appear to play an important role in the development of the XY ovaries and ovotestis. Currently, the number of genes which are known to be differentially expressed between XX and XY gonads and that probably participate in ovarian development is increasing (Bouma et al., 2010; Fujino et al., 2007), so that the possibility of the participation of other genes which inhibit testicular differentiation cannot be ignored.

It has been observed that in both mice and humans, positive regulation of Rspo1 is required in normal XX gonads in order to regulate the signaling pathway of Wnt/ $\beta$ -catenin and to induce differentiation of an ovary (Chassot et al. 2008; Tomaselli et al., 2011). Our data showed a slight increase in the expression of Rspo1 and Wnt4 in B6.Y<sup>Tir</sup> gonads which may suggest that the ovarian differentiation pathway is being activated in the absence or reduction of testicular differentiation factors. In the XX gonads of mice, the mRNA of Rspo1 is mainly detected in somatic cells, whereas in the XY gonads its expression is reduced and is located as much in somatic as in germ cells, although this protein does not appear to be evident in the case of males (Smith et al., 2008). The study the cellular localization of this protein within the developing ovotestis of the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse is of interest for better understanding the activation of this gene.

In our paper we show that levels of Sry, Sox9 and Mis expression in are lower than those found in normal strains and the expression of Stra8 and Rspo1 is slightly higher, indicating that the ovarian differentiation pathway may be being activated. These results uphold this idea, suggesting that within each cell, Sry expression must exceed a certain threshold in order for to activate Sox9 gene, and that if this threshold is not exceeded the testicular differentiation pathway will be inhibited and the ovarian differentiation pathway will be activated (Wilhelm et al., 2009). The correlation coefficients obtained confirm that in the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads, the expression of Sry, Sox9 and Mis decreases, whereas the expression of Stra8 and Rspo1 increases. This co-relationship is contrary to that observed in B6 and CD1 strains. Therefore, our data show that in the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads, the mechanism of ovarian differentiation is activated in direct proportion to the decrease in testicular gene expression.

#### **4.3. Germ cell marker and meiotic differentiation**

Previous studies have demonstrated that Sry expression is important for the migration of mesonephric cells towards the genital crest (Capel et al., 1999) as well as in the formation of the testicular cords (Tilman and Capel, 1999). These two processes induced by Sry activity are altered in the B6.Y<sup>Dom</sup> strain (Albrecht et al., 2000). An important event in the establishment of the undifferentiated gonad which takes place before the migration of the mesonephric cells is that of the arrival of the primordial germ cells when VASA (Mvh) is initially expressed (Tooyuka et al., 2000). In all the gonads analyzed for the CD-1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains, VASA protein was detected in the germ cells. However in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, the quantification of VASA fluorescence at 11.5 dpc was lower than in the CD-1 strain, indicating that in the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, the germ cells continue arriving towards the gonad, when in other strains such as the CD-1, they have already established themselves. This phenomenon indicates that not only the pattern for expression of genes such as Sry (Lee and Taketo, 1994), Sox9 (Moreno-Mendoza et al., 2004) and Mis (Taketo et al., 1991) is altered in this strain, but that other events which are important for the establishment of the gonad, such as the arrival of the germ cells are also altered. Our analysis of fluorescence for VASA indicated that in strains B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> an increase in germ cells took place. These data are consistent with studies reporting an evident increase in the number of germ cells positive to VASA in the gonads of both sexes between 11.5 and 12.5 dpc (Tooyuka et al., 2000).

Germ cells should play an important role in the sex differentiation pathway. It has been reported that the Stra8 gene is expressed in 129;B6Dax1-*Y* gonads with sex reversal at 13.5 dpc, whereas their expression was not apparent in normal XY gonads (Park et al., 2008). Our results are consistent with this data and indicated the activation of the Stra8 gene in B6.Y<sup>Tir</sup> gonads suggesting that the ovary differentiation pathway had been activated.

Previous work has suggested that Rspo1 participates in the survival of meiotic germ cells by positive regulation of the Wnt4 signaling pathway (Tomizuka et al., 2008) and is also involved in a decline in the adherence of female germ cells prior to the initiation of meiosis (Chassot et al. 2008). Thus, if Rspo1 regulates these two processes in normal XX gonads, this may explain the slight increase in the levels of Stra8 expression when Rspo1 is also positively regulated in the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads.

Germ cells in the fetal testis undergo mitotic arrest, whereas in the fetal ovary they initiate meiosis. It has been observed that the onset of meiosis is a process mediated by Retinoic Acid, which induces an increase in the expression of the Stra8 gene producing a protein required for pre-meiotic DNA replication (Anderson et al., 2008). Our analysis of the expression of Stra8 suggests that B6.Y<sup>Tir</sup> germ cells are activated in order to initiate the process of meiosis due to a decrease or absence of testicular factors. These data concur with ideas derived from studies of cell cultures indicating that the germ cells of both sexes have the potential to initiate meiosis and

that the male genital ridge produces a factor which inhibits the initiation of germ cell meiosis (McLaren and Southee, 1997).

The analysis of Stra8 expression in B6.Y<sup>Tir</sup> gonads used as marker of pre-meiotic cells showed that XY germ cells unlike XX are ready to initiate this process. These results are consistent with data reporting that the first meiotic division is carried out in an apparently normal way, with evident changes during the second meiotic division, probably due to the presence of the Y chromosome (Villemure et al., 2007).

Observing the increase in Stra8 expression, which is an important factor for meiosis to take place in the ovary, future studies may be directed towards factors which play a role in this phenomenon that is particular to the feminine gonad.

