

87  
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EXPRESION DEL ARN mensajero DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO SEMEJANTE A INSULINA TIPO II  
(IGF-II), ANTES Y DESPUES DE LA  
DIFERENCIACION SEXUAL DEL OVARIO DEL  
RATON B6.YDOM

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

FLORIA JOSEFINA LIZARRAGA SANCHEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. IRMA VILLALPANDO FIERRO



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS  
REGISTRAR GENERAL

1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: **Expresión del ARNm mensajero del factor de crecimiento semejante a insulina tipo II (IGF-II)**, antes y después de la diferenciación sexual del ovario del ratón B6.YDOM realizado por **Lizárraga Sánchez Floria Josefina**

con número de cuenta 9251698-2 . . . pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro

Propietario

M. en C. Víctor Manuel Valdés López

Propietario

Dra. Ma. del Carmen Uribe Aranzábal

Suplente

Biol. Horacio Villafán Monroy

Suplente

Biol. Miguel Angel Palomino Garibay

*Junto*

FACULTAD DE CIENCIAS

*C. Villalpando*

*Ma del Carmen Uribe*

*Horacio Villafán Monroy*

*[Signature]*

Consejo Departamental de Biología

M. en C. ALEJANDRO MARTÍNEZ MENA

**A mi tía Margo, por su amor a la vida,  
por su ejemplo como ser humano y profesionalista,  
por todo  
GRACIAS**

**A mis padres, Salvador y Josefina  
por su amor, por su preocupación por mi vida  
y por mi crecimiento humano  
GRACIAS**

**A mis hermanitos, Salvador y Javier  
por su amor, su ejemplo y comprensión**

**A mis abuelitos, tios, primos y amigos  
con muchísimo cariño**

**A Leonardo**

## AGRADECIMIENTOS

En especial, a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Ciencias y a sus profesores, por impulsar a los jóvenes mexicanos hacia el estudio de la Ciencia, GRACIAS.

A la Dra. Irma Villalpando , directora de esta tesis., por su dedicación como investigadora, por su confianza y por todo el apoyo durante mi formación, muchas gracias.

Al Biólogo Horacio Villalán Monroy por todas sus enseñanzas, personales y en el laboratorio; por su apoyo durante la fase experimental de este trabajo y por su amistad, mil gracias.

A la Bióloga Guadalupe Sánchez Bringas por su apoyo incondicional; por el deseo de transmitir sus conocimientos, por sus valiosos comentarios y por su amistad y cariño, muchas gracias.

Al jurado que amablemente revisó y evaluó la presente investigación, Gracias.

A mis compañeros del laboratorio Gloria, Lilia, Pilar, Yessenia, Perla, David, Daniel, Omar y Mario por su ayuda y, por su apoyo en todo.

A mi hermano Gala y a Leonardo por sus hermosos dibujos incluidos en esta tesis.

A Rodolfo por su cariño y paciencia, por su amor a la Biología, por su ejemplo y por los geles, mil gracias.

A "mi" Toti por su amor, confianza y apoyo siempre, gracias.

Al programa de becas de DGAPA a través del proyecto IN215296 por la beca otorgada para realizar esta tesis.

A mis profesores, compañeros y amigos, muchas gracias.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Embriología Molecular, del Departamento de Biología Celular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. Irma Villalpando Fierro.

## CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
1. Determinación del sexo cromosómico	2
1.1. Desarrollo y diferenciación sexual de la gónada de roedores	3
a) Formación de la cresta genital (10.5 d.g.)	3
b) Etapa indiferenciada (11 a 12 d.g.)	4
c) Diferenciación sexual	4
i) Ovario	4-5
ii) Testículo	5-6
2. El gen responsable de la diferenciación testicular	6
a) Expresión	7
b) Diferenciación bioquímica del testículo	8
c) Función de otros genes autosomales en la diferenciación testicular	8-9
d) Aspectos evolutivos	9
3. Interacciones de las células somáticas y germinales	9-10
4. Características del ratón B6.Y <sup>DOM</sup>	11
a) Aspectos genéticos	11-14
b) Desarrollo morfológico de la gónada	15-16
5. El factor de crecimiento semejante a insulina tipo II	16
a) Aspectos bioquímicos y moleculares del IGF-II	16-19
b) Funciones	19-21
c) Papel en la esteroidogénesis	21-23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	24

IV. OBJETIVOS	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	
1. Reactivos	26
2. Animales	26
3. Obtención de los ratones B6.Y <sup>DOM</sup>	26
4. Determinación de la edad de gestación	26-28
5. Identificación del sexo genético de los embriones	29
a) Marcado de la sonda del cromosoma "Y" con P <sup>32</sup>	29
b) Prehibridación	29
c) Hibridación	30
d) Autoradiografía	30
6. Obtención del ARN total	30-31
7. Reacción en cadena de la polimerasa	31
a) Síntesis de oligonucleótidos	31-32
b) Elaboración del ADNc con transcriptasa reversa	32
c) Amplificación en cadena de la polimerasa	33
d) Visualización de los productos amplificados	35
e) Fotografías	35
VI. RESULTADOS	
1. Detección del sexo cromosómico	36
2. Expresión del ARNm para IGF-II	37
a) IGF-II-A	37-39
b) IGF-II-B	40-42
3) Expresión del S <sub>21</sub>	43



4) Expresión de la enzima Hprr	43
VII. DISCUSIÓN	44-52
VIII. CONCLUSIONES	53
IX. REFERENCIAS	54-62
X. APÉNDICE	63-64

## ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Monofostato cíclico de adenosina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNhn	Ácido ribonucleico heterólogo nuclear
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNsas	Enzimas que degradan el ARN
3 $\beta$ -HSD	3 $\beta$ -Hidroxiesteroidehidrogenasa
B6	Cepa de ratón C57BL/6J
CG's	Células germinales
CGP's	Células germinales primordiales
DEPC	Diethylpirocarbonato
d.g.	Días de gestación
d.p.c.	Días <i>post coitum</i>
d.p.p.	Días <i>post partum</i>
d(NTP's)	Desoxinucleótidos trifosfatados
dATP	5' trifosfato de desoxiadenosina
dCTP	5' trifosfato de desoxicitidina
dGTP	5' trifosfato de desoxiguanosina
dTTP	5' trifosfato de desoxitimidina
Eco-RI	Enzima de restricción; G↓AATTC

EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FSH	Hormona estimulante del foliculo
Hinf-I	Enzima de restricción; G↓ANTC
HMG	Grupo de alta movilidad
Hprt	Hipopantina(guanina)-fosforribosil-transferasa
IGF-I	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo I
IGF-II	Factor de crecimiento semejante a insulina tipo II
IGF's	Factores de crecimiento semejantes a insulina
Kb	Kilobases
LH	Hormona luteinizante
MSA	Actividad estimuladora de la división celular
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio
MIS	Sustancia inhibidora de los conductos de Müller
P <sup>32</sup>	Radioisótopo
pb	Pares de bases
pre-ARN	Primer producto de la transcripción del cual no han sido removidos los intrones.
RCP-TR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
T	Testosterona

TBE	Amortiguador de tris-ácido bórico-EDTA
TDF	Factor determinante del testículo en humano
T $\alpha$	Factor determinante del testículo en ratón
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TGF- $\beta$ 1	Factor de crecimiento transformante $\beta$ 1
U.V.	Ultravioleta
T-R	Transcriptasa reversa

## UNIDADES

$^{\circ}$ C	Grados centígrados
cpm	Cuentas por minuto
Kb	Kilobases
M	Molar
ml	Mililitros
pH	Potencial hidrógeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
$\mu$ l	Microlitros
1X	Concentrado una vez
5X	Concentrado cinco veces

## I. RESUMEN

En los mamíferos, durante la vida embrionaria el gen *Sry*, presente en el cromosoma "Y", determina la diferenciación del testículo. Sin embargo, cuando se transfiere el cromosoma "Y" del ratón *Mus musculus poschiavinus* (*Mus musculus domesticus*) a la cepa C57BL/6J (B6), la descendencia XY (B6.Y<sup>DOM</sup>) desarrolla ovotestis y ovarios en la vida embrionaria, pero nunca testículos normales. Por otra parte, se ha observado que las células del ovario de los mamíferos son estimuladas a crecer y diferenciarse por los factores de crecimiento semejantes a insulina, IGF's. Se ha determinado que el IGF-I tiene un papel importante en la esteroidogénesis adulta y probablemente en la embrionaria mientras que la función esencial del IGF-II es la de promover la división celular durante la embriogénesis en diferentes especies y también participa en la biosíntesis de esteroides en la etapa postnatal. Sin embargo no se ha determinado el posible papel del IGF-II en el desarrollo embrionario de la gónada del ratón. El objetivo de esta investigación fue estudiar la expresión del ARNm del IGF-II en la morfogénesis de la gónada de los embriones de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> (10.5 a 16 d.g.). El sexo genético se determinó con la técnica de hibridación en punto, con una sonda que reconoce las secuencias repetidas del cromosoma "Y". A través de la técnica de amplificación en cadena de la polimerasa, empleando una transcriptasa reversa, se amplificó el ARNm del IGF-II. Los resultados muestran que probablemente existen dos formas del ARNm maduro del IGF-II que fueron denominadas IGF-II-A e IGF-II-B. Las dos formas se expresan a los 10.5 d.g. en los complejos urogenitales XX y XY. En las gónadas indiferenciadas XX de 11 d.g. la expresión del IGF-II-A es menos intensa mientras que a los 12 d.g. la expresión es mayor. A los 14 d.g. disminuye y ésta se mantiene hasta los 16 d.g. La expresión del IGF-II-B en los ovarios XX fue similar a la del IGF-II-A. En las gónadas indiferenciadas XY de 11 d.g., el ARNm para el IGF-II-A no se detectó. Su expresión se reinicia a los 11.5 d.g. y la máxima expresión se observó a los 12 d.g. Se encontró que la intensidad del mensajero a los 14 y 16 d.g. es menor. La expresión del IGF-II-B se observó en todas las edades de gestación estudiadas en los ovarios XY. Se propone que el IGF-II podría participar como un factor mitogénico y de diferenciación durante el establecimiento de la gónada indiferenciada, así como en el proceso de crecimiento y maduración de las células somáticas de la gónada, en las hembras XX y en las XY. Algunos factores, como el *Sry*, podrían modular la maduración alternativa del ARNm para el IGF-II, en las hembras XY.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Determinación del sexo cromosómico

En los mamíferos el establecimiento del sexo genético ocurre en el momento de la fecundación. La determinación sexual está basada en el dimorfismo cromosómico que existe entre ambos sexos. Las hembras tienen dos cromosomas "X" y los machos poseen un cromosoma "X" y uno "Y". Desde 1959 se sabe que en el humano y en el ratón los individuos con una constitución cromosómica "XX" o "XO" son hembras mientras que aquellos con un complemento cromosómico "XY" o "XXY" son machos (Ford y col., 1959 y Jacobs y col., 1959). Se sugirió que el cromosoma "Y" contiene al menos un gen que es requerido para el desarrollo testicular. Posteriormente, en los humanos, este gen fue denominado "factor determinante del testículo" (*TDF*) y su homólogo en el ratón, *Tdy* (Ford y col., 1959 y Jacobs y col., 1959).

