



UNAM-GCH

**U N A M**

**Unidad Académica de los Ciclos Profesional y  
de Posgrado del Colegio de Ciencias y  
Humanidades.**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
Licenciada en Investigación Biomédica Básica  
p r e s e n t a**

**Susana Castro Obregón**

**Cuernavaca, Mor.**

**1992**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1  
2 ej.



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 está 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.

# INDICE

INTRODUCCION.....	3
Determinación Sexual.....	4
a) Determinación sexual ambiental.	
b) Determinación sexual genética.	
Diferenciación sexual.....	5
a) Diferenciación morfológica	
b) Diferenciación molecular.	
Factores de crecimiento y Proto-oncogenes en el desarrollo.....	10
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
Aislamiento de Gónadas Embrionarias.....	14
Sexado de Embriones Identificando Corpúsculo de Barr.....	15
Extracción de ARN.....	16
Diseño de oligonucleótidos.....	17
Purificación de oligonucleótidos.....	18
a) Con lavados con etanol.	
b) Con lavados con butanol.	
Síntesis de ADNc.....	19
a) Método convencional.	
Primera Cadena.	
Degradación enzimática del ARN y Segunda Cadena.	
b) Creando Adaptadores en los Extremos.	
Primera cadena.	
Degradación alcalina del ARN.	
Reacción Transferasa Terminal.	
Segunda Cadena.	
Precipitación con Isopropanol para Medir Incorporación Radioactiva.....	21
Sustracción.....	21
a) Hibridación.	
b) Cambio de Buffer: Lavado con Centricón.	
c) Digestión Doble Cadena.	
d) Síntesis Segunda Cadena.	

e) Amplificación Específica ADNc de Gónada.	
PCR para Detectar ARNm.....	23
Gels.....	23
a) Agarosa 3%/TBE/EtBr.	
b) Agarosa 1.5%/Urea/Citratos.	
c) Acrilamida 20%/Urea/TBE.	
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	29
REFERENCIAS.....	31
ANEXO FIGURAS.....	34

## INTRODUCCION.

Desde tiempos remotos el ser humano se ha preguntado sobre el origen de lo que observa: las estrellas, la tierra, los seres vivos, pero sobre todo su propio origen. En las primeras especulaciones todo tenía un origen divino; respecto al origen de los seres vivos por mucho tiempo predominó el pensamiento de Aristóteles con la idea del "Vitalismo", y conforme se fueron acumulando observaciones, se fueron planteando modelos para explicar la formación de los organismos pluricelulares. Algunas de estas ideas surgieron por ejemplo a través de la observación de un huevo de pollo durante tres semanas, donde una línea de células se convierte en dicho organismo. De la observación de que en el semen masculino se encuentran unos "animalitos", surgió la idea del "Preformismo" donde existían dos corrientes, ambas sin abandonar la influencia divina: los "animalculistas", quienes proponían que dentro de los "animalitos" (espermatozoides) existía ya un organismo miniatura, por ejemplo un ser humano, "El Homúnculo", que lo único que necesitaba era estar dentro de una mujer (el óvulo) para poder crecer hasta el tamaño de un niño recién nacido; y los "ovistas", quienes defendían que el organismo estaba preformado dentro del óvulo, y consideraban a los espermatozoides como parásitos. Aunque el Preformismo era una idea popular, había gente que no se conformaba con esa explicación, pues tenía una implicación paradójica: el homúnculo debía tener ya espermatozoides miniatura donde preexistiera un homúnculo todavía más pequeño, el cual también ya debía tener su microhomúnculo, y así sucesivamente (1).

Caspar Friedrich Wolff (1759), basado en la observación detallada del desarrollo del pollo, propuso la Teoría de la *Epigénesis*. Wolff notó que en las primeras etapas de desarrollo no podía encontrar ninguna parte del futuro embrión, aunque logró distinguir estructuras presentes: la sustancia que compondrá al embrión es granular (celular); estos gránulos posteriormente se arreglan en capas, hoy denominadas capas germinales, las cuales se angostan en unas partes, se engruesan en otras, se pliegan, etc. hasta organizar el cuerpo del embrión. Wolff concluyó que en un huevo temprano no existe un embrión preformado, sino sólo el material del que está construido. Las leyes que rigen la organización de estos materiales para formar un embrión, son responsabilidad de una "Fuerza Vital", concepto no muy diferente del "Principio Creativo" propuesto por Aristóteles (1,2). Con más observaciones y haciendo experimentos se logró un concepto de la vida no divino, predominando una visión objetiva, científica de la naturaleza.

Hoy en día se sabe que los organismos pluricelulares no aparecen de pronto, sino que se desarrollan, en la mayoría de los casos, a partir de una

sola célula: el huevo fertilizado. Esta única célula debe desarrollarse de tal manera que genere toda la diversidad de células del nuevo individuo (células musculares, de la piel, neuronas, linfocitos, etc.), proceso llamado diferenciación; por otro lado, debe existir una organización adecuada de las células diferenciadas en cada generación, proceso llamado morfogénesis; además de asegurar la continuidad de la vida de una generación a la otra. Ahora, la tarea es entender los mecanismos que guían el desarrollo del cigoto hasta la formación del individuo.

Un modelo para estudiar tanto la diferenciación celular como la morfogénesis es la gonadogénesis o formación de la gónada, órgano en el que se producen las células encargadas de continuar la especie (gametogénesis). Otra característica que convierte a la gónada en buen modelo respecto al resto de los órganos, es que una gónada en las primeras etapas del desarrollo es bipotencial, es decir, capaz de organizarse como ovario o como testículo, dependiendo del sexo del individuo.

## **DETERMINACION SEXUAL**

El sexo del individuo puede ser determinado por dos mecanismos:

### **A) Determinación sexual ambiental.**

Hay organismos en los que el sexo se determina después de iniciado el desarrollo, por alguna señal ambiental. Se distinguen dos tipos de factores ambientales:

1) *Los Abióticos*, como la temperatura que determina el sexo de algunas tortugas, cocodrilos, lagartijas, víboras; el fotoperiodo y la salinidad que actúan sobre diferentes especies de crustáceos; el pH que influye sobre algunos peces y crustáceos; el alimento que determina el desarrollo en algunas especies de crustáceos y en abejas (3,4).

2) *Bióticos*, como la liberación de sustancias como feromonas o aún excremento por animales de la misma especie, o por huéspedes de un parásito (4).

### **B) Determinación Sexual Genética.**

En otros organismos el sexo del individuo se determina desde el momento de la fertilización. Hay varios tipos de determinación sexual genética:

1) *Relación cromosomas sexuales: autosómicos (X:A)*. En Drosophila, el sexo se determina por un balance de los determinantes femeninos localizados en el cromosoma X y los determinantes masculinos localizados en los cromosomas autosómicos. Si hay sólo un cromosoma X en una célula diploide (X:2A), el organismo es macho; si hay dos cromosomas X en una célula diploide (2X:2A), el organismo es hembra. En Caenorhabditis elegans sucede lo mismo que en Drosophila, los machos son XO y las hermafroditas son XX (2).

2) *Hembra heterocigótica (WZ)*. En las aves y en algunos reptiles el macho es homocigótico ZZ y la hembra es heterocigótica WZ. Hay cierta evidencia de que el cromosoma W es determinante femenino, aunque no se han descrito individuos ZZW, o ZO que lo confirme. Ursula Mittwoch propone que la función del cromosoma W sea aumentar la tasa de crecimiento del rudimento gonadal izquierdo (en aves el rudimento gonadal derecho en general no se desarrolla como ovario, permaneciendo como rudimento), el cual, si alcanza un cierto tamaño en un estado determinado de desarrollo, se convierte en ovario; si no alcanza dicho tamaño, se desarrolla como testículo (5).

3) *Macho heterocigótico (XY)*. En mamíferos, si el cigoto es heterocigótico XY se desarrolla como macho y si es homocigótico XX se desarrolla como hembra. Se sabe que el cromosoma Y es determinante masculino dominante, pues los organismos cuyo cariotipo es XXY, XXXY, XXXXY o XXXXXY se desarrollan como machos, mientras que los cigotos XO se desarrollan como hembras. (2)

## DIFERENCIACION SEXUAL.

### Diferenciación Sexual Morfológica.

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo gonadal presenta una situación única: a diferencia del resto de los órganos, el primordio gonadal tiene dos opciones, puede diferenciarse como ovario o como testículo; dependiendo de como se desarrolle, determina el futuro desarrollo sexual del individuo. Inicialmente, la gónada pasa por un estado indiferenciado, en el cual no se distinguen características femeninas ni masculinas.

La gónada indiferenciada consiste de células somáticas y germinales primordiales agrupadas y unidas a la superficie epitelial. En esta etapa temprana del desarrollo se observan tres características morfológicas importantes: condensación de las células somáticas alrededor de la cresta

genital, acumulación gradual de componentes de la lámina basal alrededor del grupo de células epiteliales, y una baja actividad mitótica por parte de estas células en la cresta gonadal. Como consecuencia de estos cambios, se forman los llamados cordones sexuales o cordones gonadales tanto en las crestas genitales XX como en las XY. El origen de las células epiteliales no está claro, pero se postula que provienen de mesénquima mesodérmica (fig. 1) (6).

El primer evento de la diferenciación sexual morfológica ocurre en el macho, en el caso del ratón a los 12 días *post coitum* (dpc) y lo que se observa es una invasión de mesénquima y vasos sanguíneos provenientes de la región del mesonefros adyacente a la gónada, además de un aumento en la proliferación celular (6). Posteriormente, las células epiteliales de los cordones sexuales se diferencian para formar las células de Sertoli, las cuales tienen un retículo endoplásmico rugoso característico. Más tarde se diferencian las células del estroma para formar las células de Leydig, las cuales al producir testosterona inducen el resto del desarrollo sexual masculino que se describe abajo. Se postula que las células de Sertoli inducen la diferenciación de las células de Leydig, pero no hay datos que lo comprueben. Estos eventos ocurren comparativamente más tarde en el primordio gonadal femenino, donde se fragmentan los cordones sexuales para formar los folículos, se diferencian las células de la granulosa a partir de las epiteliales y las de la teca a partir de las células del estroma; estas últimas presentan actividad esteroidogénica (Fig.1) (2).

Los embriones de ambos sexos en la etapa de gónada indiferenciada desarrollan dos conductos, el conducto de Müller y el conducto de Wolff. A partir de estos conductos se desarrollarán los genitales externos, en el caso de un embrión femenino a partir del conducto de Müller y en el caso de un embrión masculino a partir del conducto de Wolff. El conducto que no diferencia a genitales externos degenera. En casi todos los mamíferos se sabe que si no hay la presencia de un Factor Determinante del Testículo (FDT), codificado en el cromosoma Y, el primordio gonadal se desarrolla como ovario. Las hormonas estrogénicas producidas por el ovario permiten la diferenciación del conducto de Müller hacia vagina, cérvix, útero y oviducto. Si hay FDT, éste regula el desarrollo gonadal hacia testículo. Una vez formado, el testículo secreta dos hormonas importantes: la Hormona Anti-Mülleriana (AMH), secretada por las células de Sertoli, la cual induce la degeneración del tejido que de otra manera formaría los tejidos femeninos; y la Testosterona, secretada por las células de Leydig, la cual masculinizará al embrión estimulando la diferenciación del conducto de Wolff hacia epidídimo, vías deferentes y vesículas seminales. Esta última hormona es convertida en la región urogenital a una forma más activa llamada 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, la cual participa en la formación del pene, escroto y otras porciones de la anatomía masculina. La testosterona también actúa inhibiendo el desarrollo



genital, acumulación gradual de componentes de la lámina basal alrededor del grupo de células epiteliales, y una baja actividad mitótica por parte de estas células en la cresta gonadal. Como consecuencia de estos cambios, se forman los llamados cordones sexuales o cordones gonadales tanto en las crestas genitales XX como en las XY. El origen de las células epiteliales no está claro, pero se postula que provienen de mesénquima mesodérmico (fig. 1) (6).