The expression of the testicular genes Sry, Sox9, Mis and 3 $\beta$ -Hsd1 appears to be being inhibited, permitting the expression of ovarian genes such as Stra8. However the study of other genes involved in the differentiation of the ovaries will permit us to understand the causes of sex reversal in the B6.Y<sup>Tir</sup> mouse.

## 5. Conclusions

Observations of gonadal phenotypes from the B6.Y<sup>Tir</sup> strain may suggest that: 1) in the XY<sup>Tir</sup> gonads, the Sry gene may fail to activate Sox9 thus permitting an ovary to be differentiated, 2) similar to Sry, the Sox9 gene may act within a specific time period to regulate the expression of genes such as Mis which cascade beneath the testicular differentiation pathway and 3) the steroidogenic lineage is specified early on in development and its maintenance depends on the differentiation of the support lineage made evident by the expression of Sox9 and Mis.

From the molecular analysis of the B6.Y<sup>Tir</sup> gonads, it can be deduced that: 1) the inhibition of the testicular differentiation mechanism permits the activation of the ovarian differentiation pathway, 2) the expression of Stra8 indicates that germ cells are programmed to initiate the process of meiosis in the absence or reduction of testicular factors and 3) the increased expression of Wnt4 and Rspo1 suggests that the ovarian differentiation pathway is probably activated in a region of the gonad (ovarian area) because they have not reached the expression levels detected in a normal ovary.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Ignacio Terrazas and Irma Rivera Montoya for help RT-PCR analysis, M. en C. Esmeralda Lira for technical assistance and V. Harley for donating the SOX9 antibody. NR Antonio-Rubio thank to Posgrado en Ciencias Biomédicas, UNAM for Ph. D. academic formation. We are indebted to Dr. Teruko Taketo for the kind donation of the B6.Y<sup>Tir</sup> strain.

## Funding

This work was supported by CONACyT [No. 81269] and DGAPA [No. IN218908]. NR Antonio-Rubio was beneficiary of a scholarship grant by CONACyT [195125].



## References

- Albrecht KH, Capel B, Washburn LL, Eicher EM. Defective mesonephric cell migration is associated with abnormal testis cord development in C57BL/6J XY *Mus domesticus* mice. *Dev Biol* 2000;225:26–36.
- Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, de Rooij DG. *Stra8* and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14976-14980.
- Baltus AE, Menke DB, Hu YC, Goodheart ML, Carpenter AE, De Rooij DG, Page DC. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 2006;38:1430-1434.
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990;348:448-45.
- Bouma GJ, Hart GT, Washburn LL, Recknagel AK, Eicher EM. Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene Expr Patterns* 2004;5:141–149.
- Bouma GJ, Hudson QJ, Washburn LL, Eicher EM. New candidate genes identified for controlling mouse gonadal sex determination and the early stages of granulosa and Sertoli cell differentiation. *Biol Reprod* 2010;82:380-389.
- Bullejos M, Koopman P. Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal. *Dev Biol* 2005a;278:473-81.
- Capel B, Albrecht KH, Washburn LL, Eicher EM. Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev* 1999;84:127–131.
- Carlisle C, Winking H, Weichenhan D, Nagamine CM. Absence of correlation between Sry polymorphisms and XY sex reversal caused by the *M. m. domesticus* Y chromosome. *Genomics* 1996;33:32-45.
- Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, De Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. Activation of  $\beta$ -catenin signaling by *Rspo1* controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 2008;17:1264–1277.
- DiNapoli L, Capel B. SRY and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol* 2008;22:1-9.
- Eicher EM, Washburn LL, Whitney JB III, Morrow KE. *Mus poshiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 1982;217: 535–537.
- Eicher EM, Washburn LL. Does one gene determine whether a C57BL/6J-Y (POS) mouse will develop as a female or as an hermaphrodite? *J Exp Zool* 2001;290:322-326.
- Foster J, Dominguez M, Guioli S, Kwok C, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Monsour S, Young I, Goodfellow P, Brook J, Schafer A. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994;372:525-530.
- Greco TL, Payne AH. Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 Side-Chain cleavage, 3(-Hydroxysteroid Dehydrogenase, P450 17(-Hydroxylase/C17-20 Lyase, and P450 Aromatase in fetal Mouse Gonads. *Endocrinology* 1994;135:262-268.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 1995;121:1603–1614.
- Hiramatsu R, Matoba S, Kanai-Azuma M, Tsunekawa N, Katoh-Fukui Y, Kurohmaru M, Morohashi KI, Wilhelm D, Koopman P, Kanai Y. A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development* 2009;136:129-138.
- Houle AM, Taketo TT. True hermaphrodites: an experimental model in the mouse. *J Urol* 1992;148:672-676.
- Kim KA, Zhao J, Andamiani S, Kakitani M, Oshima T, Binnerts ME, Abo A, Tomizuka K, Funk WD. R-spondin proteins. A novel link to  $\beta$ -catenin activation. *Cell Cycle* 2006a;5:23-26.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 2006b;4:1000-1009. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040187.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 1990;351:117-121.
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2474-2479.

Lee CH, Taketo T. Low levels of Sry transcripts cannot be the sole cause of B6-Y(TIR) sex reversal. *Genesis* 2001;30:7-11.

Lee CH, Taketo T. Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6.YDOM sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 1994;165:442-452.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25:402-408.

McLaren A, Southee D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol* 1997;187:107-113.

Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of beta-catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet* 2008;17:2949-2955.

Merchant-Larios H, Clarke HJ, Taketo T. Developmental arrest of fertilized eggs from the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Dev Genet* 1994;15:435-442.

Mohamed OA, Dufort D, Clarke HJ. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signaling at implantation. *Biol Reprod* 2004;71:417-424.

Moreno-Mendoza N, Torres-Maldonado L, Chimal-Monroy J, Harley V, Merchant-Larios H. Disturbed expression of Sox9 in pre-sertoli cells underlies sex-reversal in mice B6.Ytir. *Biol Reprod* 2004;70:114-122.

Nam JS, Turcotte TJ, Yoon JK. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr Patterns* 2007;7:306-312.

Palmer SJ, Burgoyne PS. The *Mus musculus domesticus* Tdy allele acts later than the *Mus musculus musculus* Tdy allele: a basis for XY sex-reversal in C57BL/6-YPOS mice. *Development* 1991;113:709-714.

Park S, Seidan K, Shin JS, Taketo T. SRY upregulation of SOX9 is inefficient and delayed, allowing ovarian differentiation, in the B6.YTIR gonad. *Differentiation* 2011;82:18-27.

Park SY, Lee EJ, Emge D, Jahn CL, Jameson JL. A phenotypic spectrum of sex development in *Dax1*(*Nr0b1*)-deficient mice: consequence of the C57BL/6J strain on sex determination. *Biol Reprod* 2008; DOI:10.1095/biolreprod.108.069492.

Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. R-spondin 1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 2006.

Smith CA, Shoemaker CM, Roeszler KN, Queen J, Crews D, Sinclair AH. Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *Dev Biol* 2008;8:72 doi:10.1186/1471-213X-8-72

Taketo T, Saeed J, Nishioka Y, Donahoe PK. Delay of testicular differentiation in the B6.YDOM ovotestes demonstrated by immunocytochemical staining for mullerian inhibiting substance. *Dev Biol* 1991;146:386-395.

Taketo-Hosotani T, Nishioka Y, Nagamine C, Villalpando I, Merchant-Larios H. Development and fertility of ovaries in the B6.YDOM sex-reversed female mouse. *Development* 1989;197:95-105.

Tilman C, Capel B. Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 1999;126:2883-2890.

Tomaselli S, Megiorni F, De Bernardo C, Felici A, Marrocco G, Maggiulli G, Grammatico B, Remotti D, Saccucci P, Valentini F, Mazzilli MC, Majore S, Grammatico P. Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (*RSPO1*) homozygous mutation. *Hum Mutat* 2008;29:220-226.

Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, Majore S, Grammatico P, Achermann JC. Human *RSPO1*/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments  $\beta$ -Catenin signaling. *PLoS ONE* 2011;6:1 e16366. doi:10.1371/journal.pone.0016366

Tomizuka K, Horikoshi K, Kitada R, Sugawara Y, Iba Y, Kojima A, Yoshitome A, Yamawaki K, Amagai M, Inoue A, Oshima T, Kakitani M. R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating Wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet* 2008;17:1278-1291.

Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev* 2000;93:139-149.

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

Villemure M, Chen HY, Kurokawa M, Fissore RA, Taketo T. The presence of X- and Y-chromosomes in oocytes leads to impairment in the progression of the second meiotic division. *Dev Biol* 2007;301:1–13.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolff U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 1994;79:1111-1120.

Wilhelm D, Washburn LL, Truonga V, Fellous M, Eicher EM, Koopman P. Antagonism of the testis- and ovary-determining pathways during ovotestes development in mice. *Mech Dev* 2009;126:324–336.

## Tables

Technique	Age	Strain		
		CD-1	B6	B6.Y <sup>1f</sup>
Immunofluorescence	11.5 dpc	5	3	4
	12.5 dpc	3	3	6
	13.5 dpc	3	3	10
Real time RT-PCR	11.5 dpc	5	5	5
	12.5 dpc	5	5	5
	13.5 dpc	5	5	5

**Table 1. Summary of the embryos used in this study.**

Number of embryos used in the experiments. Pairs of XY gonads were employed obtained from independent embryos.

Transcript name	Primer 5' → 3'	AS (bp)	AT (°C)	Reference
Sry	F: TTA TGG TGT GGT CCC GTG GT R: GGC CTT TTT TCG GCT TCT GT	124	60	Bouma et al. 2004
Sox9	F: GTG GCA AGT ATT GGT CAA R: GAA CAG ACT CAC ATC TCT	319	56	Moreno-Mendoza et al. 2004
Mis	F: CTA TTT GGT GCT AAC CGT GGA CTT R: AAG GCT TGC AGC TGA TCG AT	117	60	Bouma et al. 2004
Wnt4	F: TGT ACC TGG CCA AGC TGT CAT R: TCC GGT CAC AGC CAC ACT T	345	58	Mohamed et al. 2004
Stra8	F: GTT TCC TGC GTG TTC CAC AAG R: CAC CCG AGG CTC AAG CTT C	151	58	Koubova et al. 2006
Rspo1	F: TGT GAA ATG AGC GAG TGG TCC R: TCT CCC AGA TGC TCC AGT TCT	436	58	Nam et al. 2007
B-Actin	F: GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG R: GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG	254	56	Moreno-Mendoza et al. 2004