Un factor crítico en la determinación y diferenciación sexual en los mamíferos es el desarrollo de la gónada (órgano que contiene a las CG's precursoras de los gametos, las células de Sertoli o a las células de la granulosa, fibroblastos, células esteroideogénicas y vasos sanguíneos), la cual se localiza en el embrión en la región ventral del mesonefros, hacia el celoma. En una serie de experimentos clásicos, Alfred Jost mostró el papel central que juegan los testículos en el desarrollo masculino. Sus observaciones (Jost, 1972) sugirieron que el plan básico de desarrollo en los mamíferos es femenino y que es la presencia de los testículos la que determina que el fenotipo de los genitales internos y externos sea masculino. También demostró que los testículos producen testosterona y el MIS, los cuales son responsables de inducir el desarrollo de los conductos que determinan la diferenciación sexual interna de los genitales (Jost, A., 1947 y 1953).

## 1.1 Desarrollo y diferenciación sexual de la gónada de roedores

### a) Formación de la cresta genital (10.5 d.g.)

Esta etapa se caracteriza principalmente por la proliferación de las células somáticas del epitelio celómico y de las CGP's (Merchant-Larios, 1978). Estas últimas, en los embriones del ratón, se encuentran originalmente en el epiblasto de la gástrula (Hahnel y col., 1986) y pueden ser reconocidas en el mesodermo extraembrionario desde los 7 d.p.c. (Ginsburg y col., 1990). Inicialmente son una población pequeña de células localizadas en la raíz del alantoides en formación (Chiquoine, A., 1954). Los siguientes cuatro días llevan a cabo una migración hacia las crestas genitales (células que originarán la gónada unidas a la zona ventral del mesonefros), la cual se divide en dos fases. En la primera fase (entre los 7.5 y los 8.5 d.p.c.) las CGP's se mueven, de manera pasiva, del endodermo hacia el intestino posterior. Estas células son llevadas junto con el endodermo del intestino en un movimiento de invaginación y no presentan fenotipo de células migratorias. En contraste, en la fase activa (9.5 a 11.5 d.p.c.) se mueven a través del mesenterio dorsal hacia las crestas genitales mediante la extensión de filopodios o lamelipodios, implicando una relación estrecha entre ellas y las células sobre las cuales migran (Merchant-Larios, 1978 y Stott y col., 1986). La mayoría de las CGP's alcanzan la región urogenital en el día 11 después de la fertilización y se ha propuesto que en este período su número aumenta desde 100 a 4000 aproximadamente (Tam y col., 1981).

Hasta el presente se sabe poco acerca de los factores que controlan la sobrevivencia, proliferación y migración de las CGP's. Se piensa que la adhesión de las CGP's a componentes de la matriz extracelular está regulada durante el desarrollo por cambios que ocurren en relación con las diferentes fases del comportamiento de éstas. La adhesión de las CGP's a la fibronectina se interrumpe cuando comienza su migración desde el intestino posterior a la cresta urogenital y disminuye aún más cuando ésta ha terminado (Godin y col., 1990). Otros investigadores han propuesto que su migración puede ser inducida por la fibronectina exógena (Álvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986 y Ffrench-Constant y col., 1991). Por otro lado, ciertas evidencias *in vitro* sugieren que las crestas genitales del ratón de 10.5 dpc secretan una proteína semejante al TGF- $\beta$ 1 que es capaz de atraer a las

CGP's del ratón e inhibir además la proliferación de estas células en cultivo (Godin y col., 1991).

**b) Etapa indiferenciada (11 a 12 d.g.)**

Las CGP's en la cresta urogenital son rodeadas por células mesenquimáticas y epiteliales, con las cuales se asocian estrechamente para formar el primordio gonadal. Después, las células somáticas proliferan conforme llegan las CGP's y forman un agregado compacto llamado "blastema gonadal"; la ausencia de lámina basal permite la interacción entre los diferentes tipos celulares (Merchant-Larios, 1978).

A continuación, se inicia el depósito de una lámina basal delgada entre las células del blastema gonadal, permitiendo que gradualmente se formen los cordones sexuales de tipo epitelial. Este tejido queda entonces separado del estroma mesenquimático, situado en el área dorsal de la cresta genital a lo largo del mesonefros. Así, se establece la gónada indiferenciada con un componente epitelial, entre cuyas células somáticas quedan incluidas las CGP's. En el componente estromático se encuentran a los primeros vasos sanguíneos que irrigan el primordio gonadal, a las células precursoras del tejido conectivo de las gónadas y a las células intersticiales esteroideogénicas. Las hembras y los machos pasan por esta etapa, independientemente del tipo de cromosomas que posean (Merchant-Larios, 1984).

Cada embrión de mamífero posee además de un par de primordios gonadales bipotenciales, un sistema doble de conductos incipientes. Si el embrión es cromosómicamente femenino y sus primordios gonadales se diferencian como ovarios, los conductos de Müller se diferencian como trompas de Falopio, útero y vagina superior y los conductos de Wolf involucionan. Por otro parte, si los primordios gonadales de un macho genético se desarrollan como testículos, los conductos de Wolf se diferencian como epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales y el desarrollo de los conductos de Müller es inhibido (Jost, 1972).



## **c) Diferenciación sexual**

### **i) Ovario**

Morfológicamente el ovario es parecido a la gónada indiferenciada, a excepción de cierto crecimiento debido a la proliferación de las células germinales y somáticas. El primer indicador funcional del desarrollo ovárico en un individuo femenino es el inicio de la meiosis de las células germinales, la cual ocurre entre los 13.5 y los 15 d.p.c. en el caso del ratón y es variable entre las diferentes cepas (McLaren y Buehr, 1990). Después del comienzo de la meiosis, se inicia el proceso de formación de folículos. En la región central de la gónada (médula), los ovocitos que se encuentran agrupados en el interior de los cordones sexuales, empiezan su crecimiento y son separados por las células epiteliales (que dan origen a las células de la granulosa). Los cordones gonadales en edades tempranas son poco evidentes. Posteriormente, estas células adquieren una forma cúbica y se forman así los primeros folículos que mantienen comunicación temporalmente mediante puentes celulares que después desaparecen. Finalmente, los ovocitos de la región periférica de la gónada (corteza) son también individualizados por células epiteliales (con la diferencia de que las células foliculares presentan una disposición plana) constituyendo la reserva de folículos primordiales. A medida que éstos crecen, se diferencian los siguientes tipos celulares a partir del tejido estromático adyacente: se forma primero la "teca interna" esteroidogénica, constituida por células mioides y fibroblastos. Rodeando a la teca interna, posteriormente se establece la "teca externa" formada por tejido conectivo fibroso, la cual está irrigada por vasos sanguíneos que no atraviezan la lámina basal del folículo (Merchant-Larios, 1984).

Por otra parte, se realizaron estudios para detectar la expresión de los genes para algunas enzimas que participan en la esteroidogénesis gonadal, en la cepa de ratón B6. Se demostró que los ovarios fetales expresan el ARNm para la enzima 3- $\beta$ -hidroxiesteroidehidrogenasa desde los 13 dpc. La expresión de las enzimas 20,22-desmolasa, 17 $\alpha$ -hidroxilasa y la P450 aromatasasa, que participan en la síntesis de esteroides gonadales, se observó con una frecuencia del 10% (Greco y Payne, 1994). Lo anterior sugiere que la ausencia de estas enzimas es en parte la causa de la baja actividad esteroidogénica en el ovario fetal del ratón B6.

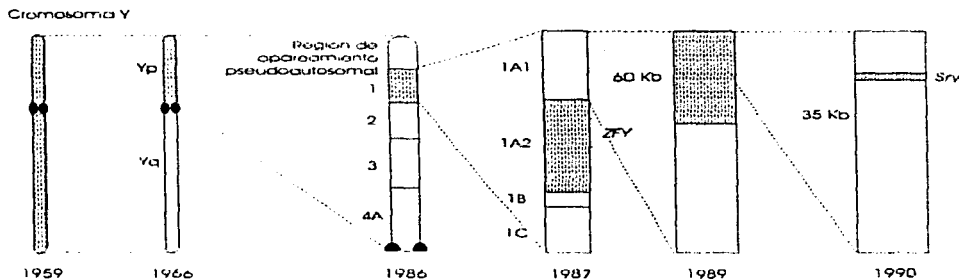
## ii) Testículo

Los primeros cambios morfológicos y funcionales ocurren en los individuos genéticamente machos. Los cordones sexuales se separan gradualmente del epitelio superficial de la gónada debido a un mayor grado de compactación por parte de éstos y a la invasión de tejido mesenquimático y de vasos sanguíneos provenientes de la región mesonéfrica (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

Una vez en la zona central de este órgano, los cordones son llamados "testiculares" y posteriormente, cuando forman un lumen, son denominados "túbulos seminíferos". En éstos, las células somáticas epiteliales o pre-Sertoli y las células germinales están rodeadas por la lámina basal, la cual es producida en parte por las células mioides. El tejido estromático que envuelve a los tubos seminíferos contiene las células mioides, vasos sanguíneos, fibroblastos y células de Leydig (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

## 2) El gen responsable de la diferenciación testicular

En algunos euterios el análisis del cromosoma "Y" mostró que en un fragmento mínimo de 35 kb, localizado inmediatamente abajo del límite de la región pseudoautosomal del brazo corto "p", llamado *SRY* en humano, es capaz de inducir la formación de testículos (Sinclair y col. 1990) (Esquema 1).