El primer evento de la diferenciación sexual morfológica ocurre en el macho, en el caso del ratón a los 12 días *post coitum* (dpc) y lo que se observa es una invasión de mesénquima y vasos sanguíneos provenientes de la región del mesonefros adyacente a la gónada, además de un aumento en la proliferación celular (6). Posteriormente, las células epiteliales de los cordones sexuales se diferencian para formar las células de Sertoli, las cuales tienen un retículo endoplásmico rugoso característico. Más tarde se diferencian las células del estroma para formar las células de Leydig, las cuales al producir testosterona inducen el resto del desarrollo sexual masculino que se describe abajo. Se postula que las células de Sertoli inducen la diferenciación de las células de Leydig, pero no hay datos que lo comprueben. Estos eventos ocurren comparativamente más tarde en el primordio gonadal femenino, donde se fragmentan los cordones sexuales para formar los folículos, se diferencian las células de la granulosa a partir de las epiteliales y las de la teca a partir de las células del estroma; estas últimas presentan actividad esteroidogénica (Fig.1) (2).

Los embriones de ambos sexos en la etapa de gónada indiferenciada desarrollan dos conductos, el conducto de Müller y el conducto de Wolff. A partir de estos conductos se desarrollarán los genitales externos, en el caso de un embrión femenino a partir del conducto de Müller y en el caso de un embrión masculino a partir del conducto de Wolff. El conducto que no diferencia a genitales externos degenera. En casi todos los mamíferos se sabe que si no hay la presencia de un Factor Determinante del Testículo (FDT), codificado en el cromosoma Y, el primordio gonadal se desarrolla como ovario. Las hormonas estrogénicas producidas por el ovario permiten la diferenciación del conducto de Müller hacia vagina, cervix, útero y oviducto. Si hay FDT, éste regula el desarrollo gonadal hacia testículo. Una vez formado, el testículo secreta dos hormonas importantes: la Hormona Anti-Mülleriana (AMH), secretada por las células de Sertoli, la cual induce la degeneración del tejido que de otra manera formaría los tejidos femeninos; y la Testosterona, secretada por las células de Leydig, la cual masculinizará al embrión estimulando la diferenciación del conducto de Wolff hacia epidídimo, vías deferentes y vesículas seminales. Esta última hormona es convertida en la región urogenital a una forma más activa llamada 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona, la cual participa en la formación del pene, escroto y otras porciones de la anatomía masculina. La testosterona también actúa inhibiendo el desarrollo

del primordio de las glándulas mamarias. Se puede concluir que sin AMH o Testosterona, el cuerpo inevitablemente tendría rasgos de fenotipo femenino, como es el caso de cierto hermafroditismo en humano, donde el individuo tiene genitales internos masculinos pero externos femeninos debido a una mutación en el receptor de la testosterona (2). En la figura 2 se esquematizan los eventos que guían el fenotipo sexual en mamíferos.

**Diferenciación Sexual Molecular.**

Hasta ahora se ha hecho muy poco trabajo para analizar los eventos moleculares involucrados en la diferenciación sexual gonadal en mamíferos. La mayoría de los datos provienen de esfuerzos por identificar el gene que codifica para el Factor Determinante del Testículo (FDT).

En ciertos casos clínicos se encontraron individuos cuyo cariotipo no correspondía al fenotipo: se encontraron mujeres XY y hombres XX (siendo éstos uno de cada 20 000 hombres). Al analizar el genoma de estas personas, se encontró que había ocurrido una translocación del cromosoma Y al X, de manera que a las mujeres XY les faltaba el extremo del brazo corto del cromosoma Y, mientras que en los hombres XX se encontraba esta región en uno de los cromosomas X (7). Estos datos sugirieron que el gene responsable de la masculinización de los individuos (FDT), mapeaba en esta región; estudios más detallados, haciendo hibridación de ADN genómico de estos individuos con ADN específico del cromosoma Y, redujeron la zona de localización del FDT a la punta del brazo corto del cromosoma Y (8). Evidencia similar obtenida del estudio del ratón apoyó los datos sobre la localización del FDT en esta región de ADN (9). Varios investigadores se dieron a la tarea de identificar este gene y se logró delimitar la zona de localización a una región de 35Kb del genoma humano. En esta región se encontró una secuencia macho-específica presente en machos XX y ausente en hembras XY, denominada *SRY* (sex determining region Y). Se ha secuenciado un fragmento y se encontró que esta región codifica para una proteína que tiene un motivo de unión a ADN similar al que presenta el grupo de proteínas no histónicas de alta movilidad (high mobility group, HMG). Algunas de estas proteínas parecen funcionar como factores de transcripción, de manera que, por analogía, se supone que el gene *SRY* pudiera funcionar igual(10). Si este gene en realidad codifica para el FDT, se espera que se exprese en la cresta genital inmediatamente antes, o durante la diferenciación testicular. Se estudió el patrón de expresión del gene análogo al *SRY* en ratón, llamado *Sry*, y resultó expresarse en las células somáticas de la gónada indiferenciada inmediatamente antes y durante las primeras etapas de la diferenciación hacia testículo (entre 10 y 11.5 dpc, disminuyendo a los 12.5 dpc). Este es el único momento en que se encontró expresión de *Sry* en el embrión (11,12). Otra evidencia de que *SRY* codifica para FDT es

el descubrimiento de que algunas mujeres XY tienen mutaciones puntuales o de cambio del marco de lectura en este gene (13,14). La prueba contundente de que el *Sry* codifica para FDT fue la construcción de ratones transgénicos, en los cuales se obtuvo masculinización de ratonas XX al introducirles la región del *Sry* (15).

La diferenciación de una gónada indiferenciada hacia ovario o hacia testículo parece depender de la expresión de *Sry* en las células epiteliales de los cordones sexuales. Esto se observó haciendo quimeras con blastómeros XX y XY de ratón, las cuales se desarrollan como machos (16) en cuyos testículos las células de Leydig son tanto XX como XY, mientras que las células de Sertoli son sólo XY (17). Esto indica que las células XX pueden formar parte del testículo, pero que el evento crítico en la diferenciación testicular parece ser la diferenciación de las células de Sertoli, inducida por la expresión de *Sry*. Puesto que estas células son las primeras en aparecer, es posible que el *Sry* funcione sólo en estas células y que el resto de los eventos sigan como consecuencia.

Se han caracterizado varios genes que se expresan en la gónada, algunos específicamente en las células germinales primordiales (CGP's). Durante la búsqueda del gene codificante para el FDT, se encontró un gene que parece ser expresado en las CGP's entre los 11 y los 12dpc llamado *Zfy* en ratón, puesto que tiene un motivo de unión a ADN del tipo de "dedos de zinc"; éste fue un candidato para FDT (18) anterior al *Sry*, descartado porque su expresión resultó estar asociada a la presencia de CGP's en la gónada y anteriormente se había demostrado que el desarrollo del testículo puede continuar perfectamente en ausencia de éstas (19). Por otro lado, Schöler et al. analizaron la presencia de proteínas pertenecientes a un grupo de proteínas con unión a una secuencia octamérica específica (octamer-binding proteins) en diferentes estadios embrionarios, encontrando expresión de *Oct4* en las células germinales primordiales. Dicha expresión desaparece en la proespermatoogonia, mientras que se mantiene en el óvulo, lo cual sugiere que la expresión de *Oct4* es específica de la línea germinal femenina durante las etapas tardías del desarrollo de las células germinales (20). Existe una mutante de ratón llamada *W*, que presenta anemia, albinismo y baja fertilidad; las células responsables de este fenotipo (células hematopoyéticas, melanocitos y germinales) tienen en común la propiedad de ser migratorias. Analizando el locus afectado en tal mutante, se encontró que *c-kit* mapea en el locus *W*. *c-kit* es un proto-oncogene que codifica para un receptor de la familia de las tirosin cinasas y su ligando es el producto de *Steel (Sl)*, conocido también como el factor de crecimiento de los mastocitos. Por hibridación *in situ* se estudió el patrón de expresión de *c-kit* y *Sl* durante la ontogenia del ratón. Durante la etapa migratoria de las células germinales primordiales (éstas se originan en la base del alantoides y migran a través del mesenterio dorsal y del intestino hacia la cresta genital entre los 9.5 y

los 11.5 dpc), se observa un gradiente inverso de la expresión de ambos genes a lo largo del mesenterio dorsal, desde la aorta dorsal hasta la cresta genital. La expresión de *Sl* es más alta en la cresta genital, mientras que la expresión de *c-kit* es más alta en la vecindad de la aorta dorsal con un gradiente decreciente hacia la región de la gónada (21). En el análisis más detallado de la expresión de *c-kit*, éste resultó ser expresado por las células germinales (22), mientras que en otro estudio, al cocultivar células de Sertoli con mastocitos, se demostró que las células de Sertoli expresan *Sl* (23). Todos estos datos son consistentes con la idea de que el complejo receptor-ligando *c-kit-Sl* está involucrado con la llegada de las CGP's a su destino, funcionando *Sl* como factor estimulador de la sobrevivencia. Sin embargo, dicho complejo pudiera tener funciones posteriores puesto que ambos *c-kit* y *Sl* se mantienen activos aún después de que la migración celular se completó.

Respecto a genes de expresión gonadal somática, además de *Steel* y *Sry*, se sabe de la presencia de AMH. También el patrón de expresión de este último se analizó por hibridación *in situ*. En los resultados de este estudio no se encuentra transcrito a los 11 dpc, pero se ve una señal clara a los 12, 13 y 14 dpc en el testículo. Dicha señal se encuentra específicamente en las células de Sertoli, la cual se mantiene alta hasta el nacimiento, decreciendo durante las siguientes tres semanas. En las hembras, la señal aparece hasta los 6 días después del nacimiento, y el transcrito se encuentra en las células de la granulosa. Además, se encontró que la señal depende del grado de maduración folicular y no de la edad del ovario, correlacionando con el crecimiento del oocito en folículos de tamaño mediano (24). El hecho de encontrar expresión de *AMH* después de la etapa de degeneración del conducto de Müller, sugiere que la hormona pudiera tener funciones adicionales. Dado que el patrón de expresión de *AMH* en el macho correlaciona con el momento de inhibición de la mitosis (12 dpc) y desaparece en el inicio de la espermatogénesis (2<sup>a</sup>-3<sup>a</sup> semana), la función de *AMH* pudiera ser la inhibición directa del inicio de la meiosis o la eliminación de las células germinales que erróneamente la iniciaran; esto último se apoya con la observación de que la expresión elevada de *AMH* en etapas tempranas del desarrollo es tóxica para las células germinales en meiosis (24). Al correlacionar el patrón de expresión de *AMH* con el de *Sry*, Münsterberg y Lovell-Badge sugieren que *Sry* sea un activador de la expresión embrionaria de *AMH*, para asegurar que las células germinales no inicien la meiosis; en cambio en las hembras la ausencia de *AMH* permite el inicio de la meiosis, que en ellas ocurre entre los 13 y 14 dpc. Dado que la expresión de *AMH* continúa después del nacimiento en machos, el mantenimiento de la expresión debe ser independiente de la regulación de *Sry*, al igual que su posterior activación en hembras.