**Table 2. Sequence of primers and annealing temperatures used for real time RT-PCR.**

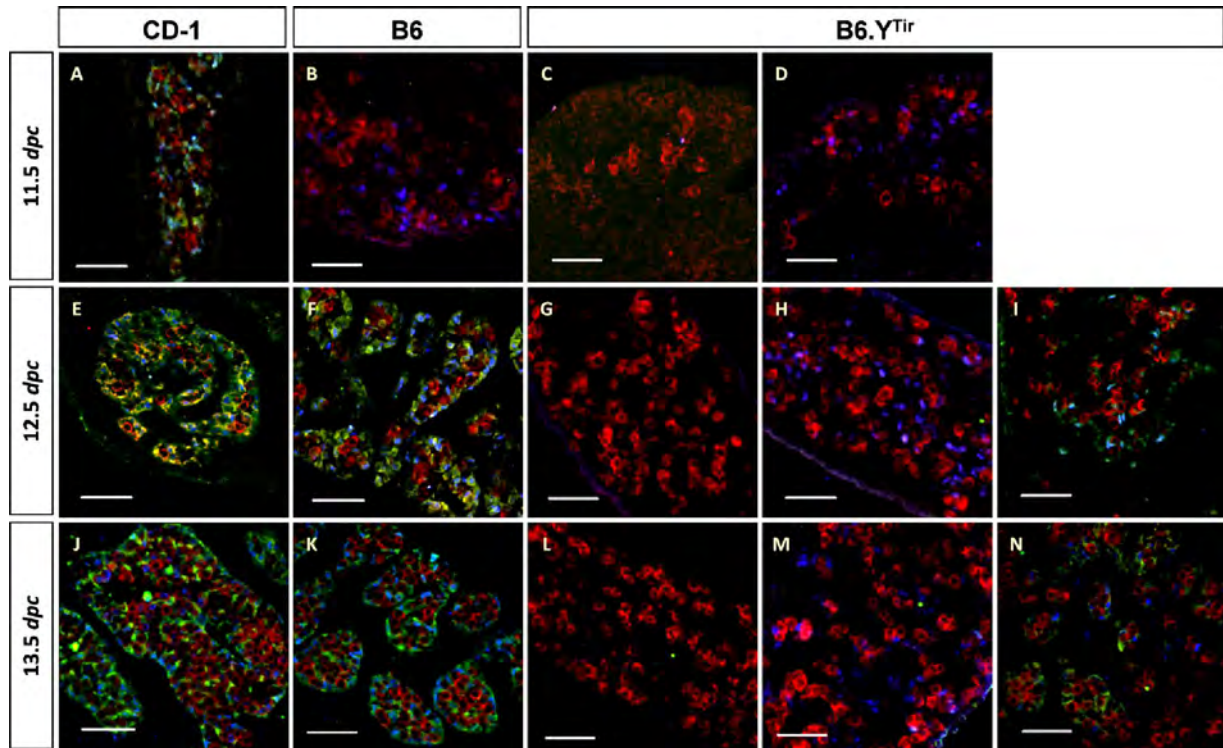
Sequences employed for real time RT-PCR. F = Forward sequence, R = Reverse sequence, bp = Base pairs of amplified fragment, AS = Amplicon size, AT = Annealing temperature. The amplification of  $\beta$ -Actin was used as a positive control

Cepa CD-1						
Vs.	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Sry	1.00					
Sox9	-0.81	1.00				
Mis	-0.86	0.80	1.00			
Wnt4	-0.42	0.17	0.44	1.00		
Stra8	-0.30	0.02	0.13	0.24	1.00	
Rspo1	0.20	-0.11	-0.17	-0.39	-0.17	1.00
Cepa B6						
Vs.	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Sry	1.00					
Sox9	-0.43	1.00				
Mis	-0.80	0.44	1.00			
Wnt4	-0.50	0.53	0.60	1.00		
Stra8	0.34	-0.13	-0.18	-0.23	1.00	
Rspo1	-0.09	0.07	0.11	-0.16	-0.45	1.00
Cepa B6.Y <sup>Tir</sup>						
Vs.	Sry	Sox9	Mis	Wnt4	Stra8	Rspo1
Sry	1.00					
Sox9	0.84	1.00				
Mis	0.76	0.55	1.00			
Wnt4	-0.59	-0.46	-0.31	1.00		
Stra8	-0.78	-0.70	-0.39	0.77	1.00	
Rspo1	-0.85	-0.71	-0.48	0.74	0.92	1.00