Esquema 1. Ubicación de la región que determina el inicio de la formación del testículo: *Sry* (Tomado de McLaren A 1990 *Nature* 351:96).

Algunas evidencias proponen que el *SRY* es el factor determinante del testículo: a) por su localización en el cromosoma "Y" y porque una sola copia es capaz de inducir la diferenciación testicular en el ratón (Gubbay y col., 1990); b) algunas hembras "XY" con disgenesia gonadal presentan mutaciones *de novo* en el *SRY* (Berta y col., 1990; Jäger y col., 1990 y Koopman y col., 1991); c) un fragmento de 14 kb en el cromosoma "Y" del ratón que incluye al gen *Sry* (homólogo al *SRY*) puede conducir al desarrollo masculino de hembras transgénicas (Koopman y col., 1991).

#### a) Expresión

El *Sry* codifica para una proteína cromosomal del grupo HMG, perteneciente a la clase no-histonas que contiene un motivo de unión al ADN (designado como dominio HMG) (Gubbay y col., 1990 y Sinclair y col., 1990). Giese y colaboradores (1994) mostraron que la unión del *Sry* a la secuencia de nucleótidos 5'-CATTTGTT-3', induce un giro de 60°-85° en este sitio y promueve así la transcripción de loci remotos. La proteína SRY no se ha identificado aún en embriones de ratón en estadios de desarrollo gonadal temprano, pero se ha postulado que ejerce su efecto en la cresta genital justo antes de la diferenciación testicular morfológica.

El patrón de expresión del *Sry* durante el desarrollo gonadal embrionario del ratón es congruente con su papel en la determinación testicular: se observa durante un período corto, específicamente en las células somáticas de la cresta genital, los transcritos del *Sry* se detectaron primeramente a los 10.5 d.p.c. (cresta genital), aumentando a un máximo a los 11.5 d.p.c. (gónada indiferenciada) y posteriormente declinaron hasta no encontrarse señales a los 12.5 d.p.c. (diferenciación sexual) (Koopman y col., 1990 y 1991). Zwingman y colaboradores (1993) encontraron transcritos del *Sry* en algunos embriones de ratón (estadio de 2 células, previo a la implantación); sin embargo, es discutible si niveles tan pequeños de transcritos poseen algún papel fisiológico en el embrión. El conjunto de estos datos apunta a un sistema finamente regulado en el cual el *Sry* disminuye o favorece la transcripción de otros loci; Haqq y colaboradores (1993) demostraron que la proteína del *Sry* protege residuos

específicos de los genes para el MIS y la P450 aromatasa y plantearon que esta proteína potencia la expresión del MIS e inhibe la de la P450 aromatasa.

Es posible que el gen *Sry* forme parte de una serie de genes que se expresan secuencialmente, los cuales estarían presentes en los autosomas o en el cromosoma "X" y que en conjunto, podrían participar para dirigir el desarrollo del fenotipo masculino (McLaren, 1990).

#### **b) Diferenciación bioquímica del testículo**

Los eventos bioquímicos que llevan a la diferenciación sexual del testículo son importantes y decisivos. La producción de ciertos factores y la adquisición de las enzimas necesarias para la síntesis de hormonas esteroideas masculinas es crítica en la regulación de la diferenciación testicular (Merchant-Larios, 1978). Los testículos en desarrollo producen dos factores que exportan la señal determinante masculina al resto del embrión (Jost, 1953). El MIS es secretado por las células de Sertoli y elimina los conductos paramesonéfricos o de Müller y la testosterona, que es producida por las células de Leydig, estimula el desarrollo del tracto reproductor masculino a partir de los conductos mesonéfricos o de Wolf (Jost, 1953).

En 1994, Greco y Payne analizaron en la cepa de ratón B6, la expresión de los genes para las enzimas que participan en la síntesis de esteroides y encontraron que los testículos fetales de ratón tienen la capacidad para elaborar andrógenos desde los 13 d.p.c.

#### **c) Función de otros genes autosomales en la diferenciación testicular**

Washburn y Eicher (1989) observaron un gen autosómico determinante sexual en el ratón, llamado *Tas* (reversión sexual asociada al locus *brachyury*). Este gen se segrega con el complejo génico *Tit* del autosoma 17, del *Mus musculus* y se han encontrado diferentes alelos para él en las distintas cepas de ratón. El cromosoma "Y" de la cepa AKR es incapaz de dirigir la morfogénesis testicular si el autosoma 17 proviene de la cepa C57. En este caso, la determinación del testículo normal se impide y cada gónada contiene una mezcla de tejido ovárico y testicular y hasta la fecha, se desconoce como interactúa este gen con el *Sry*.

Por otro lado, en humanos se ha postulado la existencia de un gen, denominado Z, cuya actividad inhibe la diferenciación testicular y estimula la formación de ovarios (McElreavey y col., 1993).

Morais y sus colaboradores (1996) mostraron que en las gónadas fetales de ratón, el ARNm y la proteína del gen *Sox9* (que está relacionado con el *Sry* ya que presenta también el motivo de unión al ADN, llamado HMG) se observan en las células de Sertoli y no otras líneas celulares durante el desarrollo embrionario y los testículos adultos. Por lo anterior, sugirieron que este gen participa en la diferenciación de las células de Sertoli y en el mantenimiento de su función. La conservación de su patrón de expresión sexual dimórfico en aves y mamíferos, dos clases de vertebrados en las que hay diferencias significativas en los mecanismos de determinación sexual, apunta a que el gen *SOX9* tiene un papel fundamental en la determinación sexual de los vertebrados.

#### **d) Aspectos evolutivos**

El *SRY* es un gen que se ha conservado entre marsupiales y euterios desde su divergencia hace aproximadamente 120 a 150 millones de años. El análisis de la secuencia de aminoácidos predicha para este gen muestra que el dominio HMG (de unión al ADN) se ha conservado solo dentro de la clase Mamíferos (Foster y col., 1992 y Pevny y Lovell-Badge, 1997).

### **3. Interacciones de las células somáticas y germinales**

La morfogénesis gonadal se ve afectada, inicialmente, por la presencia de las CGP's. La interacción entre éstas y las células somáticas de la cresta genital es evidente antes de que ocurra la colonización e implica la diferenciación temprana del epitelio celómico de la cresta genital. Aparentemente, sólo las células de ésta atraen de manera específica a las CGP's; sin embargo, hasta el presente se desconoce el mecanismo (Merchant-Larios, 1984).

Se ha propuesto que no sólo el complemento cromosómico de las CGP's es el que determina que éstas sean ovogonias o espermatogonias; esta decisión podría ser modulada por el ambiente celular en el que se encuentran a través diferentes mecanismos: a) una molécula de superficie o que fuera secretada por las células de Sertoli, la cual provocaría que

las células germinales no iniciaran la meiosis; b) un factor de secreción elaborado por las mismas células germinales, el cual sólo se acumularía en concentraciones suficientemente altas cuando éstas estuvieran rodeadas por las células de Sertoli; c) un factor inductor externo general de meiosis excluido del interior de los cordones por las células epiteliales (Lovell-Badge, 1992).

Por otra parte, se conoce muy poco acerca del origen de las células somáticas que forman el primordio gonadal. Se piensa que tanto el epitelio celómico como el mesénquima adyacente al mesonefros, contribuyen a la formación de la cresta genital. El epitelio celómico podría originar a las precursoras de las células de Sertoli y de la granulosa y el mesénquima podría dar lugar a las células mioides e intersticiales (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

Buehr y McLaren (1993) sugieren que son necesarios otros tipos celulares para la diferenciación correcta de las células de Sertoli y de los testículos. Encontraron células del mesonefros que migran hacia las crestas genitales y que posteriormente se diferencian como algunas células mioides e intersticiales rodeando a los cordones donde se encuentran las células de Sertoli. Se ha propuesto que estos tipos celulares se requieren para la formación de los cordones seminíferos (Merchant-Larios y col., 1993).

Los estudios de quimeras y mosaicos "XX/XY" de ratón indican que al menos una porción de las células somáticas de la cresta genital debe ser "XY" para que se desarrolle un testículo (aproximadamente el 25%, dependiendo de la cepa) (McLaren, 1984). Las células de Sertoli son casi exclusivamente "XY" y se ha propuesto que el  $Sry$  actúa autónomamente en estas células para que se diferencien y que los demás aspectos del desarrollo testicular, son dirigidos por estas células (Burgoyne y col., 1988 y Palmer y col., 1991).

No hay una señal de respuesta obvia por parte de las células germinales hacia las células somáticas que sea requerida para el desarrollo testicular. Los testículos se forman normalmente en aquellos machos que presentan mutaciones en ciertos loci que ocasionan la carencia completa de las células germinales en la cresta genital (Mintz y Russell, 1957; McLaren, 1985 y Koopman y col., 1990). En contraste, las CGP's son requeridas para el desarrollo del tejido esteroideogénico de los ovarios y en su ausencia, las células foliculares no se organizan y el ovario degenera. Como no se conoce ningún marcador temprano que pudiera indicar la diferenciación de las células foliculares, no es posible definir si la determinación del ovario se ha completado. Una hipótesis acerca de esto es que las células

germinales que inician la meiosis, proveen una señal inductora ovárica, pero algunos intentos preliminares para comprobar esta hipótesis sugieren que éste no es el caso (Lovell-Badge, 1992).