## Factores de Crecimiento y Proto-oncogenes en el Desarrollo.

Hace unos 70 años Spemann demostró que el proceso de proliferación celular y la adquisición progresiva de un fenotipo especializado requiere de un alto grado de coordinación, mediado por comunicación intercelular, más que por un programa intracelular determinado. Esto lo demostró haciendo trasplantes de una zona del embrión de Xenopus a otra, donde observó que el tejido transplantado, al que llamó organizador, cambiaba el patrón de diferenciación de la zona adyacente al trasplante: las células hospederas organizaban un segundo eje corporal, formando músculo, notocorda y tejido neural en lugar de formar epidermis (2). Estudios posteriores demostraron que en dicha inducción de la formación de tubo neural por la acción de células del cordamesodermo sobre el ectodermo, no es necesario el contacto celular, pues se sigue observando la inducción aún al colocar un filtro entre los dos tejidos. Se hizo evidente que el camino de diferenciación que seguirá una célula o tejido se especifica con respecto a su posición dentro del embrión.

Haciendo experimentos de cultivo de tejidos, se encontró que el suero o extractos de tejido tienen un efecto mitogénico sobre el cultivo. Al fraccionar estos aditivos para el crecimiento y analizar las propiedades de cada fracción, se han caracterizado diversas moléculas reguladoras secretadas conocidas como "Factores de Crecimiento Polipeptídicos". Hasta el momento se siguen describiendo nuevos factores de crecimiento, cuya purificación y secuenciación ha permitido que al compararse con los factores anteriormente descritos se agrupen en familias según su secuencia nucleotídica o de aminoácidos, o bien según el receptor al que se unen. En la tabla 1 se pueden ver algunas de las diferentes familias de factores de crecimiento (25, 26).

El desarrollo embrionario a nivel molecular ha sido ampliamente estudiado en organismos más fáciles de manipular como C. elegans, Drosophila y Xenopus. Resulta útil basarse en la información generada con estos modelos para entender los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del mamífero. Estudios recientes del desarrollo temprano de estos organismos han enfatizado el papel de los factores de crecimiento o moléculas relacionadas, como señales morfogénicas o de diferenciación, ya que se ha encontrado homología entre genes importantes en el desarrollo de estos sistemas, y algunos factores de crecimiento o sus receptores. Por ejemplo, el Factor de Crecimiento Transformante b es homólogo a las proteínas del complejo decapentapléjico de Drosophila, y a un ARNm materno presente en el embrión de Xenopus. El gene del Factor de Crecimiento Epidérmico comparte dominios de homología con los loci lin-12 en C. elegans y Notch en

Drosophila (27). Por otra parte, se ha probado que el Factor de Crecimiento Fibroblástico básico puede inducir diferenciación de mesodermo a partir de tejido ectodérmico en vertebrados. También se ha demostrado que el Transformante b3 participa en la transformación epitelio-mesénquima de las células endoteliales embrionarias cardíacas (28), mientras que se ha visto que el Transformante b1 tiene un efecto quimiotáctico e inhibitorio de la proliferación de las células germinales primordiales en cultivo (29), lo cual sugiere su expresión en la gónada.

Una alteración muy relacionada con el desarrollo, en particular con la diferenciación y proliferación celular, es el desarrollo del cancer. Principalmente, al estudiar los genes involucrados en la formación de tumores inducidos por infección viral, se han identificado genes virales que promueven la proliferación desregulada, llamados "oncogenes". Estos oncogenes resultan ser la contraparte mutada de proteínas celulares encargadas de controlar la proliferación; a los genes que codifican para tales proteínas se les conoce como "proto-oncogenes" y se denominan antecediendo una "c-" (p.e. *c-fos* es el proto-oncogene de fos). Se piensa que la mayoría de los proto-oncogenes codifican para proteínas que están involucradas en la cascada de eventos por la cual los factores de crecimiento estimulan la división celular normal. Se han clasificado en cuatro grupos (30):

- 1) Factores de crecimiento, como *sis*, *int-2*, etc.
- 2) Receptores de factores de crecimiento, como *erb B*, *fms*, *kit*, *trk*, etc.
- 3) Transductores de la respuesta al factor de crecimiento, como *src*, *raf*, *ras*, etc.
- 4) Factores de transcripción, como *fos*, *jun*, *myc*, *myb*, *rel*, *ski*, etc.

Se ha demostrado que las células tumorales al transformarse pierden características fenotípicas, por lo que se dice que son desdiferenciadas. Se ha observado similitud entre las células tumorales y las embrionarias, lo que sugiere que los proto-oncogenes pudieran jugar algún papel en el desarrollo temprano del embrión. Recientemente ha habido muchos trabajos donde encuentran expresión de proto-oncogenes en diferentes partes y en diferentes etapas del embrión en desarrollo. Algunos oncogenes son factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento mutados, de manera que estimulan una proliferación desregulada (26, 30).

Entre los diferentes factores de crecimiento, los que pudieran ser más importantes son los que activan tirosin cinasas. Esta consideración se hace en base a datos en los que se demuestra que algunas mutaciones en C. elegans o Drosophila que afectan el desarrollo, caen en secuencias homólogas a receptores con dominio de actividad de tirosin cinasa. Además, en los últimos años se ha acumulado evidencia que señala que en diferentes etapas del desarrollo en los vertebrados se encuentran diversos factores de crecimiento o moléculas relacionadas, cuyos receptores tienen actividad de tirosin cinasa (30).

Un evento esencial en el desarrollo de un órgano es la vascularización de la zona que se está organizando. Para que haya vascularización es necesaria la proliferación e invasión de células endoteliales, las cuales se organizan para formar los vasos sanguíneos; a este proceso se le llama angiogénesis. Se ha demostrado que muchos factores de crecimiento presentan actividad angiogénica, algunos de los cuales transducen la señal de crecimiento a través de tirosin cinasas.

En general, existe el concepto de que cada evento morfogenético es dirigido por una cascada de expresión genética. La diferenciación sexual también ha sido ampliamente estudiada en C. elegans y Drosophila. En ambos organismos se tiene ya descrita casi en su totalidad la cascada de expresión genética que lleva al desarrollo de un determinado sexo (figuras 3 y 4). Por analogía, se considera que en mamíferos debe existir también una cascada que dirija la diferenciación sexual, siendo *Sry* el iniciador con la posterior participación de *AMH*; sin embargo, faltan datos que sugieran cuales son los demás genes que participan posteriormente en la cascada.

## OBJETIVOS

En el presente trabajo nos propusimos identificar la expresión de ciertos genes que pudieran formar parte de la cascada genética que guía la diferenciación sexual en mamíferos. Se buscó la expresión de genes potencialmente relacionados con los eventos que ocurren durante la diferenciación de la gónada, como son la proliferación, la diferenciación, la migración celular, y una vascularización sexo específica (ocurre en los machos días antes que en las hembras) que tal vez tenga relevancia en el proceso de la diferenciación sexual gonadal (6). También se procuró que en el mecanismo por el cual actuaran los genes seleccionados estuviera involucrada una tirosin cinasa, dada su relevancia en el desarrollo, por lo anteriormente expuesto.

Se plantearon dos objetivos particulares:

1.- Buscar genes nuevos que se expresen específicamente en la gónada en el momento de la diferenciación sexual, por medio de la construcción de una biblioteca de ADNc enriquecida a través de una sustracción con ADNc de hígado.

2.- Analizar el patrón de expresión de los siguientes genes:

- a) Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF).
- b) Factor de Crecimiento Transformante  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ).
- b) Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ ).
- c) Angiogenina (Agg).
- d) Proto-oncogene c-src.
- e) Proto-oncogene c-fos.



## MATERIAL Y METODOS

### Aislamiento de Gónadas Embrionarias.

#### Material.

- 1.- Hembras gestantes.
- 2.- H<sub>2</sub>O bidestilada esterilizada.
- 4.- Caja de Petri.
- 5.- Monocavado.
- 6.- Piseta con alcohol.
- 7.- Silicón negro para disección.
- 8.- Gasas.
- 9.- Tubos eppendorf 1.5 µl con 500µl solución urea 6M:cloruro de litio (LiCl) 3M en hielo.
- 10.-Microscopio estereoscópico.
- 11.-Material de Microcirugía:
  - Tijeras grandes.
  - Pinzas grandes.
  - Tijeras iris.
  - Pinzas curvas.
  - Pinzas finas.
  - Bisturí.
  - Tijeritas finas.

#### Soluciones.

##### 1.- PBS.

Para 100 ml: 0.8g NaCl  
 0.02g KCl  
 1 ml buffer fosfatos 1M ; o bien 0.15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0.02g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 aforar con H<sub>2</sub>O.

##### 2.- Urea 6M/ LiCl 3M.

Para 50ml: 6.359g LiCl (PM 42.39)  
 18.018g Urea ( PM 60.06  
 aforar con H<sub>2</sub>O.

#### Procedimiento.

- 1.- Sacrificar a la madre humanamente por dislocación cervical.  
 El procedimiento es el siguiente: poner rápidamente la ratona sobre la tapa de la caja para que se agarre con las patas delanteras; aplicar presión firme en

- la base de la nuca, ya sea con los dedos o utilizando un lápiz y jalar la cola con firmeza. Al apretar el cuello se siente que se separaron las vértebras.
- 2.- Colocar la ratona boca arriba sobre un papel absorbente y mojar el abdomen con alcohol, para evitar que caigan pelos sobre los embriones.
  - 3.- Levantar la piel del abdomen y extraer el útero.
  - 4.- Sacar los embriones del útero y separarlos de la placenta (sin desprender el amnios, en caso de requerir sexo por cariotipo).
  - 5.- Poner los embriones en la caja de Petri con PBS mientras se realiza la microcirugía.
  - 6.- Para extraer las gónadas: colocar el embrión sobre el silicón negro y hacer un corte con bisturí separando la región posterior del embrión, para exponer la región urogenital. Con las tijeritas separar la gónada del mesonefros adyacente y sumergirla en la solución urea/LiCl contenida en un tubo eppendorf.
  - 7.- Homogenizar las gónadas extraídas agitando bruscamente con vortex.
  - 8.- Precipitar a -70°C mínimo 3 horas.