**Table 3. Correlation Coefficients.**

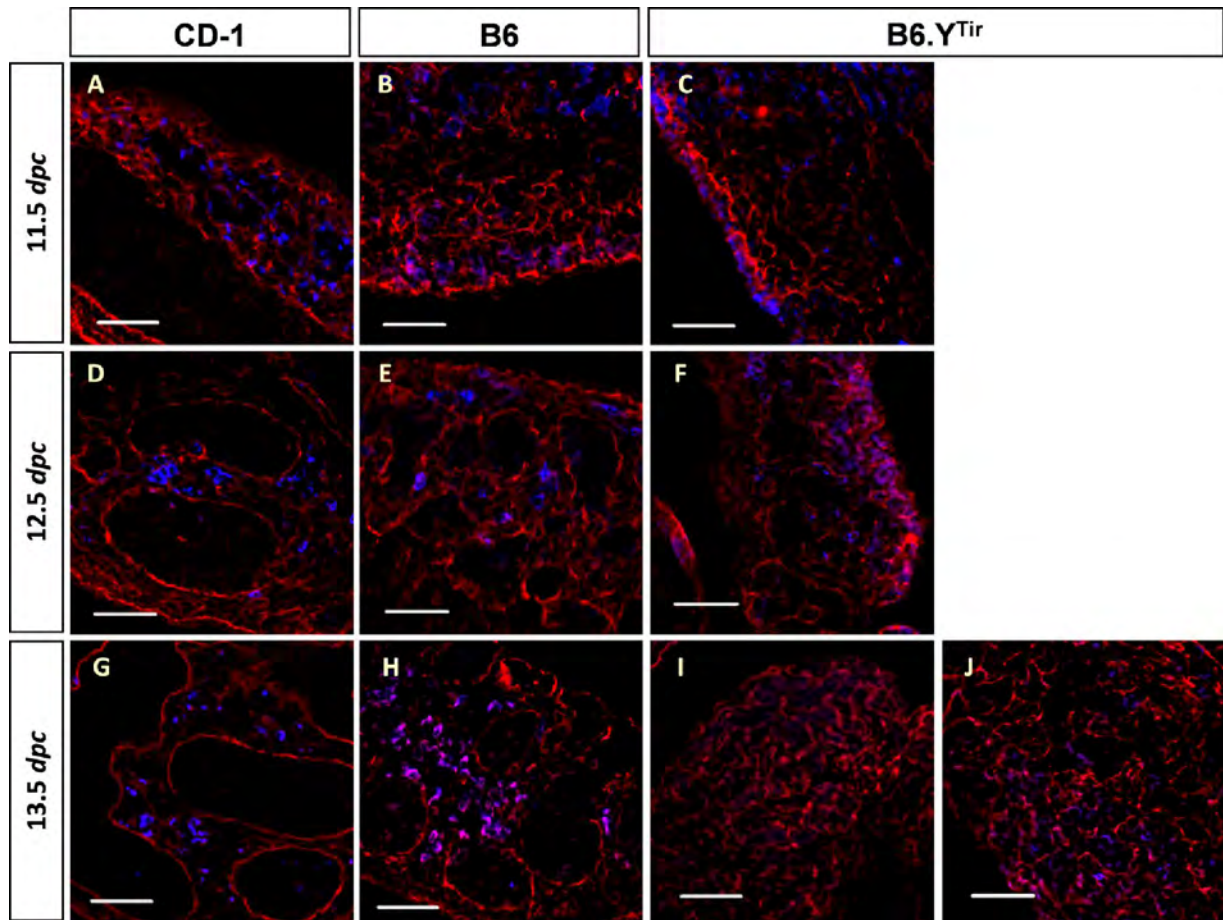
Values of the correlation coefficients between the dynamics of expression for Sry, Sox9, Mis, Wnt4, Stra8 and Rspo1 genes in XY gonads from CD-1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains. The dynamics of testicular and ovarian gene expression in embryonic XY gonads are presented.

## Figures



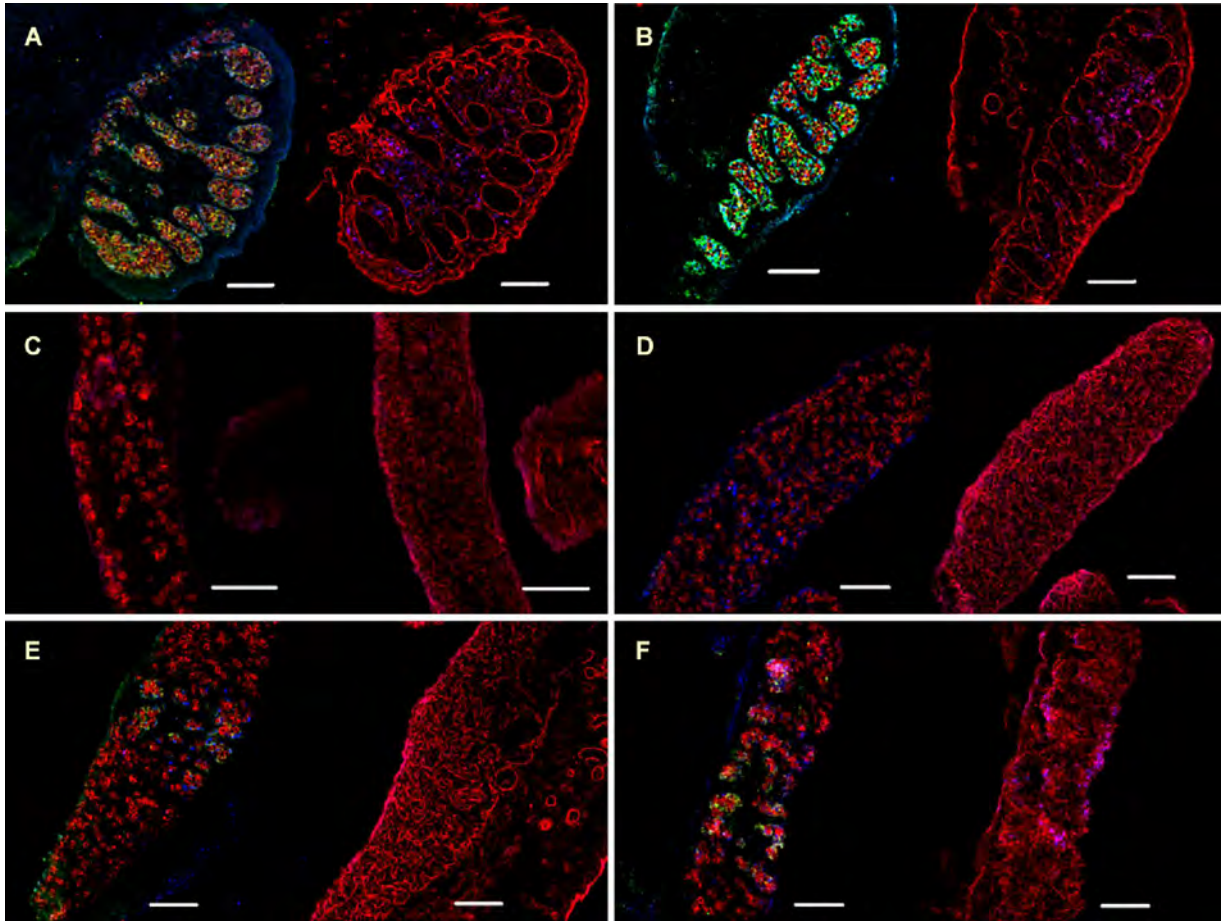
**Figure 1. Immunodetection of SOX9, MIS and VASA protein**