El establecimiento de un fenotipo sexual depende entonces de señales entre las células, mediadas por hormonas esteroides y factores de crecimiento.

#### 4. Características del ratón B6.Y<sup>DOM</sup>

##### a) Aspectos genéticos

En 1982, Eicher y Washburn diseñaron una serie de experimentos para transmitir la  $\alpha$ -talasemia, a partir de un ratón macho de la cepa designada "POS A", hacia la cepa de ratón B6. Los machos de las generaciones subsecuentes, en los cuales se determinó esta condición, se emplearon para continuar la transferencia de la  $\alpha$ -talasemia por el método tradicional de retrocruza. Las autoras encontraron que a partir de la generación N2 en adelante, las camadas tenían un exceso de hembras en su descendencia. El análisis de bandeó cromosómico mostró que muchas de las hembras producidas por estas retrocruzas eran en realidad individuos "XY"; sin embargo, la proporción de la descendencia "XX" con respecto a la "XY", fue 1:1. Además, no se encontró que ninguna hembra "XY" fuese un mosaico (XO/XY, XX/XY) y se comprobó que la mutación para la  $\alpha$ -talasemia no está involucrada en la reversión sexual encontrada.

Hasta el presente, en la generación F1 no se observan hermafroditas al cruzar hembras B6 con machos puros *M. poschiavinus* o *M. domesticus*; sin embargo, si a partir de esta generación se continúa la retrocruza, ocurre reversión sexual completa o parcial en aproximadamente la mitad de la progenie "XY" (Eicher y Washburn, 1982, 1983 y 1986).

Eicher y Washburn (1983) proponen que la cepa B6 difiere de las demás de la especie *M. domesticus*, en un locus autosómico que está involucrado en la diferenciación sexual primaria; este locus es denominado *testis-determining, autosomal-1 (tda-1)*. Para explicar la reversión sexual, las autoras postularon que el alelo de este locus, que proviene del progenitor masculino *M. domesticus* o *M. poschiavinus*, es dominante ( $Tda-1^{DOM}$ ) y que el alelo perteneciente a la cepa B6 es recesivo ( $tda-1^{B6}$ ). Proponen que los individuos

desarrollan testículos normales si tienen el alelo dominante *Tda-1<sup>DOM</sup>* (homócigo o heterócigo) y el cromosoma "Y" derivado del *M. domesticus*. En contraste, si el alelo *tda-1<sup>B6</sup>* es homócigo en presencia del cromosoma "Y" proveniente del *M. poschiavinus*, se previene la diferenciación testicular normal ("completa") y se desarrolla tejido ovárico. Los individuos homócigos para el alelo dominante *Tda-1* que posean el cromosoma "Y" de la cepa B6 o del *M. domesticus*, desarrollan exclusivamente tejido testicular.

Mediante un análisis genómico, se determinó la localización del *tda-1* en el extremo distal del cromosoma 4 y el *tda-2*, en la región central del cromosoma 2 (Eicher y col., 1996). Las mismas autoras hipotetizaron que los genes *Tda-1*, *Tda-2* y *Tas* son algunos loci involucrados en la ruta determinante del testículo. Sugieren que en las condiciones de reversión sexual en las que están comprendidos estos loci, esta ruta no se inicia de manera coordinada temporalmente para permitir el desarrollo testicular de la gónada de un individuo "XY".

Por otra parte algunos autores de manera independiente han encontrado diferencias en el cromosoma "Y" del *M. domesticus* (o *M. poschiavinus*) y en cromosoma "Y" del *M. musculus*:

a) Bishop y colaboradores (1985) mostraron que estas dos especies de ratón tienen diferentes patrones de hibridación y que las cepas A/J, Balb/c, C57BL/6, CBA/H, C3H, DBA/2J y 129/Sv poseen un cromosoma "Y" derivado del *M. musculus*, mientras que la cepa SJL tiene el cromosoma "Y" del *M. domesticus*. Cabe mencionar que estos investigadores compararon sus datos con otros en los que a partir del análisis del linaje materno se determinó que estas cepas de ratón son "híbridos" debido a que el ADN de las mitocondrias se origina del *M. domesticus* (Bishop y col., 1985).

b) Nagamine y colaboradores (1987) realizaron cruces entre machos B6.Y<sup>DOM</sup> con hembras SJL y no encontraron ninguna anomalía en el fenotipo sexual de la progenie; sin embargo, cuando se introdujo el cromosoma "Y" de las cepas SJL y AKR al genoma de hembras B6, se encontró la condición de reversión sexual semejante a la ocurrida en la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> en el 1% de los fetos que poseían un cromosoma "Y<sup>SJL</sup>" y en el 56% de los embriones con el cromosoma "Y<sup>AKR</sup>". En los fetos que contenían este último cromosoma "Y" se observó que los testículos afectados se recuperaban durante el desarrollo posterior, ya que en los adultos



no se detectó ningún hermafrodita, ni a nivel anatómico ni histológico. Los autores concluyeron que, a pesar de que las cepas SJL y AKR poseen el cromosoma "Y" del *M. domesticus*, el alelo para el gen *Tdy* o para otros genes de la ruta de determinación testicular, tiene(n) un origen distinto.

c) En 1994, Coward y su grupo analizaron los genes de diferentes cromosomas "Y<sup>DOM</sup>" para el *Sry* y mostraron que codifican proteínas más pequeñas que los alelos de las cepas B6 y 129 para el mismo gen. Además, encontraron una región polimórfica de tripletes, de las bases CAG, que se presenta únicamente en las cepas que ocasionan la reversión sexual y propusieron que los cambios producidos en la secuencia de aminoácidos en ese sitio, están asociados a la gama de fenotipos sexuales observados. Sin embargo, un análisis más detallado mostró que no hay una correlación entre el tamaño de la región polimórfica y la habilidad del cromosoma Y<sup>DOM</sup> para inducir la formación de testículos en la cepa B6. Concluyeron que las isoformas de la proteína SRY<sup>DOM</sup>, son funcionalmente equivalentes (Carlisle y col., 1996).

d) Por otro lado, Graves y sus Erickson (1992), también estudiaron secuencias del *Sry* de diferentes cepas y especies de ratón y observaron una sustitución no conservada de treonina por isoleucina, en la posición 61 en el cromosoma "Y" del *Mus musculus domesticus*. Demostraron que aparentemente esta variación no es suficiente para explicar el gradiente de reversión sexual observado cuando se transfiere este cromosoma a las hembras B6.

Originalmente, Eicher y Washburn (1986), propusieron que el *Tdy*<sup>ES</sup> inicia la ruta de la formación del testículo temporalmente más tarde que el *Tdy*<sup>ES</sup> y que la diferenciación del ovario, regulada por los genes autosómicos de la cepa B6, se inicia primero e impide la diferenciación testicular. Posteriormente, esta hipótesis fue apoyada por Palmer y Burgoyne (1991) quienes encontraron que el inicio del desarrollo testicular (tasa de crecimiento) en los fetos XY<sup>POS</sup> está retrasado (aproximadamente 14 horas) con respecto a los fetos XY<sup>DE</sup>. En el mismo año Taketo y sus colaboradores (1991) encontraron que el inicio de la diferenciación testicular en los ovotestis Y<sup>DOM</sup> está retardado en comparación con los testículos B6. En los ovotestis B6.Y<sup>DOM</sup> se observó una baja o nula inmunotinción para la MIS a los 12 dg., mientras que en los testículos controles B6, esta tinción es evidente en las células fetales de Sertoli. Sin embargo, se determinó que este retraso no se debe al efecto

de este cromosoma, sino que es resultado de la combinación de éste con el genoma de la cepa B6.

En 1994, Lee y Taketo examinaron la ontogenia de algunos de los genes que se sabe se transcriben durante las fases tempranas de la diferenciación gonadal, así como algunos de los genes implicados en la biosíntesis de esteroides. Encontraron que la expresión del *Sry* se inicia normalmente (10.5 d.g.), mientras que su inactivación se encuentra retrasada (12 d.g. normalmente en la cepa B6 y 13 d.g. a los 14 d.g. en todas las gónadas B6.Y<sup>DOM</sup>). Se concluyó que la ruta de determinación testicular en la gónada B6.Y<sup>DOM</sup> está deteriorada después de la transcripción del *Sry*.

En 1995, Eicher y Washburn realizaron una prueba de complementación genética en la que crearon un ratón B6.Y<sup>DOM</sup> transgénico con un fragmento de 14.6 kb aislado del cromosoma Y de la cepa 129 (de origen *Mus musculus musculus*) (Gubbay y col., 1990). Sus resultados mostraron que los fetos (14.5 a 16 d.g.) que contenían el transgen, a pesar de su sexo cromosómico, desarrollaban exclusivamente tejido testicular. Las autoras proponen que la parte del *Sry* responsable de la reversión sexual podría estar localizada fuera del fragmento de lectura de este gen, en el promotor u otro elemento regulatorio, ya que los tripletes repetidos propuestos por Coward y su grupo (CAG; 1994), sólo difieren por uno o dos entre ambos tipos de cromosomas "Y<sup>DOM</sup>" y "Y<sup>B6</sup>".

Por otra parte, Nagamine y Carlisle (1996) vieron que una mutación puntual, en el alelo para el oncogen "puntuado blanco dominante", *Kit*<sup>W<sup>42J</sup></sup>, potencia la reversión sexual B6.Y<sup>DOM</sup>. En los ratones B6 que poseen el cromosoma Y de la cepa AKR la penetración de esta característica es baja; sin embargo, si el cromosoma Y proviene de la cepa TIR, este gen aumenta la reversión sexual a un grado tal que la mayoría de la progenie XY, se desarrolla como hembras. La potenciación de la reversión sexual no está ligada a un retraso del crecimiento fetal temprano o a una reducción de la talla testicular. Mas aún, el análisis con RT-PCR cuantitativo para el *Sry* sugirió que tampoco es debido a un bloqueo de la expresión de este gen, ni a un retraso en el inicio de su expresión, ni a niveles bajos de ARNm. Los autores proponen que, por lo anterior, el *Kit*<sup>W<sup>42J</sup></sup> potencia la reversión sexual afectando un paso crítico en la diferenciación testicular posterior al *Sry*.