### **Sexado de Embriones.**

#### **A. POR MORFOLOGIA.**

A partir de los 12.5 dpc se distinguen las gónadas masculinas por ser más grandes, redondeadas, y vascularizadas que las gónadas femeninas. Estas últimas tienen una forma más alargada, semejan una salchicha. En el testículo se pueden ya distinguir los cordones sexuales, mismos que le dan una apariencia semejante a una mitocondria.

#### **B. IDENTIFICANDO CORPUSCULO DE BARR.**

**Material:**

- 2 pinzas para microdissección.
- Tubos eppendorf de 1.5ml numerados para identificar la gónada correspondiente.
- Pipeta Pasteur sellada al fuego.
- Reloj.
- Laminillas y cubreobjetos.

**Soluciones.**

- 1.- Fijador metanol: ácido acético 1:1.
- 2.- Acido acético 60%.
- 3.- Azul de toluidina 1%.



- 8.- Etanol absoluto frío.
- 9.- H<sub>2</sub>O bidestilada autoclaveada.

#### Procedimiento.

- 1.- Homogenizar y precipitar el tejido en sol. urea/ LiCl a -70° mínimo 3 horas.
- 2.- Centrifugar 10 min. a 4°C 12000 rpm. en la microfuga.
- 3.- Quitar el sobrenadante lo más posible, porque ahí está el ADN. Resuspender la pastilla en 1ml de sol.D para 100mg de tejido (100µl para 15 gónadas embrionarias).
- 4.- Añadir 1/ 10 de vol. acetato de sodio 2M pH4 y mezclar.
- 5.- Agregar 1 volúmen fenol saturado con H<sub>2</sub>O y agitar vigorosamente.
- 6.- Añadir 2/ 10 de vol. cloroformo:isoamílico y agitar vigorosamente. Enfriar en hielo 15 min (para que se formen las dos fases).
- 7.- Centrifugar 20 min. a 4°C a 12000 rpm.
- 8.- Pasar la fase acuosa a otro tubo y precipitar con 1 vol. isopropanol durante 1 hora a -20°C.
- 9.- Centrifugar 20 min. a 4°C 12000 rpm.
- 10.- Resuspender la pastilla en 3/ 10 vol. de sol. D.
- 11.- Precipitar 1 hora a -20°C con 3/ 10 de vol. isopropanol.
- 12.- Centrifugar 10 min a 4°C a 12000 rpm.
- 13.- Lavar la pastilla con etanol al 70%
- 14.- Secar y resuspender en H<sub>2</sub>O bidestilada autoclaveada.

#### Diseño de oligonucleótidos para PCR

Para detectar *bFGF* y *TGFα* se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Rappolee *et. al.* (31). Para los demás casos se diseñaron los oligonucleótidos en base a la secuencia publicada de ADNc para *TGFβ* (32), *c-Src* (33) y genómica para *Agg* (34), *c-Fos* (35), procurando que tuvieran en general las siguientes características:

- a) Tamaño aproximado de 20 bases.
- b) Contenido de G,C 50-60%.
- c) Codones menos degenerados en caso de no ser la secuencia de ratón.
- d) Presencia de C,G en el extremo 3'.
- e) Sitio de restricción en la secuencia amplificada.

La secuencia 5'-3' de los oligonucleótidos utilizados es la siguiente:

**TGFβ5'** CATTCGGGAAGCAGTGCCC (769)  
**TGFβ3'** CCCGTTGATTCCACGTGG (1066)  
**bFGF5'** TCAAGCAGAAGAGAGAGGGGTTGTGTC (721)  
**bFGF3'** ATTAAGATCAGCTCTTAGCAGACAT (1004)  
**TGFα5'** GTCAGGCTCTGGAGAACAGC (58)

**TG $\alpha$ 3'** GATGGCCTGCTTCTTCTGGCT (297)  
**Agg5'** TGACTCAGCACCATGACGCC (311)  
**Agg3'** ATCGAAGTGGACCGCAAGC (607)  
**c-Src5'** AGGGGAATTTGGCACCTTGC (991)  
**c-Src3'** GTGCAGCTGTATGCTGTGGT (1300)  
**c-Fos5'** TGGGCCTAGATGATGCCGCA (1908)  
**c-Fos3'** AATCGGAGGAGGGAGCTGAC (2400)

Los números en paréntesis indican la posición de los oligonucleótidos dentro de la secuencia publicada.

### **Purificación de oligonucleótidos.**

#### **Material.**

- 1.- Gel acrilamida 20 %/ urea 8M.
- 2.- H<sub>2</sub>O.
- 3.- Colorante: azul de bromofenol 1mg/ml  
formamida 80%.  
EDTA 10mM pH 8.
- 5.- Tubos eppendorf.
- 6.- Lámpara uv.
- 7.- Pantalla.
- 8.- 1-Butanol y/ o Etanol absoluto frío (depende del lavado).

#### **Procedimiento:**

- 1.- Preparar la muestra: 10  $\mu$ g oligonucleótido + 1/3 vol. colorante y cargar el gel máximo 40 $\mu$ l/carril y 10 $\mu$ g oligonucleótido.
- 2.- Correr el gel a 450 volts.
- 3.- Cortar las bandas con sombreado de ultravioleta.
- 4.- Eluir las bandas en tubo eppendorf 1.5ml con 1ml H<sub>2</sub>O a 37°C toda la noche.
- 5.- Pasar el agua a un tubo nuevo.
- 6.- Lavar los oligonucleótidos. (ver abajo).
- 7.- Resuspender en H<sub>2</sub>O y cuantificar midiendo la densidad óptica en el espectrofotómetro (1OD = 25  $\mu$ g/ml).

Para limpiar los oligonucleótidos hay dos opciones:

#### **A. LAVADOS CON ETANOL.**

- 1.- Secar en el Savant (4 horas aprox.). Se precipita la urea, formando una pastilla de aprox. 0.3ml.
- 2.- Agregar 1ml de etanol absoluto frío y agitar vigorosamente.
- 3.- Centrifugar 10 min 12000 rpm microfuga.

4.- Repetir los pasos 2 y 3 hasta que desaparezca la urea.

#### B. LAVADOS CON 1-BUTANOL.

- 1.- Aforar a 1.5ml con butanol, agitar vigorosamente.
- 2.- Centrifugar 20 seg. microfuga.
- 3.- Sacar el butanol que queda arriba.
- 4.- Agregar 1 vol. butanol, agitar vigorosamente, repetir 2 y 3.
- 5.- Repetir 4 hasta que queden 10-20ml.
- 6.- Aforar hasta 1.5ml con butanol, para asegurar que precipiten los oligonucleótidos.
- 7.- Centrifugar 2 min. 12000 rpm en la microfuga.
- 8.- Lavar la pastilla con etanol absoluto.

### Síntesis de ADNc.

#### A. METODO CONVENCIONAL

##### a) Síntesis de la Primera Cadena (ssADNc).

- 1.- Calentar ARN poliA<sup>+</sup> junto con 20 $\mu$ l Oligo-dT 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l 5 min a 65°C. Mientras,
- 2.- Mezclar para 200 $\mu$ l de reacción:
 

dNTP 0.5mM	20 $\mu$ l (stock 5mM)
DTT 10mM	20 $\mu$ l (stock 100mM)
Buffer BRL	40 $\mu$ l (stock 5X)
H <sub>2</sub> O	aforar final 200 $\mu$ l
- 3.- Agregar la mezcla al ARN.
- 4.- Añadir 1 $\mu$ l enzima Transcriptasa Reversa BRL.
- 5.- Opcional. Tomar alicuota 10 $\mu$ l + 1 $\mu$ l dCTP<sup>32</sup> act. esp. 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l.
- 6.- Incubar 1 hora a 37°C.
- 7.- Contar incorporación de marca radioactiva, si se hizo el paso 5.

##### b) Degradación de ARN y Síntesis de la Segunda Cadena (dsADNc).

- 1.- Agregar a la reacción anterior:
 

H <sub>2</sub> O	aforar a 1ml final
Buffer SS	200 $\mu$ l (stock 5X)
RNAse H 16u.	7 $\mu$ l
DNApoli 400u.	40 $\mu$ l
- 2.- Opcional. Tomar 10 $\mu$ l alicuota + 1 $\mu$ l dCTP<sup>32</sup> act. esp. 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l.
- 3.- Incubar toda la noche a 12°C.
- 4.- Contar incorporación.

## B. CREANDO ADAPTADORES EN LOS EXTREMOS.

### a) Síntesis Primera Cadena (ssADNc).

- 1.- Calentar ARN + 0.4µg oligo T-HNN 5 min. a 65°C.
- 2.- Mezclar para 20µl de reacción:
 

dNTP 200mM	2µl (stock 5mM)
Buffer BRL	4µl (stock 5X)
DTT 10mM	2µl (stock 100mM)
H <sub>2</sub> O	aforar 20µl
- 3.- Agregar mezcla al ARN.
- 4.- Tomar alícuota 5µl reacción + 0.5µl dCTP<sup>32</sup> act. esp. 10µCi/ µl.
- 5.- Incubar 1 hora a 37°C.
- 6.- Contar la incorporación de marca radioactiva, y guardar para correr el gel.

### b) Degradación Alcalina del ARN.

- 1.- Para 15µl de reacción agregar:
 

EDTA 20mM	0.6µl (stock 0.5M)
NaOH 120mM	1.75µl (stock 1M)
- 2.- Incubar 1 hora a 65°C.
- 3.- Añadir:
 

Tris 360mM pH 7.5	5.25µl (stock 1M)
HCl 120mM	1.75µl (stock 1M)
- 4.- Verificar que el pH sea 7.5.
- 5.- Aforar con agua a 50µl.
- 6.- Extraer con 1 vol. fenol + 1 vol. coloroformo: isoamílico.
- 7.- Extraer con 1 vol. cloformo:isoamílico.
- 8.- Precipitar con 20.8µl acetato de amonio 7.5M + 160µl etanol absoluto, mínimo 2 horas a -20°C.
- 9.- Centrifugar 10 min. 12000 rpm. microfuga a 4°C.
- 10.- Lavar la pastilla con etanol 70%.
- 11.- Resuspender en 50µl agua y volver a precipitar (paso 8) para asegurar que el oligonucleótido se elimine y no interfiera con la siguiente reacción.
- 12.- Resuspender en 9µl H<sub>2</sub>O.

### c) Transferasa Terminal (TdT).

- 1.- A los 9µl de ADNc cadena sencilla añadir:
 

Buffer BRL	4µl (stock 5X)
dCTP 50µM	1µl (stock 1mM)
dCTP <sup>32</sup> 50µCi	5µl (stock 10mCi/ml)
Enzima TdT BRL	1µl (stock 500u/34ml)
- 2.- Incubar 5 min. a 37°C.

- 3.- Tomar alicuota 1ml para contar incorporación.
- 4.- Aforar a 50 $\mu$ l y precipitar con 20.8 $\mu$ l acetato de amonio 7.5M + 160 $\mu$ l EtOH absoluto 2 horas a -20°C.
- 5.- Resuspender en 5 $\mu$ l H<sub>2</sub>O.