Triple immunofluorescence staining indicating the distribution of proteins: SOX9 (blue), MIS (green) and VASA (red) in gonad sections for embryos CD-1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> at 11.5, 12.5 and 13.5 dpc. VASA were detected in all the gonads analyzed. SOX9 and MIS were detected from 11.5 dpc onwards in the CD-1 strain (A, E, J). MIS were not detected at 11.5 dpc in B6 (B). In the B6.Y<sup>Tir</sup> strain they found three types of gonads a) with only the VASA marker (C, G, L), b) with VASA and SOX9 (D, H, M) and c) with VASA, SOX9 and MIS (I, N). Barr = 50µm.



**Figure 2. Immunodetection of 3 $\beta$ -HSD1 and Laminin protein**

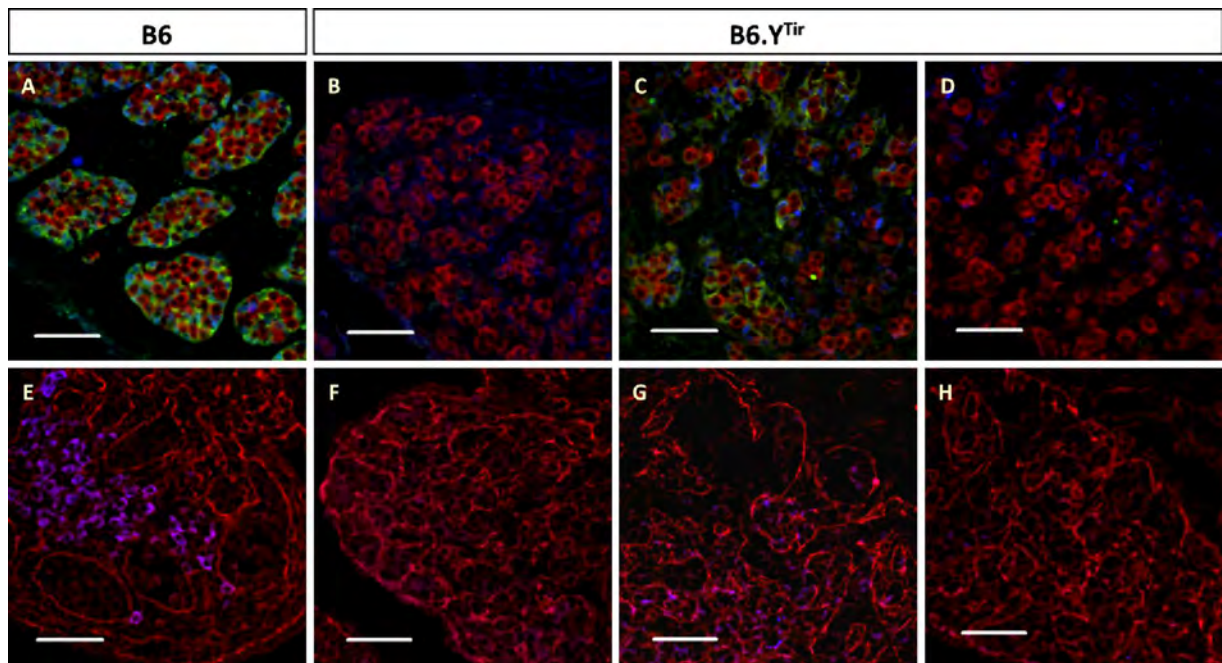
Double immunofluorescence staining showing XY gonads sections from 11.5, 12.5 and 13.5 dpc embryos. Expression for the protein 3 $\beta$ -HSD1 (blue) and Laminin (red) can be observed in the CD-1 (A, D, G) strains and B6 (B, E, H) with a similar distribution of proteins. The 3 $\beta$ -HSD1 restricts its distribution only to the interstitial region from 12.5 dpc onwards. In the B6.Y<sup>Tir</sup> (C, F, I, J) strain at 11.5 and 12.5 dpc it can be detected in all the gonads and at 13.5 dpc its expression is reduced or disappears. Barr = 50  $\mu$ m.