## **b) Desarrollo morfológico de la gónada**

El desarrollo de los ovarios XX normales de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> es semejante a aquel de los ovarios XX de la cepa B6. A partir de la generación N2 de retrocruzadas, una porción de los fetos "XY" se desarrolla como hermafroditas (poseen tejido ovárico y tejido testicular) y hembras "XY". Para la generación N6 de retrocruzadas, en los fetos "XY" se diferencian sólo ovotestis u ovarios; no se diferencian testículos normales (Eicher y col, 1982 y Eicher y Washburn, 1983).

Histológicamente, todas las gónadas fetales "XY" caracterizadas como testículos son ovotestis. A los 14 dg., se observa en éstos que sólo la parte testicular (zona central) lleva a cabo un engrosamiento; las regiones ováricas (cranial y caudal) permanecen generalmente elongadas; por consiguiente, los ovotestis tienen una forma ovalada. La túnica albugínea, que consiste de varias capas de células planas, está bien diferenciada en la región ocupada por túbulos seminíferos. Dentro de éstos, las CG's, que llevan a cabo la meiosis o que están detenidas en estadio de prospermatogonias, se encuentran agrupadas junto con las células fetales de Sertoli dentro de la membrana basal. Las regiones ováricas están cubiertas por una capa sencilla de epitelio superficial, carecen o poseen túbulos seminíferos poco diferenciados; estas regiones presentan frecuentemente un arreglo en cordones. Algunas CG's han iniciado la profase meiótica I mientras que otras continúan en la fase mitótica del ciclo celular; estas son estructuras características de la diferenciación de un ovario (Nagamine y col., 1987). Para el día 15 de gestación, las regiones caudal y cranial de los ovotestis se localizan en la periferia y cerca de la frontera mesonefros-gónada. En estas zonas, se observan células meióticas que indican el desarrollo en ovocitos; algunas de estas células también se han observado en túbulos seminíferos que limitan las regiones ováricas. De los 16 a los 18 dg., la túnica albugínea de los ovotestis ha segregado parcialmente las regiones ováricas del resto de la gónada. Los ovotestis con un porcentaje mayor de túbulos seminíferos (es decir, aquellos con mayor fenotipo testicular) presentan una mayor segregación del tejido ovárico que aquellos ovotestis con pocos túbulos seminíferos y sólo la región cranial es segregada. El día 18 de gestación, la región cranial se localiza en la parte anterior de la *rete testis* en desarrollo y se observan menos células germinales meióticas, lo que hace difícil la identificación del tejido ovárico (Nagamine y col., 1987).

Los ovarios XY estudiados hasta la fecha son gónadas contralaterales a un "testículo" o un ovotestis. En etapa fetal, éstos son similares a los ovarios fetales normales entre los 12 y los 16 dg. en lo que respecta al desarrollo de los cordones sexuales, la presencia de células germinales meióticas y la ausencia de túbulos seminíferos. A los 16 dg., ambos ovarios contienen células germinales, la mayoría de ellas se encuentran en los estadios de cigóteno o paquíteno de la profase meiótica y están distribuidas en todo el ovario. A diferencia de los ovarios XX, en los ovarios XY de los 17 a los 19 dg., se ha observado que los ovocitos de la región medular degeneran, mientras que aquellos de la corteza permanecen. Ultraestructuralmente, se ha determinado que los ovocitos que han degenerado presentan complejos sinaptonémicos. A pesar, de que se ha visto que la pérdida de ovocitos es normal durante el desarrollo del ovario, se ha propuesto que es la presencia del cromosoma "Y" en las células epiteliales, la que no permite un desarrollo normal de la región medular. Se ha observado que las células epiteliales de la región medular son indistinguibles ultraestructuralmente de aquellas de la corteza pero es evidente que la interacción de éstas con los ovocitos en las diferentes regiones del ovario XY es distinta (Taketo y col., 1989).

## 5. El factor de crecimiento semejante a insulina tipo II

### a) Aspectos moleculares y bioquímicos del IGF-II

Los factores de crecimiento semejantes a insulina (IGF's) se identificaron en el suero humano. Poseen semejanza estructural y funcional con la insulina, la cual está formada por una cadena sencilla, constituida por 2 subunidades (A y B) que se unen mediante enlaces disulfuro por un péptido C, el cual es cortado de la prohormona para su liberación. Más del 45% de los aminoácidos de las cadenas A y B de los IGF's se encuentran localizados en la misma posición que en la molécula de insulina; sin embargo, las cadenas C y D de los IGF's son exclusivas de éstos. Los modelos tridimensionales de estas 3 moléculas, muestran que tienen diferentes dominios antigénicos (Zapf y Froesch., 1986).

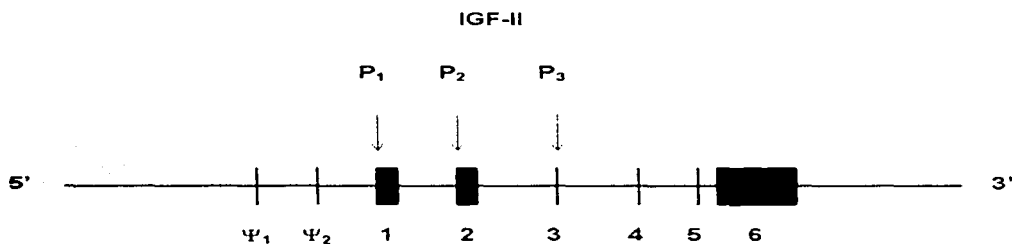
Los IGF's pueden dividirse en dos grupos: el IGF-I o IGF básico, anteriormente denominado somatomedina C y el IGF-II o IGF neutral (también designado como MSA en la rata). El IGF-I está formado por una cadena sencilla de 70 aa, tiene un peso molecular de 7,646 daltones; el IGF-II, constituido por una cadena de 67 aa, posee un peso molecular de

7,471 daltones. Tanto la insulina como los IGF's, son secretados en forma de grandes precursores inactivos y se han identificado receptores específicos para estos. El receptor para el IGF-I está compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$  y une al IGF-I, al IGF-II y a la insulina con afinidades decrecientes en este orden. Las subunidades  $\beta$  poseen la actividad de cinasa de tirosina dependiente de IGF, mientras que las subunidades  $\alpha$  contiene los sitios de unión. Se ha propuesto que este receptor es el transductor de las acciones mitogénicas a través de la fosforilación de tirosinas (Nissley y Lopaczynski., 1991). El receptor para el IGF-II es un péptido de cadena sencilla que une al IGF-II con mayor afinidad que al IGF-I y es incapaz de unir a la insulina; aparentemente no participa en la transducción de las señales mitogénicas del IGF-II y se ha propuesto que su función principal es la de unir a su ligando con el objetivo de degradarlo (Sklar y col. 1989). Al bloquear este receptor con anticuerpos, en cultivos de varios tipos celulares, el efecto mitogénico del IGF-II no se inhibió, mientras que si se inactiva el receptor para IGF-I, se anula la función del IGF-II. Como consecuencia, se propone que los efectos de ambos IGF's son mediados por el receptor para el IGF-I. Así mismo, se determinó que además el IGF-II interactúa con otro receptor, desconocido hasta el momento, debido a que el efecto sobre el crecimiento en dobles mutantes para el receptor del IGF-I y para el IGF-II, es más severo que para cualquiera de estas dos mutaciones por separado (Liu y col., 1993). Posteriormente, el análisis de la cinética de crecimiento de los embriones con estas mutaciones, mostró que en el período de los 11 a los 12.5 d.g. el receptor para el IGF-I funciona solamente para transmitir las señales mitogénicas del IGF-II y posteriormente desde los 13.5 d.g., este receptor interactúa con ambos ligandos (I y II) mientras que el IGF-II es reconocido como se mencionó anteriormente por otro receptor desconocido.

Por otra parte, en estudios realizados con fibroblastos embrionarios provenientes de mutantes que carecen del receptor para IGF-I se observó que el ciclo celular es 2.5 veces más largo que lo normal (Sell y col., 1994). Lo anterior indica que este sistema de señales es un determinante del crecimiento importante en cuanto a que afecta la velocidad de divisiones celulares y consecuentemente, el número total de células.

El gen del IGF-II de ratón se encuentra localizado físicamente en el extremo distal del autosoma 7. Se extiende aproximadamente sobre 12 kb en dirección 3' al gen de insulina, presenta la misma polaridad de transcripción y contiene seis exones. Los tres

primeros codifican para regiones 5' que no se traducen y son transcritas, a partir de tres promotores diferentes, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub>, como tres ARNm para IGF-II con una secuencia 3' que no traduce. Los promotores P<sub>1</sub> y P<sub>2</sub> contienen una caja TATA que aparentemente dirige la transcripción a partir de un sólo sitio de inicio. En contraste, el exón 1 tiene tres sitios para el inicio de la transcripción distribuidos sobre 556 nucleótidos y carece de región TATA o de otra secuencia típica que controle la transcripción. Los exones 4 a 6 codifican para el precursor del IGF-II de 180 aa y el exón 6, contiene una región 3' de 3,045 nucleótidos que no se traduce y que termina en un sitio único de poliadenilación. Además de estos seis exones funcionales se identificaron dos regiones 5' las cuales, aparentemente, son remanentes conservados evolutivamente de dos exones del IGF-II humano (Rotwein y Hall 1990) (Esquema 2 y Tabla 1).



Esquema 2. Locus para el gen IGF-II en el cromosoma 7 del ratón. Los símbolos P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub> y P<sub>3</sub> indican los sitios promotores de transcripción; la letra griega  $\Psi$  denota los regiones conservadas, pero no funcionales en el ratón y los números corresponden a los seis exones funcionales en el ratón.

A través de experimentos de interrupción génica DeChiara y colaboradores (1990), demostraron a nivel fenotípico y transcripcional que sólo el alelo paterno de este gen se expresa. Así mismo, se determinó también que exclusivamente la copia materna del gen para el receptor de IGF-II se transcribe (Filson y col., 1993).