#### d) Síntesis de la Segunda Cadena.

- 1.- A los 5 $\mu$ l de ssADNc/ TdT añadir:

Buffer Vent	2 $\mu$ l (stock 10X)
dNTP 200 $\mu$ M	8 $\mu$ l (stock 0.5mM)
oligo XNN-G 4 $\mu$ g	1.5 $\mu$ l (stock 2.6mg/ml)
dCTP <sup>32</sup> 50 $\mu$ Ci	5 $\mu$ l (stock 10mCi/ml)
Vent DNApol 1u.	1 $\mu$ l (stock 1u/ml)

- 2.- Calentar 2 min. a 50°C.
- 3.- Incubar 30 min. a 72°C.
- 4.- Contar incorporación.

### **Precipitación con Isopropanol para medir el porcentaje de Incorporación Radioactiva.**

#### Mezcla para precipitar:

TE	2ml
ADN acarreador 10mg/ml	200 $\mu$ l
EDTA 0.5M	100 $\mu$ l
acetato amonio 7.5M	1.2ml

- 1.- Para 1 $\mu$ l de reacción agregar 50 $\mu$ l de mezcla + 100 $\mu$ l isopropanol.
  - 2.- Agitar vigorosamente y centrifugar 15 min. 12000 rpm. microfuga.
  - 3.- Decantar dejando el menor volumen posible.
- \*Si la radioactividad esperada es muy poca repetir la precipitación.

### **Sustracción de ADNc específico de gónada.**

#### A) HIBRIDACION.

#### Buffer de hibridación:

Buffer fosfatos 0.5M	25ml (stock 1M)
EDTA 5mM	0.5ml (stock 0.5M)
SDS 0.1%	0.5ml (stock 10%)
H <sub>2</sub> O	24ml

- 1.- Resuspender 10  $\mu$ g de ADNc doble cadena de hígado en 10 $\mu$ l de buffer de hibridación.
- 2.- Resuspender en 5 $\mu$ l del ADNc hígado:



- a) ssADNC/ TdT de gónada.
- b) ssADNc/ TdT de hígado como control.
- 3.- Hervir 1 min. para desnaturalizar.
- 4.- Poner los 5 $\mu$ l de las hibridaciones a) y b) en dos capilares de 10 $\mu$ l. Sellar con calor los extremos para evitar vaporización.
- 5.- Incubar 20 horas a 68°C.

#### B) CAMBIO DE BUFFER: LAVADO CON CENTRICON.

- 1.- Esterilizar el centrifón:
  - centrifugar 10 min. a 3,500 rpm rotor JA20 Beckman con:
    - 1) 1 ml NaOH 0.1N.
    - 2) 2ml H<sub>2</sub>O desionizada.
  - lavar agitando con :
    - 1) 2ml EtOH 70%.
    - 2) 2ml H<sub>2</sub>O desionizada.
- 2.- Aforar cada hibridación a 950  $\mu$ l.
- 3.- Pasar la hibridación, centrifugar 15 min a 3,500 rpm rotor JA20 o hasta obtener aproximadamente 40 $\mu$ l.
- 4.- Medir el volumen y tomar una alícuota para el gel.

#### C) DIGESTION PARA ELIMINAR DOBLE CADENA.

- 1.- Llevar cada hibridación a 44 $\mu$ l y agregar:
 

Buffer Vent	5 $\mu$ l (stock 10X)
Sau3AI	1 $\mu$ l (stock 3u/ml)
- 2.- Incubar 4 horas a 37°C.
- 3.- Calentar 10 min. a 65°C para inactivar la enzima.
- 4.- Tomar alícuota 5 $\mu$ l para gel.

#### D) SINTESIS SEGUNDA CADENA.

- 1.- A 45 $\mu$ l de cada digestión agregar:
 

dNTP 200 $\mu$ M	2 $\mu$ l (stock 5mM)
oligo XNN-G .4 $\mu$ g	1.5 $\mu$ l (stock 2.6mg/ml)
Vent DNApol 2u	2 $\mu$ l (stock 1u/ml)
- 2.- Incubar 2 min a 50°C.
- 2.- Incubar 30 min. a 72°C.

#### E) AMPLIFICACION ESPECIFICA DE ADNc DE GONADA.

- 1.- A las reacciones anteriores agregar:

oligo HNN 1.5µg	1.5µl (stock 0.5µg/µl)
oligo XNN 1.5µg	1.5µl (stock 1.5µg/µl)
dCTP <sup>32</sup> 10µCi	1µl (stock 10µCi/µl)
Aceite mineral	50µl

2.- 25 ciclos: 1min. 95°C; 2 min. 57°C; 10 min. 72°C.

### PCR para Detectar ARNm.

1.- Mezcla de reacción:

ADNc	µl
Buffer taq DNApol	5µl (stock 10X)
dNTP 200mM	2µl (stock 5mM)
oligonucleótidos HPRT	12 pmol.
oligonucleótidos específicos	12 pmol.
Taq DNA pol.	0.5µl (stock 5u/µl)

2.- 30 ciclos: 1'15" a 95°C; 1' a 57°C; 1' a 72°C.

1 ciclo: 10' a 72°C.

3.- Gel agarosa 3% para fragmentos de 500-50 pares de bases.

### Geles para Electroforesis.

A) AGAROSA 3%/TBE/EtBr.

1.- Buffer Tris Boratos 10X: 108 g Tris base.

55 g Acido Bórico.

40 ml EDTA 0.5M pH 8.

2.- Buffer de corrida: diluir TBE para que quede 0.5X y añadir bromuro de etidio (EtBr) 60µl/litro.

3.- Para 50 ml disolver 1.5g de agarosa en TBE 0.5X/ EtBr.

3.- Correr el gel a 300 volts.

B) AGAROSA 1.5%/ UREA-ACIDO.

Soluciones para 100 ml:

1) Urea 10M: 60g

2) Citrato 0.25M pH 3.5 10X: 4.8g ácido cítrico  
0.6g NaOH

1.- Para 12.5ml de agarosa: disolver agarosa de alto punto de fusión en 7.5 ml urea 10M + 5 ml agua. Evitar que hierva.

2.- Agregar 1.25 ml de citratos 10X.

3.- Correr gel en buffer citratos 1X a 100 volts.

**C) ACRILAMIDA 20%/ UREA 8M.**

1.- Para 100 ml acrilamida 20%:

Acrilamida 40%	50 ml
Urea 8M	48.05g
TBE 10X	10 ml
H <sub>2</sub> O	2 ml aprox.

2.- Para que polimerice 15 ml:

Temed	10 $\mu$ l
Persulfato 10%	25 $\mu$ l

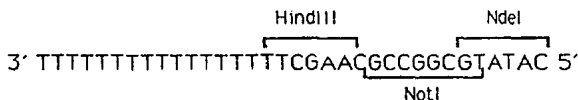
3.- Correr el gel a 450 volts.

## RESULTADOS

### 1.- Construcción del banco de expresión específico de gónada.

Para seleccionar los ARNm específicos de la gónada en el momento de la diferenciación sexual (12.5 *dpc*), es necesario descartar los genes constitutivos que se expresan en todas las células, independientemente del tipo celular. Para ésto, se planeó hacer una hibridación entre ADNc de gónada embrionaria con ADNc de hígado, esperando que los genes constitutivos, expresados tanto en células gonadales como hepáticas, aparearan formando doble cadena, misma que puede ser eliminada utilizando una enzima de restricción cuyo sustrato sea exclusivamente ADN de doble cadena. Las moléculas que quedan como cadena sencilla son las correspondientes a los genes expresados específicamente en gónada e hígado, al momento de purificar el ARNm. Para distinguir entre estos y clonar exclusivamente los específicos de gónada, se diseñaron oligonucleótidos especiales para sintetizar el ADNc de la gónada; de esta manera, es posible amplificar sólo las moléculas sencillas con secuencias gonadales, utilizando oligonucleótidos complementarios a la secuencia que se agregó para hacer el ADNc. La estrategia se esquematiza en la figura 5.

Para sintetizar la primera cadena del ADNc gonadal, se utilizó un oligonucleótido llamado T-HNN, que tiene una cola de 16 timinas en el extremo 3' pegada a un adaptador que posee sitios de reconocimiento para tres enzimas de restricción. La secuencia del oligo T-HNN es:



Antes de hacer la hibridación, se le agrega una cola de poli-dC a la primera cadena del ADNc, para generar una secuencia homóloga a un segundo oligonucleótido, que también tiene un adaptador seguido por una secuencia de 9 guaninas, utilizado para sintetizar la segunda cadena. La secuencia de este segundo oligo llamado XNN-G es la siguiente:

Not1

5' CTCGAGGCGGCCG CATGGGGGGGGG 3'

XhoI

NcoI

Después de la hibridación y de la digestión con Sau3A para degradar las cadenas mixtas de ADNc de hígado y de gónada, la mezcla de secuencias de ADNc de cadena sencilla, y por lo tanto específicas de hígado y gónada, se usa como sustrato para la síntesis de la segunda cadena, la cual sólo se puede sintetizar a partir del ADNc proveniente de gónada, por ser el único que tiene secuencia donde hibride el oligo XNN-G. Posteriormente, se amplifica específicamente el ADNc utilizando un par de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores agregados, llamados HNN y XNN, utilizando reacciones de polimerización en cadena (PCR).

En la primera etapa del proyecto, se estandarizaron las reacciones para sintetizar el ADNc agregando los adaptadores. Debido a la dificultad para obtener suficiente cantidad de ARN de gónadas embrionarias, se inició la estandarización con ARN proveniente de cerebro de conejo. Se probaron diferentes concentraciones de NaOH para la degradación alcalina, diferentes tiempos de la reacción transferasa terminal, y diferentes polimerasas para sintetizar la segunda cadena (Klenow, DNAPoll, Taq y Vent). Una vez lograda la síntesis de ADNc, se estandarizaron las condiciones para la PCR, variando las concentraciones de templado y oligonucleótidos, tiempo de elongación y enzima polimerasa (Taq y Vent). Una vez resuelto el problema técnico, se procedió a realizar la sustracción con muestra embionaria.

Como se muestra en la figura 6, la sustracción no resultó exitosa, pues se obtuvo amplificación contaminante con secuencias originarias de hígado.

Simultáneamente se hizo como control una sustracción análoga, pero hibridando ADNc de hígado sintetizado con adaptadores contra ADNc de hígado. De tal sustracción se esperaba que casi nada resultara amplificado, pero como se nota en el carril 6 hubo abundante amplificación. Además, en el carril 7 se observa amplificación de una banda específica de hígado de aproximadamente 1kb, cuando se esperaba que sólo lo amplificado proviniera de ARNm gonadal, por lo que parece que el problema estuvo en la especificidad de la amplificación.