**Figure 3. Testicular organization levels of B6.Y<sup>Tir</sup> strain**

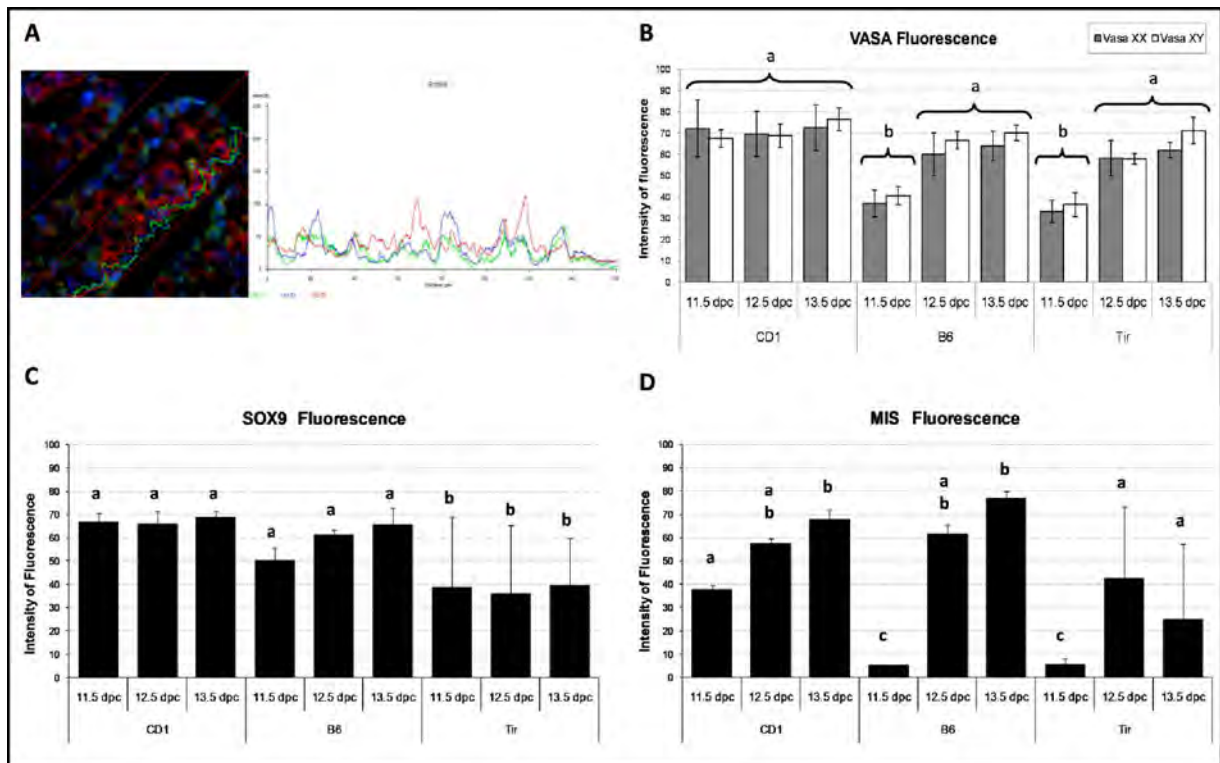
Double and triple staining in gonads from CD-1 (A), B6 (B) and B6.Y<sup>Tir</sup> (C-F) strains. The levels of gonad differentiation at 13.5 dpc are indicated. The morphology of CD-1 and B6 is very similar. In the B6.Y<sup>Tir</sup> strain, four phenotypes were found depending on the detection of testicular markers: None of the markers (C), SOX9 was found (D), expression of SOX9 and MIS (E) and expression of SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1 (F). Barr = 100  $\mu$ m.





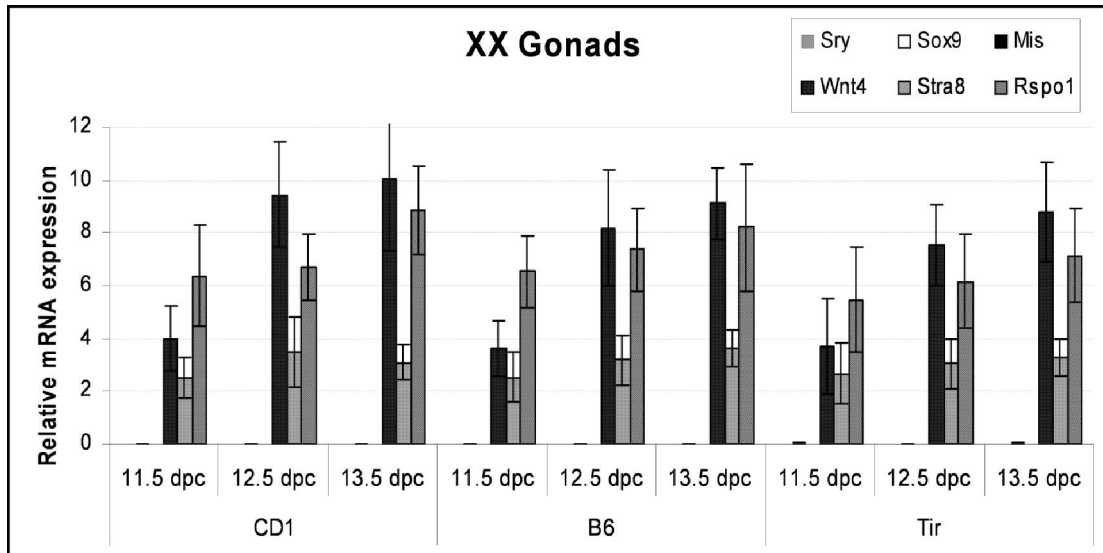
**Figure 4. Regionalization of B6.Y<sup>Tir</sup> gonads at 13.5 dpc**

Double and triple staining in gonads from B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains at 13.5 dpc. In the sections from the B6 (A, E) strain, the location of the testicular markers in the complete gonad are presented. In the B6.Y<sup>Tir</sup> sections the medullar region (C, G) and cortical (B, D, F, H) from an ovotestis are presented. In the medullar region, three testicular markers are detected SOX9, MIS and 3 $\beta$ -HSD1, whereas in the cortical region only the SOX9 marker is detected. Barr = 50  $\mu$ m.