Tabla 1. Organización del gen del IGF-II del ratón

Número de exón	Tamaño del exón (pb)	Tamaño del intrón (Kb)
1	371,630,927	5.35
2	1,113	2.6
3	93	1.95
4	163	1.13
5	149	0.24
6	3,281	-

Evolutivamente parece probable que los IGF's y la insulina se originaron a partir de una molécula ancestral común. Se asume que una duplicación génica originó las moléculas de la proinsulina y una molécula primitiva de IGF y una duplicación subsecuente formó al IGF-I y al IGF-II. Se propone que la primera duplicación ocurrió antes de la aparición del primer vertebrado (hace más de 600 millones de años) y la segunda duplicación tuvo lugar hace 300 millones de años antes de los primeros mamíferos (Blundell y Humbel, 1980 y Zapf y Froesch, 1986 ).

#### b) Funciones

Las acciones de los IGF's en una gran variedad de tipos celulares consisten en estimular el crecimiento y la diferenciación. El hígado es la mayor fuente de IGF's circulantes en el humano, pero en el ratón adulto se mostró que este órgano no produce IGF-II (Stempien y col., 1986). Por otra parte, se piensa que la producción local es importante en la regulación del crecimiento y diferenciación en diferentes tejidos. Los IGF's están presentes en el torrente sanguíneo y pueden detectarse también en el plasma. Los patrones de síntesis de estos péptidos, predicen que los niveles más altos del IGF-II se encuentran en la vida embrionaria y disminuyen después del nacimiento (Adams y col., 1983). La inducción de la diferenciación de las células del músculo esquelético *in vitro* por el suero, está asociada

con el aumento del mensajero para el IGF-II y su receptor (Florini y col., 1991). También se ha propuesto que los IGF's podrían funcionar como reguladores autócrinos en el crecimiento tumoral (Macaulay , 1992) a través de la inducción de la expresión de proto-oncogenes, los cuales están íntimamente asociados a los procesos de proliferación y diferenciación celular (Merriman y col., 1990).

El IGF-II se expresa durante el desarrollo embrionario de los mamíferos en una gran variedad de diferentes tejidos. Sin embargo, su expresión persiste en el adulto sólo en las células epiteliales que delimitan la corteza cerebral y en músculo estriado (Gray y col., 1987 y Haselbacher y col., 1985). Además, se han detectado varias formas de la proteína, que difieren por pocos aminoácidos, las cuales son el resultado de eventos de regulación transcripcional y postranscripcional (Soares y col., 1985; Stylianopoulou y col., 1988). Recientemente, usando la técnica de RT-PCR, fue posible demostrar la presencia de transcritos para el IGF-II y para su receptor en embriones de ratón de 2 células (Heyner y col., 1989). Independientemente, Lee y sus colaboradores (1990) examinaron el patrón de expresión del IGF-II en secciones de ratón de 4 a 8.5 d.g. mediante la técnica de hibridación *in situ*. Ellos detectaron transcritos en derivados del trofoctodermo después de la implantación; en el endodermo primitivo posterior a la formación del saco vitelino y en el mesodermo extraembrionario. Las señales detectadas propiamente en el embrión, sugieren que corresponden a las células que darán origen al corazón, a las paredes laterales y ventrales del intestino anterior y se observó una señal intensa de marcado en la cresta neural. El análisis inmunohistoquímico mostró la colocalización de transcritos para este gen con la prehormona y su receptor y sugiere que esta correlación es consistente con la hipótesis de la acción autócrina del IGF-II.

Otra característica importante de estos factores es el hecho de que no se encuentran libres en el plasma, sino asociados a un grupo especial de proteínas de unión. Al menos se han identificado 6 especies distintas de éstas, las cuales muestran patrones de expresión dependientes del tejido y del estadio de desarrollo. La función de éstas no ha sido totalmente aclarada. *In vitro*, las proteínas de unión pueden potenciar o inhibir la acción biológica de los IGF's libres, lo cual sugiere que alguna de sus funciones podría ser restringir la disponibilidad de los IGF's activos en la circulación o localmente dentro de los tejidos, hasta que el complejo IGF-proteína de unión sea separado (Elgin y col., 1987). Por otra parte, los IGF's



*in vitro*, han mostrado ser mitógenos débiles en sentido estricto; sin embargo, la importancia biológica del IGF-II para el crecimiento de un organismo se evidenció mediante la inactivación genética de este gen en el ratón. Estos animales mostraron un crecimiento fetal y postnatal reducido, así como una masa corporal menor, comparada con aquella de los animales controles. El IGF-II juega un papel importante en el crecimiento de los tejidos en todo el organismo e indica que la acción de los factores de crecimiento es mucho más compleja que lo que se deduce a partir del análisis del crecimiento celular en cultivo (DeChiara y col., 1990).

Adams y colaboradores (1983) mostraron que en cultivos de fibroblastos, la síntesis del IGF-II es inducida por un lactógeno placentario y no por la hormona de crecimiento y proponen que éste puede regular el crecimiento fetal. Mientras que la síntesis de IGF-I en el hígado es regulada principalmente por la hormona de crecimiento, se desconoce(n) el mecanismo(s) regulador(es) de la expresión del IGF-II en general (Adashi y col., 1985b).

### c) Papel en la esteroidogénesis

En el fluido folicular obtenido del medio de cultivo condicionado para las células de la granulosa y por el análisis de los niveles de mensajeros ováricos, se ha observado que ambos IGF's son sintetizados en el ovario del cerdo (Hammond y col., 1991 y Mondschein y col., 1989). En el humano, la localización de estos péptidos y de sus transcritos ha mostrado que el IGF dominante en el ovario es el IGF-II (Ramasharma y Li, 1987 y Voutilainen y Miller, 1987). En contraste, Oliver y colaboradores (1989) y Hernandez y colaboradores (1989), sugieren que en el ovario de rata el IGF-I es el dominante.

Por otra parte, en la cepa de ratón B6.Y<sup>DOM</sup>, Villalpando y sus colaboradores (1996) encontraron transcritos para el IGF-I en el ovario normal (XX) desde el día 1 de nacimiento, mientras que en el ovario XY, el mensajero para este gen se detectó hasta los 15 d.p.p. La proteína para IGF-I se localizó en las células de la teca de todo el ovario XX; en contraste, ésta sólo se observó en las células de la teca de la corteza del ovario XY y en los cordones medulares estériles, la tinción fue muy débil.

En el humano se demostró que si se estimulan las células de granulosa con gonadotropinas se incrementan los mensajeros para IGF-II (Voutilainen y Miller, 1987). Estas células, las células adrenales fetales y las células de la placenta, acumulan el mensajero

para este gen, así como también transcritos para la enzima 20,22-desmolasas como respuesta al AMPc y a las gonadotropinas, a través de mecanismos independientes de la hormona de crecimiento, prolactina o de las hormonas esteroides. En contraste, lo anterior no ocurre en el testículo fetal humano, aunque éste, al igual que el ovario, contiene cantidades considerables de ARNm para IGF-II. Al incubar los testículos fetales con AMPc aumentan los transcritos para las enzimas 20,22-desmolasas y la 17 $\alpha$ -hidroxilasa, pero no para IGF-II (Voutilainen y Miller, 1988). La diversidad en la expresión de estos péptidos en la gónada de las diferentes especies y bajo condiciones experimentales variables resulta sumamente interesante, mientras que su importancia como reguladores en la formación de la gónada no se ha aclarado totalmente.

Las acciones de los IGF's y de la insulina en el ovario son también mediadas por los receptores antes mencionados (Baranao y Hammond, 1984; Poretsky y col., 1985 y Davoren y col., 1986). El receptor tipo I es inducible por gonadotropinas y por esteroides gonadales, por lo que es potencialmente un punto de control importante (Adashi y col., 1986). Después de unirse al receptor, los IGF's estimulan el crecimiento y la diferenciación de las células del ovario. El crecimiento predomina cuando estos péptidos se emplean solos o en combinación con otros factores de crecimiento mientras que en presencia de gonadotropinas o de AMPc, predomina la diferenciación celular (Hammond y English, 1987 y Hammond y col., 1989).

La insulina y los IGF's potencian la diferenciación de las células de la granulosa y de la teca (Barbieri y col., 1986 y Cara y Rosentfield, 1988). El IGF-I estimula la proliferación de las células de la granulosa en los bovinos; ambos IGF's incrementan la incorporación de timidina y promueven la secreción de progesterona en los cultivos de células de la granulosa de los cerdos. Hasta el momento, la insulina y los IGF's son aparentemente esenciales para que se lleven a cabo las acciones de la FSH sobre las células de la granulosa (Adashi y col., 1985b y Hammond y col., 1989). Algunos eventos de la biosíntesis de esteroides posibilitados por estos péptidos, incluyen la internalización y el procesamiento de las enzimas 20,22-desmolasas (Veldhuis, 1989) y la aromatasas (Adashi y col., 1985a; Davoren y col., 1985 y Veldhuis, 1989). Baranao y Hammond (1984) mostraron que los efectos de los IGF's en la secreción de la progesterona son demostrables en conjunto con las gonadotropinas. En contraste, los efectos en la síntesis de otros esteroides han sido

**probados en la ausencia de gonadotropinas. Así mismo, la interacción sinérgica de las gonadotropinas y los IGF's fue observada (Hammond y col., 1991 y Veldhuis , 1989).**

Los efectos del IGF-II sobre la proliferación y la diferenciación de las células de la granulosa de cerdo y humano fueron estudiados en cultivo por Kamada y su grupo (1992). Este péptido incrementa la secreción basal de progesterona y estradiol por parte de este tipo celular y aumenta de manera dosis dependiente la incorporación de timidina tritiada así como la acumulación de AMPc. Estos autores sugieren que el IGF-II podría ser un estimulador general de la proliferación y la diferenciación de las células de la granulosa y que el AMPc podría actuar como segundo mensajero.