## 2.- Análisis del patrón de expresión de los genes *bFGF*, *TGF $\alpha$* , *TGF $\beta$ 1*, *Agg*, *c-Src* y *c-Fos*.

El patrón de expresión se analizó por amplificación específica del ADNc de gónadas embrionarias sexadas de 10.5, 11.5, 12.5 y 13.5 días *post coitum*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada caso basados en la

secuencia publicada, ya sea de ADNc o genómica (como se especifica en material y métodos), para realizar la amplificación por medio de PCR asociada a reacción de transcriptasa reversa. La estandarización correspondiente a cada ARNm se llevó a cabo con ARN proveniente de tejidos con expresión positiva, variando las concentraciones de los oligonucleótidos y de magnesio, y la temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos con el templado. Para los genes *bFGF*, *TGF $\alpha$* , *c-Src* y *c-Fos*, se utilizó ARN extraído de cerebro de ratón; para *Agg* y *TGF $\beta$* , se utilizó ADNc de gónada de 12.5 dpc. Para cada caso se comprobó que la banda obtenida correspondiera al gene específico, según el patrón de migración y de digestión esperados, que se muestran en la figura 7. En la figura 8 se muestran los patrones de digestión de las bandas obtenidas para cada gene.

Para sintetizar el ADNc correspondiente a cada muestra, se extrajo ARN total de un grupo de 10 a 15 gónadas para cada edad y sexo. En el caso de las muestras de 10.5 dpc, las gónadas vinieron contaminadas con la región dorsal que incluye al complejo urogenital, mientras que para el caso de las muestras de 11.5 dpc, no se pudo eliminar completamente el mesonefros. Los grupos de gónadas se hicieron a partir de embriones de la misma madre. Para comprobar que no hubiera ADN genómico contaminante en las muestras se hizo una PCR utilizando el ARN como templado; además, la amplificación de *c-Fos* sirve como control, puesto que los oligonucleótidos se encuentran en diferentes exones, de manera que de haber ADN se amplificaría una banda de mayor tamaño que la obtenida a partir de ADNc (fig. 9A). Se utilizó como indicador de cantidad de muestra la expresión de *HPRT*, un gene que codifica para una enzima constitutiva que participa en la síntesis de nucleótidos, llamada hipoxantina-fosfo-ribosil-transferasa.

Para homogenizar la cantidad de muestra en todos los estadios a analizar, se hizo una PCR utilizando oligonucleótidos específicos para los genes *HPRT*, *Sry* y *AMH* (fig. 9B).

Una vez estandarizadas todas las condiciones de reacción, se utilizó la misma muestra para analizar el patrón de expresión de cada gene, encontrándose los siguientes resultados (fig.10):

- 1) *TGF $\beta$*  fué el único gene que presentó un patrón de expresión sexo específico: a los 10.5-11.5 dpc sólo se encontró en las gónadas femeninas, con un descenso en la expresión de manera que a los 13.5 dpc ya no se detectó mensajero; en las gónadas masculinas se detectó expresión por primera vez a partir de los 12.5 dpc..
- 2) El gene de angiogenina se expresa en todos los estadios estudiados, en ambos sexos, aunque se observó una notable disminución en la intensidad de la señal a partir de los 12.5 dpc .
- 3) En el caso del *bFGF*, la expresión apareció en ambos sexos, con un ligero aumento en la cantidad de expresión conforme avanza el desarrollo y una notable caída de ésta en las hembras a los 13.5 dpc.

- 4) El patrón de expresión de *TGF $\alpha$*  y *c-Src* fue similar: se encontró transcrito exclusivamente a los 12.5 *dpc* en ambos sexos. En el caso del *TGF $\alpha$* , además de la banda del tamaño esperado, apareció una banda mayor también sólo a los 12.5 *dpc* y más abundante. No sabemos a que corresponde esta banda mayor, pero se analizará su patrón de restricción para ver si la secuencia interna guarda homología con el *TGF $\alpha$* .
- 5) En ninguna etapa se detectó transcrito correspondiente a *c-Fos*.

## DISCUSION.

La construcción del banco de expresión específico de la gónada embrionaria en el momento de la diferenciación sexual no fué exitoso, debido a que no se logró obtener una amplificación selectiva de los mensajeros gonadales. Se va tratar de solucionar el problema biotinilando el ADNc de hígado para separar, por medio de una columna de afinidad con estreptoavidina, tanto las moléculas que hibridaron con secuencias gonadales, como las que quedaron como cadena sencilla por ser específicas de hígado. De esta manera, se elimina el ruido de fondo que puede ser el responsable de la inespecificidad en la amplificación. Esta idea se ve apoyada por observaciones hechas al momento de estandarizar las condiciones de reacción, cuando se observó que si el ARN venía contaminado con ADN, la amplificación obtenida con la Vent polimerasa era inespecífica.

Al analizar el patrón de expresión de los genes seleccionados considerando su potencial importancia en el desarrollo, se reveló la presencia en la gónada embrionaria de cuatro factores de crecimiento y un proto-oncogene. La posible actividad biológica de estos genes en la gonadogénesis se discute a continuación, basados en las actividades descritas en otros sistemas.

*TGF $\beta$*  se expresa durante el desarrollo embrionario y sus receptores están ubicuamente distribuidos. Se ha descrito su capacidad para controlar la replicación de ADN, diferenciación celular, adhesión celular, matriz extracelular, angiogénesis, inhibición y estimulación de la proliferación, etc., lo que sugiere que tenga un papel importante en el desarrollo (36). Varios grupos de investigación han encontrado que tiene un fuerte efecto inhibitorio en la proliferación de células endoteliales (36), por lo cual cabe la posibilidad de que la expresión de *TGF $\beta$*  en la gónada femenina antes de que inicie la diferenciación morfológica en machos (10.5-11.5 *dpc*), tenga un papel inhibitorio de la vascularización en hembras. Si este fuera el caso, uno de los papeles del *Sry* sería inhibir la expresión de *TGF $\beta$*  en la gónada XY. A partir de los 12.5 *dpc* baja la expresión de *Sry*, lo que permitiría la expresión de *TGF $\beta$*  observada a los 13.5 *dpc* en el testículo, con la posible función de inhibir la proliferación de las células germinales primordiales (CGP's), actividad que ha sido mostrada *in vitro*. (29). Sería interesante analizar la expresión de *TGF $\beta$*  en ratones XY con *Sry* mutado, y en ratonas transgénicas XX con *Sry* introducido. En el primer caso se espera expresión de *TGF $\beta$*  en la gónada embrionaria, mientras que en el segundo no. Si *TGF $\beta$*  interfiere con la proliferación de las CGP's en el testículo, sería necesario ver 1) si hay un efecto sexo-específico de manera que sólo las germinales XY respondan, o



2)adquirido a partir de los 13 dpc , para explicar por qué la proliferación de las CGP's a los 10.5-11.5 dpc no se inhibe en hembras en presencia de  $TGF\beta$ .

Además de tener una actividad mitogénica y angiogénica, se ha observado que *bFGF* promueve la diferenciación de adipocitos y la extensión de neuritas en células PC12 (una línea celular de rata) *in vitro*. Su presencia en el ovocito de *Xenopus* sugiere que pudiera participar en la inducción del mesodermo comentada en la introducción (37). El haber encontrado ARNm de *bFGF* en ambos sexos, no significa que no pueda tener un papel en la gonadogénesis. Se ha demostrado que la actividad de *bFGF* depende de su localización, siendo mucho más activa la forma secretada (38). Es posible que se encuentre en la matriz extracelular en la gónada de un sexo y que en la gónada del otro sexo se encuentre intracelular, lo que podría estar regulando la actividad sexo específica de *bFGF*. Se podría comprobar si esto es cierto utilizando anticuerpos para detectar la localización de la proteína, o detectando la presencia de proteína extracelular con un radio-inmunoensayo.

El hecho de que la expresión de *TGF $\alpha$*  y *c-Src* sea exclusivamente a los 12.5 dpc , sugiere que ambos participen en algún aspecto del desarrollo de la gónada común a ambos sexos. La mayoría de los estudios realizados sobre *TGF $\alpha$*  son en relación a su papel en tumorigénesis y sólo recientemente se ha identificado su presencia en condiciones no patológicas en keratinocitos, macrófagos activados y durante el desarrollo embrionario, aunque no se ha demostrado alguna función biológica específica (39). Respecto a *c-Src*, que es una proteína citoplásmica con actividad de tirosin cinasa, tampoco se ha demostrado un papel específico durante el desarrollo. Sin embargo, ha cobrado interés a partir del descubrimiento de genes relacionados en *Drosophila*, los cuales se expresan durante el inicio de la diferenciación en algunos tejidos embrionarios, lo cual sugiere que tengan un papel en el desarrollo (40). La similitud entre los patrones de expresión de *TGF $\alpha$*  y *c-Src* durante la gonadogénesis, sugiere que su actividad esté relacionada, tal vez actuando *c-Src* como transductor de la señal de *TGF $\alpha$* .

Finalmente, la expresión de *Agg*, que es una proteína perteneciente a la familia de ARNasas, en la gónada parece no tener importancia en la diferenciación sexual, pues se encontró presente en todas las etapas y en ambos sexos. Aunque se nota un disminución a los 12.5 y 13.5 dpc , ésta podría deberse a la disminución de tejido contaminante en tales muestras.

Si los resultados de los bioensayos para probar la funcionalidad biológica de estos factores resultaran positivos, éste sería un trabajo importante, pues sería el primer paso para describir la cascada de eventos que llevan a la diferenciación sexual en mamíferos.

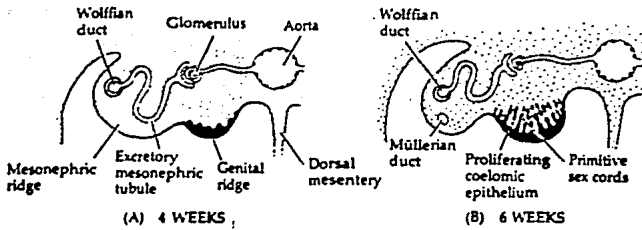
## REFERENCIAS

- 1.- Balinsky, B. I. (1981). An Introduction to Embriology (Fifth edition). Saunders College Publishing.
- 2.- Gilbert, Scott F. (1991). Developmental Biology (Third edition). Sinauer.
- 3.- Crews, D., Bull, J.J. and Billy, A.J. (1988). Sex Determination and Sexual Differentiation in Reptiles. Handbook of Sexology, Vol.6: The Pharmacology and Endocrinology of sexual function. Chapter 5. J.M.A. Sitsen Editor.
- 4.- Lengrand, J.J., Lengrand-Hamelin, E. and Juchault (1987). Sex Determination in Crustacea. Biol. Rev. 62:439-470.
- 5.- Mittwoch, U. (1971). Sex Determination in Birds and Mammals. Nature 231: 432-434.
- 6.- Merchant-Larios, H. and Takeeto, T. (1991). Testicular Differentiation in Mammals Under Normal and Experimental Conditions. J. Elec. Microsc. Tech. 19:158-171.
- 7.- Page, D.C. (1985). Sex Reversal: Deletion Mapping of the Male-Determining Function of the Human Y Chromosome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:229-235.
- 8.- Page, D.C., de la Chappelle, A. and Weissenbach, J. (1985). Chromosome Y- specific DNA in Related Human XX Males. Nature 315:224-226.
- 9.- Singh, L. and Jones, K.W. (1982). Sex Reversal in the Mouse (*Mus musculus*) is Caused by a Recurrent Nonreciprocal Crossover Involving the X and an Aberrant Y Chromosome. Cell 28:205-216.
- 10.- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B. L., Smith, M. J., Foster, J. W., Frischauf, A., Lovell-Badge, R. and Goodfellow, P. N. (1990). A Gene from the Human Sex Determining Region Encodes a Protein with Homology to a Conserved DNA-binding Motif. Nature 346:240-244.
- 11.- Gubbay, J., Collington, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1990). A Gene Mapping to the Sex Determining Region of the Mouse Y Chromosome is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes. Nature 346:245-250.
- 12.- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a Candidate Sex Determining Gene During Mouse Sexual Differentiation. Nature 348:450-452.