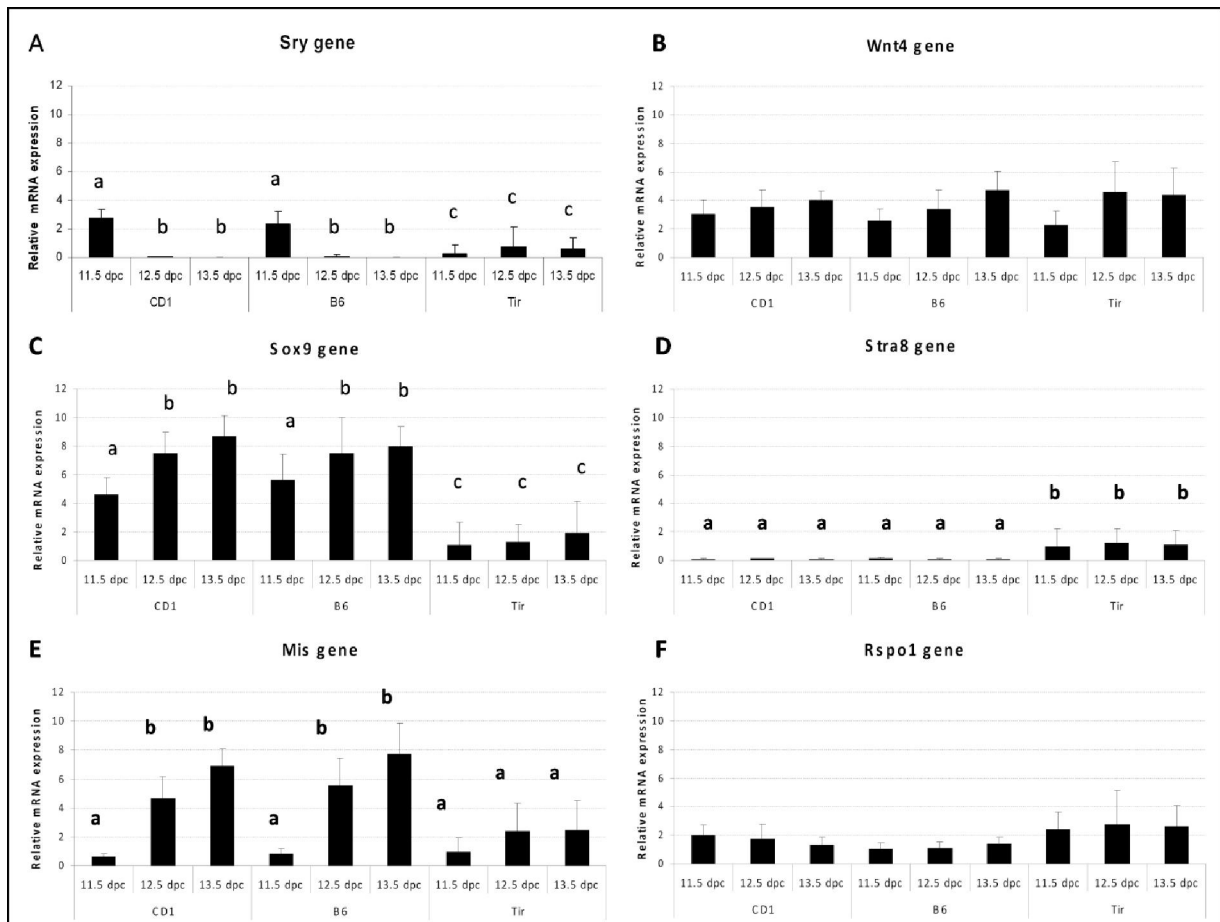
**Figure 5. Quantification of fluorescence**

Triple immunofluorescence staining show a line to measure the intensity of fluorescence (left A). Graph show the profile of intensity of fluorescence for three markers (right A). Graphs showing the fluorescence levels for VASA (B), SOX9 (C) and MIS (D) proteins in XY gonads indicating the significant differences between the CD-1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains. Statistical significant differences are indicated with different letters.



**Figure 6. Relative mRNA expression in XX gonads**

Graphs show the relative mRNA expression for testicular and ovarian related genes in XX gonads at 11.5, 12.5 and 13.5 dpc. Comparisons between CD-1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains don't show significant differences at the same stages. The expression of Sry and Mis genes in XX gonads was negative. Sox9 gene expression in XX gonads was detected at low levels. The expression of Wnt4, Rspo1 and Stra8 genes was used as ovary differentiation marker. This genes show significant differences with respect to XY gonads.



**Figure 7. Relative mRNA expression in XY gonads**

Graphs show the relative mRNA expression for testicular (left panel) and ovarian (right panel) genes in XY gonads at 11.5, 12.5 and 13.5 dpc. Comparisons between CD-1, B6 and B6.Y<sup>Tir</sup> strains show the significant differences (different letters) at the same age. B6.Y<sup>Tir</sup> show significant differences with CD-1 and B6 strain in the Sry, Sox9 and Mis genes. The expression of Wnt4, Rspo1 and Stra8 genes was used as ovary differentiation marker. Stra8 gene expression profile on B6.Y<sup>Tir</sup> gonads show significant differences with respect to CD-1 and B6.