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

La diferenciación sexual gonadal en los mamíferos es el resultado de un conjunto de eventos morfogénéticos y bioquímicos, los cuales deben ocurrir de manera ordenada durante el desarrollo embrionario. La diferenciación testicular es determinada por la presencia del gen *Sry*, el cual aparentemente codifica para un factor de transcripción que regula a su vez la expresión de otros genes para dar como resultado la diferenciación testicular completa, pero ésta no se ha explicado en su totalidad. Por otra parte, cuando el cromosoma "Y" de la cepa de ratón *M. musculus domesticus* se transfiere a la cepa B6 la mitad de la progeñe XY forma exclusivamente ovotestis y ovarios en la vida embrionaria. Una herramienta útil para identificar los genes que participan en la secuencia de eventos que conllevan a la diferenciación sexual gonadal, es el análisis genético-molecular de diferentes condiciones de reversión sexual, como es el caso del ovario B6.Y<sup>DOM</sup>. En éste los ovocitos de la zona central degeneran desde los 17 d.g. y se ha propuesto que lo anterior ocurre debido a una falla en el ovario; como consecuencia, la hembra XY es estéril. Así mismo, se ha observado que los factores de crecimiento son reguladores clave de la embriogénesis y funcionan como señales autócrinas o parácrinas; sin embargo, se ha estudiado poco su papel antes y después de la diferenciación sexual de la gónada. Se han identificado algunos reguladores intraováricos, como los factores de crecimiento semejantes a insulina. En la etapa postnatal, se ha pensado que la acción local de los IGF's en el ovario es la de amplificar la acción de las gonadotropinas permitiendo la sobrevivencia del folículo hasta el momento de la ovulación. Así mismo, se han detectado transcritos para el IGF-II y para su receptor en el ovario de otras especies de mamíferos y su importancia se ha evidenciado en el crecimiento y diferenciación de los diferentes tipos celulares que forman la gónada adulta. Sin embargo, el papel del IGF-II en el desarrollo gonadal del embrión de ratón no se ha estudiado. En base a los antecedentes planteados se decidió estudiar la expresión del IGF-II durante la morfogénesis gonadal del ratón B6.Y<sup>DOM</sup>.

#### HIPÓTESIS

El IGF-II podría participar en los procesos de proliferación y diferenciación de las células somáticas en el desarrollo gonadal, así como en el inicio de la formación de los folículos en el ovario XX y XY en fase embrionaria. Además podría ser uno de los genes cuya expresión fuese modulada por diversos factores, como el *Sry* en el ovario XY.

#### **IV. OBJETIVOS**

- 1. Investigar si la expresión del ARNm del IGF-II cambia durante el desarrollo embrionario (10.5 a 16 d.g.), antes y después de que ocurra la diferenciación sexual gonadal y antes de que el ovario XY empiece a perder las células germinales primordiales.**
- 2. Determinar si existe una relación temporal en la expresión del factor de crecimiento semejante a insulina tipo II y el factor determinante del testículo *Sry*, en las gónadas embrionarias del ratón B6.Y<sup>DUM</sup>, desde los 10.5 a los 12 d.g.**
- 3. Emplear como control el gen que codifica para la proteína constitutiva Hprt.**

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

### 2. Animales

Se utilizaron ratones de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> pertenecientes a la colonia de la Dra. Irma Villalpando Fierro del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de luz-oscuridad en periodos de 12 horas (6 a.m. a 6 p.m.) y fueron alimentados con Mouse Diet 5051 de Lab Diet (PMI Feeds Inc.). La temperatura promedio fue de 18° a 23° C.

### 3. Obtención de los ratones B6. Y<sup>DOM</sup>

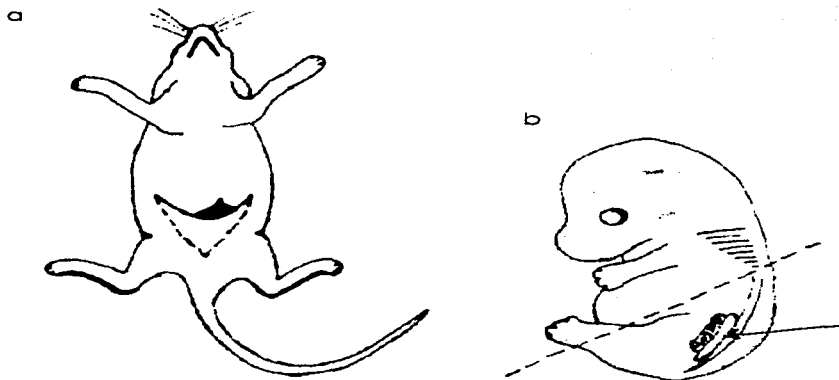
Se transfirió el cromosoma "Y" de ratón de la especie *Mus musculus poschiavinus* (POS) o *Mus musculus domesticus* (DOM) al genoma de la cepa de ratón B6, empleando el método de retrocruza tradicional, hasta la generación 57. Los individuos de éstas fueron designados como B6. Y<sup>DOM</sup> o B6.Y<sup>POS</sup>. En cada jaula se colocó un macho B6.Y<sup>POS</sup> con tres hembras de la cepa B6, de 5 a 7 semanas *post partum*.

Los ovarios XX se emplearon como controles, debido a que su desarrollo es igual al de los ovarios XX de la cepa B6.

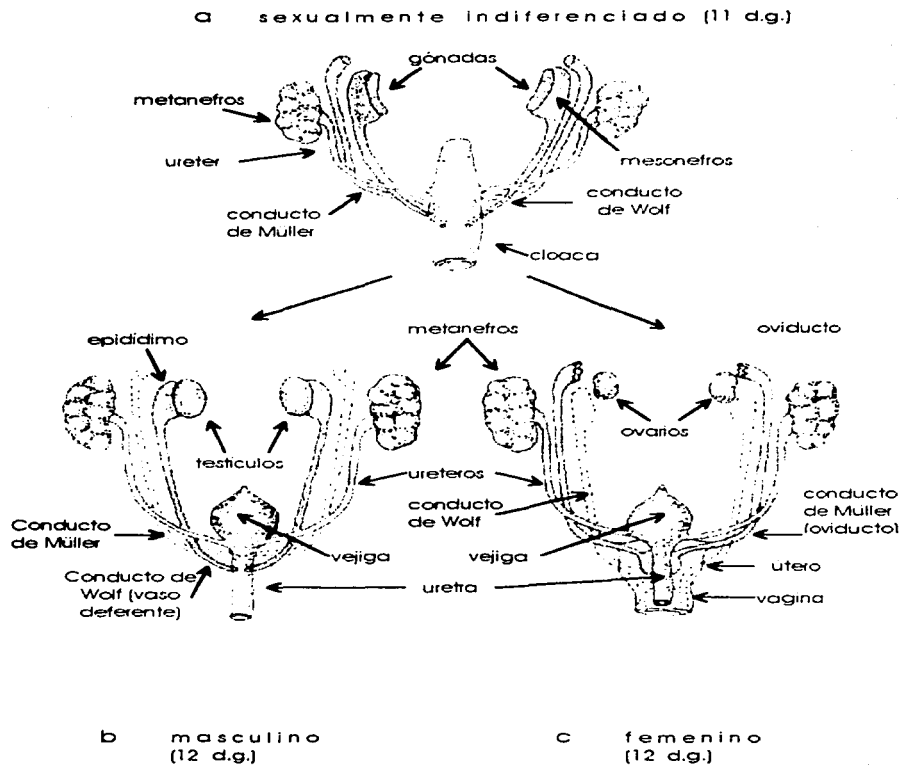
### 4. Determinación de la edad de gestación

El d.g. se estableció por la presencia de tapones de copulación y el día en que se visualizó éste se consideró como día cero de gestación. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical, después se les aplicó en el abdomen una solución de benzal:etanol (1:1) y se realizó rápidamente un corte en "v" para extraer los embriones (Esquema 3-a). Éstos se colocaron en una caja de Petri estéril con medio MEM (Medio mínimo esencial de GIBCO) pH= 7.0.

A cada embrión se le practicó un corte diagonal que abarcó la región media caudal de tal manera que se expusiera el sistema urogenital (Esquema 2-b). Posteriormente, se aislaron los complejos urogenitales (conjunto de células que formarán la gónada unido al mesonefros) de embriones de 10.5 a 12 d.g. y las gónadas de aquellos de 14 y 16 dg. (Figura 3). Los tejidos fueron congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  (1 a 4 meses) hasta la extracción del ARN total. El estadio de desarrollo de los embriones se confirmó empleando el criterio de desarrollo del miembro (posterior) establecido por McLaren y Buehr (1990).



Esquema 3. a) Hembra B6 mostrando la cavidad abdominal donde se encuentran los embriones y b) Embrión de la cepa B6.Y<sup>-DOM</sup> señalando la ubicación dorsal de la gónada y el mesonefros adyacente (flecha).



**Esquema 4. Desarrollo del tracto reproductor de los roedores.**



## 5. Identificación del sexo genético de los embriones

### a) Marcado de la sonda del cromosoma "Y" con P<sup>32</sup>-dATP

Se marcaron 300 ng de la sonda 145SC5, dirigida contra secuencias repetidas específicas del cromosoma "Y" (Nishioka y Lamothe, 1986 y Nishioka, 1988), por el método de Random Primers según el protocolo recomendado por GIBCO BRL. La sonda se desnaturalizó en baño de María por 5 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Se adicionaron secuencialmente: 2 µl de la solución de dCTP, dGTP, dTTP, 15 µl del amortiguador de Random Primers, 5 µl (aproximadamente 50 µCi) de dATP(-P<sup>32</sup>) y agua destilada para llevar a un volumen total de 49 µl; se mezcló brevemente. Se agregó 1 µl del fragmento Klenow, se agitó brevemente y se incubó a temperatura ambiente, 2 horas. La reacción se detuvo con 5 µl del amortiguador de paro.

La radioactividad incorporada, representada por el número de cuentas por minuto se determinó con un contador de centelleo líquido (Technical Associates, modelo PUG 1AB). En 158 µl se detectaban de 20 a 40 x 10<sup>6</sup> cpm, aproximadamente.