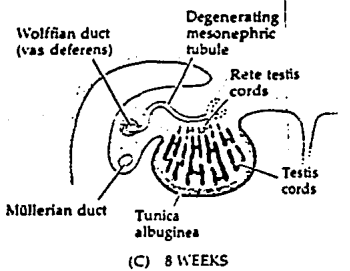
- 13.- Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Goodfellow, P. N. and Fellous, M. (1990). Genetic Evidence Equating *SRY* and the Testis Determining Factor. *Nature* 348:448-450.
- 14.- Jäger, R.J., Anvret, M. Hall, K. and Scherer, G. (1990). A Human XY Female with a Frameshift Mutation in the Candidate Testis-Determining Gene *SRY*. *Nature* 348:452-454.
- 15.- Koopman, P., Gubbay, J., Goodfellow, P. and Lovell-Badge, R. (1991). Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121.
- 16.- McLaren, A. et al. (1984). Male Sexual Differentiation in Mice Lacking the H-Y antigen. *Nature* 312: 552-55.
- 17.- Burgoyne, P.S., et al. (1988). Cell-autonomous Action of the Testis Determining Gene: Sertoli Cells are Exclusively XY in XX/XY Chimaeric Mouse Testes. *Development* 102:443-450.
- 18.- Page, D.C., Mosher, R., Simpson, E. M., Fisher, E. M. C., Mardon, G., Pollack, J., McGillivray, B., et al. (1987). The Sex Determining Region of the Human Y Chromosome Encodes a Finger Protein. *Cell* 51:1091-1104.
- 19.- Merchant, H. (1975). Rat Gonadal and Ovarian Organogenesis With and Without Germ Cells. An Ultrastructural study. *Devl. Biol.* 44:1-21.
- 20.- Schöler, H.R., Hatzopoulos, A. K., Balling, R., Siziki, N. and Gruss, P. (1989). A Family of Octamer-Specific Proteins Present During Mouse Embryogenesis: Evidence for Germ Line-Specific Expression of an Oct Factor. *EMBO J.* 8(9):2543-2550.
- 21.- Keshet, E., Lyman, S. D., Williams, D. E., Anderson, D. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Parada, L. (1991). Embryonic RNA Expression Pattern of the c-kit Receptor and its Cognate Ligand Suggest Multiple Functional Roles in Mouse Development. *EMBO J.* 10(9):2425-2435.
- 22.- Orr-Urtreger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y. and Lonai, P. (1990). Developmental Expression of c-kit, a Proto-oncogene Encoded by the *W* Locus. *Development* 109:911-923.
- 23.- Tajima, Y. et al. (1991). Biologically Active kit Ligand Growth Factor is Produced by Mouse Sertoli Cells and is Defective in *Sld* Mutant Mice. *Development* 113:1031-1035.
- 24.- Münsterberg, A. and Lovell-Badge, R. (1991). Expression of the Mouse Anti-Müllerian Hormone Gene Suggests a Role in Both Male and Female Sexual Differentiation. *Development* 113:613-624.
- 25.- Whitman, M. and Melton, D.A. (1989). Growth Factors in Early Embryogenesis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:93-117.
- 26.- Cross, M. and Dexter, M. (1991). Growth Factors in Development, Transformation and Tumorigenesis. *Cell* 64:271-280.
- 27.- Mercola, M. and Stiles, Ch. (1988). Growth Factors Superfamilies and Mammalian Embryogenesis. *Development* 102:451-460.

- 28.- Potts., J.D., et al. (1991). Epithelial-Mesenchymal Transformation of Embryonic Cardiac Endothelial Cells is Inhibited by a Modified Antisense Oligodeoxynucleotide to Transforming Growth Factor b3. P.N.A.S. 88:1516-1520.
- 29.- Godin, I. and Wylie, C.C. (1991). TGFb1 Inhibits Proliferation and Has a Chemotropic Effect on Mouse Primordial Germ Cells in Culture. Development 113:1451-1457.
- 30.- Cantley, L.C., Auger, K.R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R. and Soltoff, S. (1991). Oncogenes and Signal Transduction. Cell 64:281-302.
- 31.- Rappolee, D.A., Brenner, C.A., Schultz, R., Mark, D. and Werb, Z. (1988). Developmental Expression of PDGF, *TGF $\alpha$*  and *TGF $\beta$*  Genes in Preimplantation Mouse Embryos. Science 241:1823-1825.
- 32.- Derynck, R., Jarret, J.A., Chen, E.Y. and Goedel, D.V. (1986). The Murine Transforming Growth Factor-b Precursor. J. B. Chemistry 261(10):4377-4379.
- 33.- Martinez, R., Mathey-Prevot, B., Bernards, A. and Baltimore, D. (1987). Neuronal pp60-c-src contains a six amino acid insertion relative to its non-neuronal counterpart. Science 237:411-415.
- 34.- Bond, M. and Vallee, B.L. (1990). Isolation and Sequencing of Mouse Angiogenin DNA. Bioch. and Bioph. Res. Comm. 171(3):988-995.
- 35.- Van Beveren, C., van Straaten, F., Curran, T., Mueller, R. and Verma, I.M. (1983). Analysis of FBJ-MuSV Provirus and c-Fos (mouse) Gene Reveals that Viral and Cellular Fos Gene Products Have Different Carboxy Termini. Cell 32:1241-1255.
- 36.- Massagué, J. (1990). The Transforming Growth Factor b Family. Ann. Rev. Cell Biol. 6:597-641.
- 37.- Burgess, W. and Maciag, T. (1989). The Heparin-Binding (Fibroblast) Growth Factor Family of Proteins. Ann. Rev. Bioch. 58:575-606.
- 38.- Kandel, J. Bossy-Wetzell, E., Radvany, F., Klagsbrun, M., Folkman, J. and Hanahan, D. (1991). Neovascularization Is Associated with a Switch to the Export of bFGF in the Multistep Development of Fibrosarcoma. Cell 66:1095-1104.
- 39.- Derynck, R. (1990). Transforming Growth Factor a. Mol. Repr. and Dev. 27:2-9.
- 40.- Wadsworth, S., Muckenthaler, F. A. and Vincent III, W. (1990). Differential Expression of Alternate Forms of a *Drosophila scr* Protein During Embryonic and Larval Tissue Differentiation. Developmental Biology 138:296-312.

INDIFFERENT GONADS



TESTIS DEVELOPMENT



OVARY DEVELOPMENT

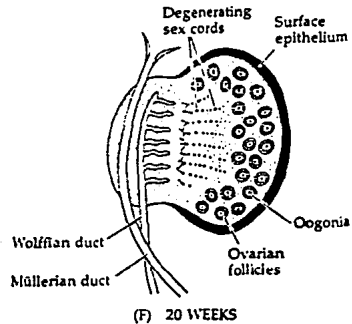
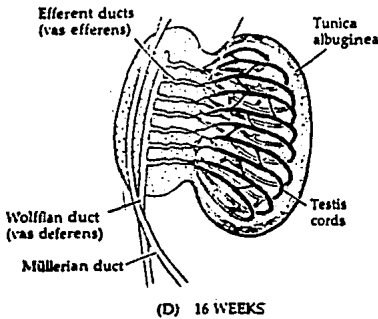
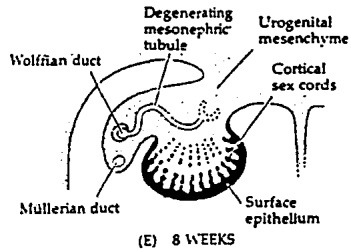


FIGURA 1. Esquema de los eventos morfológicos de la diferenciación gonadal en mamíferos. Figura tomada de ref. 2.

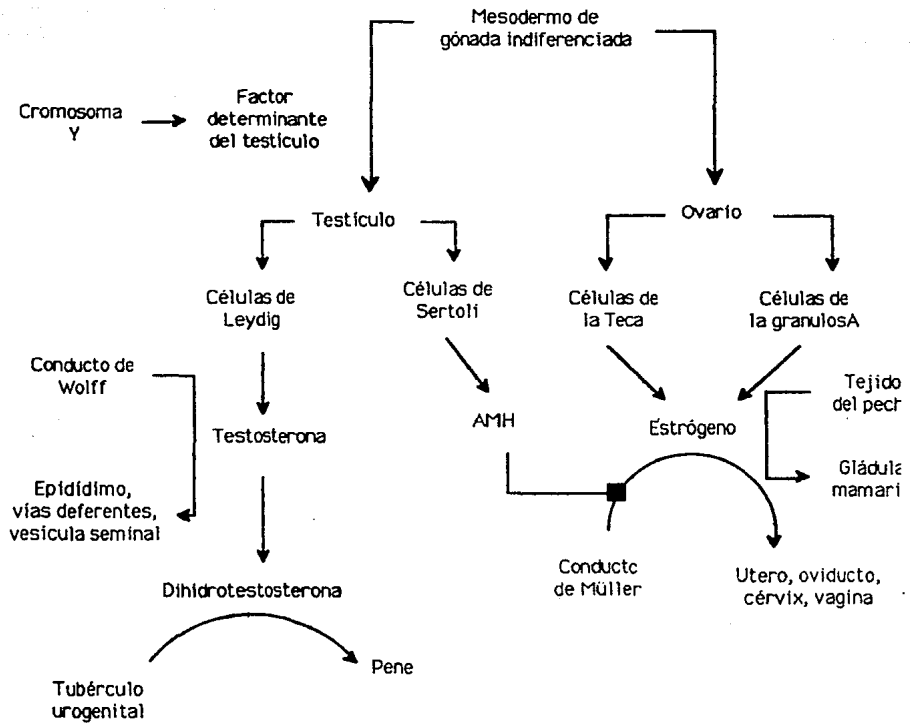


FIGURA 2. Esquema de los eventos que guían el fenotipo sexual en mamíferos (2).

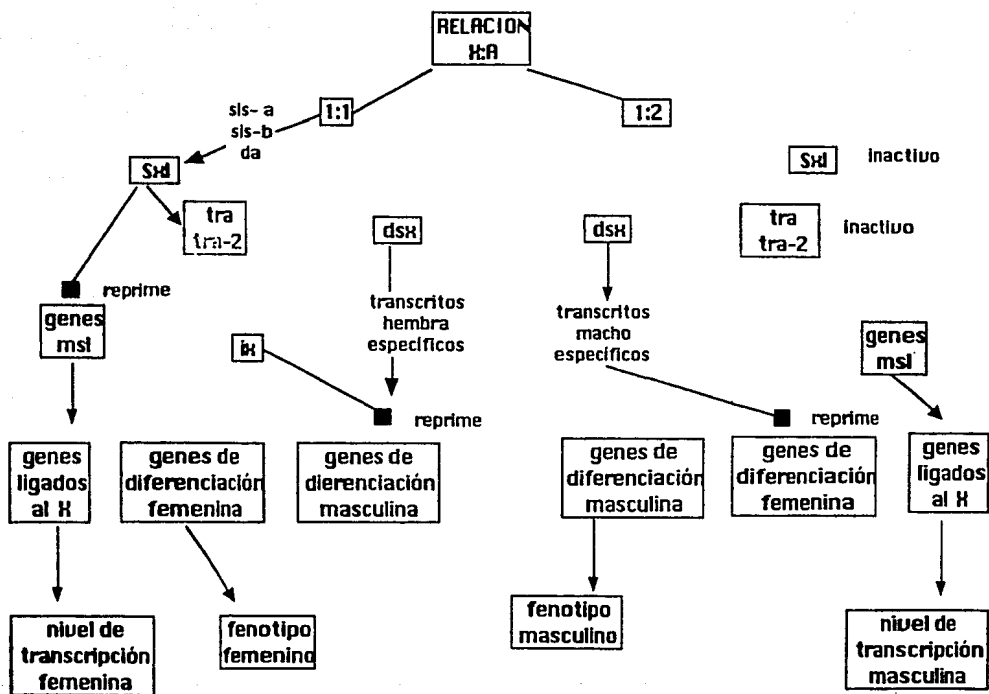


FIGURA 3. La cascada de regulación que se ha propuesto para la determinación del sexo en *Drosophila*. Las flechas indican activación y los cuadros negros represión.

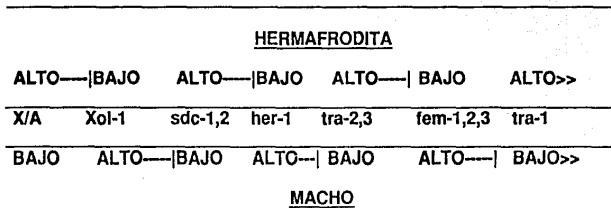


FIGURA 4. La cascada de regulación para la determinación del sexo en *C. elegans*. Si la relación es alta (XX/AA), se reprime xol-1, lo que permite la expresión del siguiente gene en la cascada, sdc-1 y sdc-2. La cascada continúa como se muestra en la figura; las flechas indican activación y los cuadros negros represión.

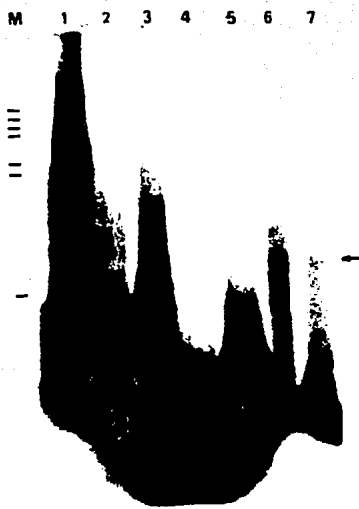


SELECCION DE FAMILIAS DE FACTORES DE CRECIMIENTO

Familia	Miembros	Receptor	Blanco conocido
Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)	EGF TGF $\alpha$ <i>notch</i> <i>delta</i> <i>ltn-12</i>	Tirosin cinasa. Producto de proto-oncogene c-erbB	Células mesénquima, epiteliales y gliales.
Factor de Crecimiento Transformante $\beta$	TGF $\beta$ 1-5 Inhibina Activina AMH BMP <i>Decapentaplegic</i> <i>VG-1</i>	Tres tipos.	Gran variedad de células
Factor de Crecimiento de Unión a Heparina	aFGF bFGF ECDFG <i>int-2</i>	Tirosin cinasa	Células endoteliales, epiteliales, mesenquimales y neurales.

\* Los genes homólogos a factores de crecimiento se indican con letras cursivas.

TABLA 1. Selección de familias de factores de crecimiento.



**FIGURA 6.** En cada paso, desde la síntesis de ADNc hasta la amplificación, se tomó una alícuota para marcar con  $^{32}P$  el ADNc con adaptadores, ya sea de gónada o de hígado. Carril 1: ADNc primera cadena de gónada embrionaria; carril 2: hibridación hígado-hígado; carril 3: hibridación hígado-gónada; carril 4: digestión con *Sau3AI* de hibridación hígado-hígado; carril 5: digestión con *Sau3AI* de hibridación hígado-gónada; carril 6: PCR de digestión hígado-hígado; carril 7: PCR de digestión hígado-gónada.

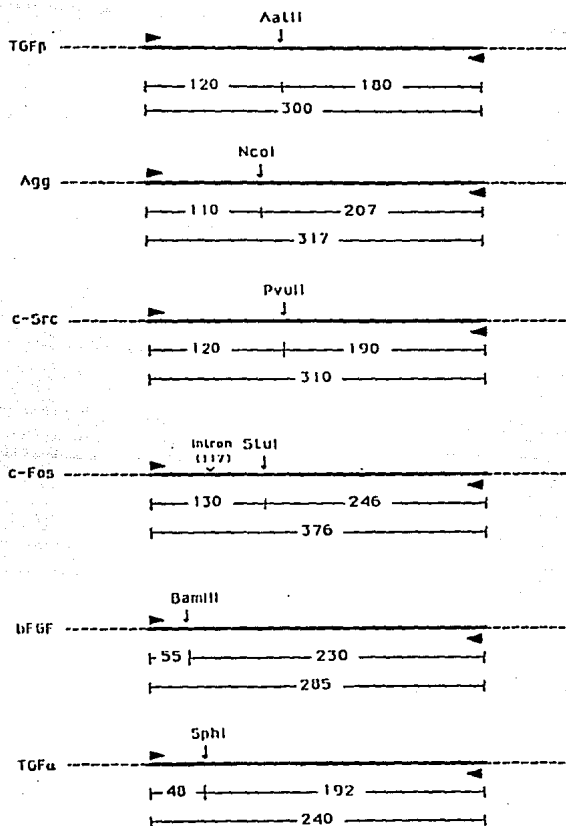


FIGURA 7. Estrategia para cada PCR. Con puntas de flecha se representan los oligos utilizados para cada caso; se indica también el patrón de restricción de cada fragmento, donde los números equivalen a pares de bases.

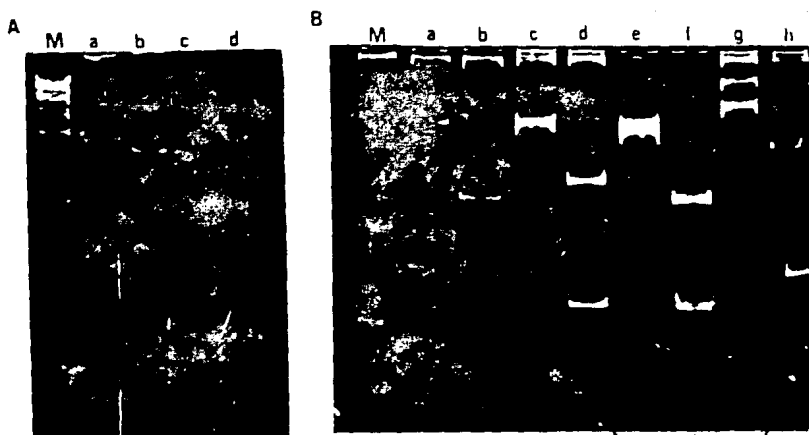


FIGURA 8. Caracterización de los productos de PCR. Panel A: a) bFGF; b) bFGF/BanHI; c) TGF $\alpha$ ; d) TGF $\alpha$ /SphI. Panel B: a) TGF $\beta$ ; b) TGF $\beta$ /AatII; c) Agg; d) Agg/NcoI; e) c-Src; f) c-Src/PvuII; g) c-Fos; h) c-Fos/StuI. M=298, 221, 154 pb.

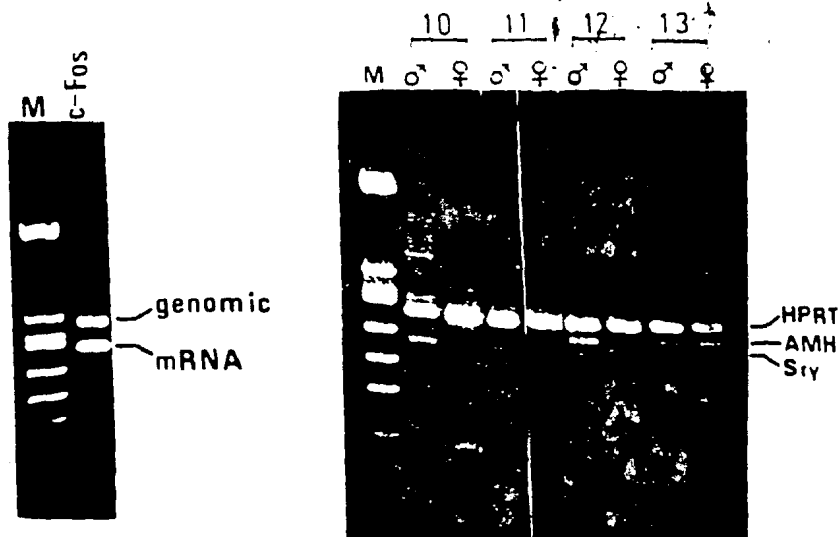


FIGURA 9. Panel A: Identificación de fragmentos correspondientes a ADN genómico (493 pb) y ARNm (378 pb) proveniente de cerebro de ratón. Panel B: Patrón de expresión de Sry y AMH de 10.5-13.5 dpc. Se observa la banda correspondiente a AMH en hembras debido a que los oligos utilizados estaban contaminados con templado.

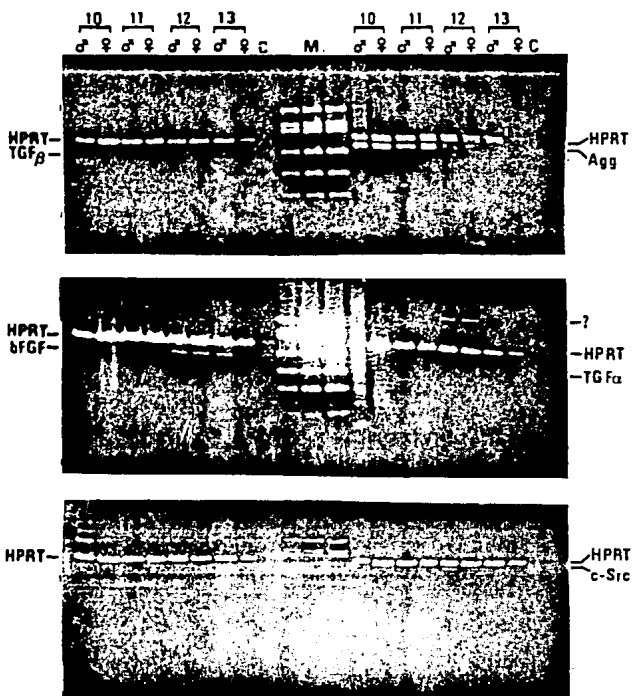


FIGURA 10. Patrón de expresión de factores de crecimiento y proto-oncogenes durante el desarrollo gonadal. Los números indican la edad en dpc.