### b) Prehibridación

Se prepararon membranas (Gene Screen Plus Hybridization Transfer nylon membranes, cargadas positivamente) con el extracto de hígado de cada embrión de ratón B6.Y<sup>DOM</sup> parcialmente digerido con SDS al 10% y proteinasa K (degrada proteínas). Se hornearon al vacío 2 horas, a 80°C, se desnaturalizaron con una solución de NaOH 0.4N y NaCl 0.5M durante 60 minutos y se neutralizaron con TRIS 1M pH= 7.0, 60 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se secaron completamente bajo una campana de extracción sobre una superficie limpia y se prehibridó en una solución de hibridación que contiene formamida al 50%, sulfato de dextrán al 25%, NaCl 1M y SDS al 0.5%. Se agregaron 0.2 ml a cada 10 ml de la solución de hibridación de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml, desnaturalizado previamente a 95° C. 10 minutos). Se incubaron 18 horas a 42°C dentro de bolsas selladas contenidas en recipientes de lucita, debidamente identificadas.

### **c) Hibridación**

Se desnaturalizó la sonda marcada en baño María a 95°C 10 minutos y se enfrió inmediatamente en hielo. Por cada 10 ml de solución de hibridación se añadieron aproximadamente  $1 \times 10^6$  cpm. Se incubó por 18 horas a 42°C en bolsas de plástico selladas y etiquetadas dentro de recipientes de lucita. Se lavó dos veces con SSC 1X y SDS al 0.5% (Sambrook y col., 1989) a 60°C durante 25 minutos. Se verificó con un contador de centelleo manual la presencia de radioactividad.

### **d) Autoradiografía**

Las membranas se expusieron a una película (KODAK, X-OMAT, XK-1) dentro de un cassette para autoradiografía, utilizando dos pantallas intensificadoras de DuPont y se incubaron un día a -70°C. Las autoradiografías se revelaron empleando un revelador de KODAK (D-19) 5 minutos, se lavaron con agua corriente 5 minutos y se fijaron con un fijador rápido de la misma casa fotográfica, 5 minutos.

## **5. Obtención del ARN total**

Se empleó la técnica de extracción de ARN total con tiocianato de guanidina reportada por Chomezynski y Sacchi (1987). Los tejidos se homogenizaron con 100 µl de la solución "D". Posteriormente, se adicionaron los siguientes reactivos de manera secuencial por cada par de gónadas: 10 µl de acetato de sodio 2M pH= 4.0; 100 µl de fenol saturado con agua y 20 µl de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Después de agregar cada uno se mezcló ligeramente en un vortex 10 segundos y se incubó a 4°C durante 15 minutos.

Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm, 20 minutos a 4°C en una centrifuga Eppendorf modelo 5402. Se transfirió la fase acuosa a tubos Eppendorf en frío y se adicionaron 100 µl de isopropanol (-20°C). Después de agitar cada muestra 10 segundos con la mano, se precipitó a -20°C una hora ó a -70°C media hora. Se centrifugó bajo las condiciones anteriores y el botón obtenido se resuspendió en 30 µl de la solución "D". Se agregó el mismo volumen de isopropanol y se precipitó como se mencionó anteriormente. Los tubos se centrifugaron nuevamente y se decantó el sobrenadante. Se lavó con 100 µl de

etanol al 75% (-20°C) y se centrifugó 10 minutos. Se repitió una vez más el lavado y cuando fue necesario, dos veces. Las muestras se colocaron en un desecador media hora a temperatura ambiente o a -20°C, toda la noche. El ARN total de cada tubo se resuspendió en 3 µl de agua estéril filtrada tratada con DEPC y se almacenó a -70°C (12 a 24 horas).

Para amplificar los ARNm del IGF-II, utilizamos el ARN total extraído de un par de complejos urogenitales o de gónadas (según la edad) y para amplificar el ARNm del *Sry*, empleamos el ARN total de grupos de 6 pares de complejos urogenitales o de gónadas (Koopman y col., 1991).

Para corroborar la técnica de RCP-TR usamos el ARN total de un par de complejos urogenitales (11.5 d.g.) o gónadas (16 d.g.) de ambos sexos genéticos, para amplificar el ARNm de la enzima constitutiva Hipoxantina (guanina)-fosforribosil-transferasa (Hprt). Esta proteína participa en la recuperación de las purinas libres en los vertebrados, las cuales son reutilizadas en la biosíntesis de los nucleótidos y de los ácidos nucleicos (Francke y Taggart, 1980; Melton y col., 1981; Melton y col., 1984).

## 7. Reacción en cadena de la polimerasa

### a) Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la Unidad de Análisis y Aminoácidos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Los oligonucleótidos que empleamos para analizar la expresión del ARNm del IGF-II se diseñaron de acuerdo al ADNc de ratón correspondientes al IGF-II. Utilizamos dos grupos de oligonucleótidos para la RCP-TR, los cuales denominamos para mayor claridad como: IGF-II-A e IGF-II-B (Esquema 5). Cada par tiene 18 pb y delimitan, respectivamente, un fragmento de 429 pb y uno de 153 pb (Stempien y col., 1986):

IGF-II-A:

(Sentido) 5'-3'

ATG-TTG-GTG-CTT-CTC-ATC

(Antisentido) 5'-3'

CTC-TCT-GAA-CTC-TTT-GAG

## IGF-II-B:

(Sentido) 5'-3'

GGA-GGG-GAG-CTT-GTT-GAC

(Antisentido) 5'-3'

ACA-GTA-TGT-CTC-CAG-GAG

Para el gen *Sry* los oligonucleótidos empleados se sintetizaron de acuerdo a los usados por Gubbay y colaboradores (1990):

(Sentido) 5'-3'

CTG-GTG-ACA-ATT-GTC-TAG-AG

(Antisentido) 5'-3'

TGT-GGG-TTC-CTG-TCC-CAC-TG

Para la enzima Hprt los oligonucleótidos se elaboraron en base a los utilizados por Lee y Taketo (1994):

(Sentido) 5'-3'

CCT-GCT-GGA-TTA-CAT-TAA-AGC-ACT-G

(Antisentido) 5'-3'

GTC-AAG-GGC-ATA-TCC-AAC-AAC-AAA-C

El tamaño esperado producido por la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa para el *Sry* fue de 349 pb y para la Hprt fue de 352 pb.

Para cada edad y sexo se realizaron tres repeticiones como mínimo, con respecto a ambas formas del IGF-II y a la enzima Hprt. Para el gen *Sry*, se realizó solamente una repetición para cada edad, debido a que su expresión fue previamente publicada en la cepa B6.Y<sup>DOM</sup> (Lee y Taketo, 1994).

### b) Elaboración del ADNc con transcriptasa reversa

El ARN total se desnaturalizó 5 minutos a 99° C en un termociclador marca Perkin Elmer Cetus (modelo 9600) y se colocó 10 minutos a 4° C. Se preparó una mezcla maestra que contenía 4 µl de solución de MgCl<sub>2</sub>, 2 µl de amortiguador II PCR 10X, 2 µl de cada solución de d(NTP's) (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), 1 µl del inhibidor de RNAsas y 1 µl de

agua-DEPC al tubo control y 1  $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa al tubo experimental. El volumen final por tubo fue de 20  $\mu$ l.

Se incubó en un termociclador marca Perkin Elmer Cetus, modelo 9600 con un ciclo de 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 99°C. Posteriormente los tubos se colocaron a 4° C.

### **c) Amplificación en cadena de la polimerasa**

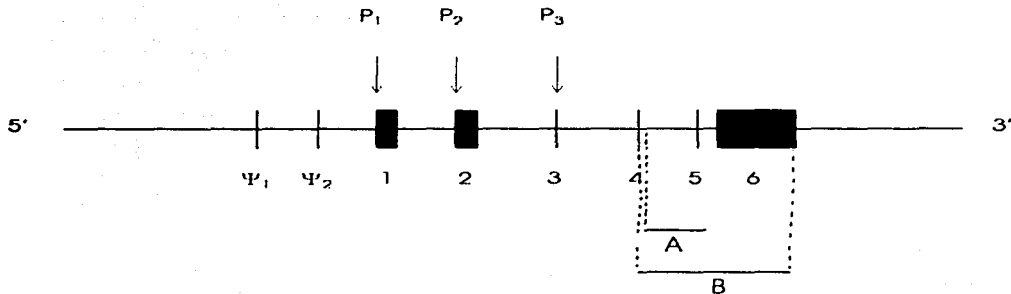
Este proceso consta de tres eventos fundamentales:

1. La desnaturalización a 94°C.
2. El alineamiento de los oligonucleótidos sintéticos iniciadores en cada una de las hebras (en dirección 3' - 5') a 55°C.
3. La extensión o síntesis de ADNc a 72°C.

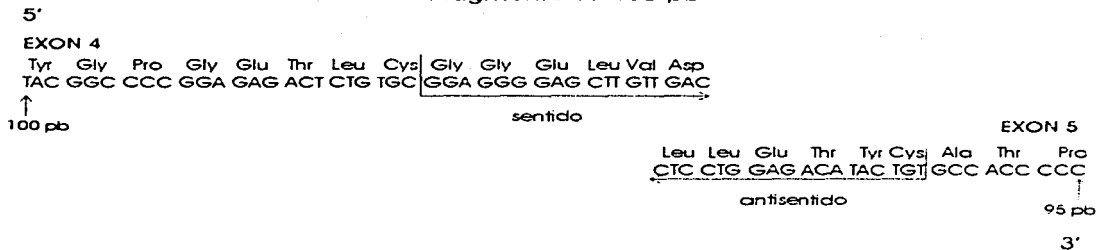
El conjunto de estos tres, constituye un ciclo de reacción. Posteriormente, se realizaron 29 ciclos más. Cada ciclo genera un cierto número de copias iguales al ADN que delimita cada oligonucleótido iniciador, las cuales son los siguientes moldes para formar nuevas copias (Erlich, 1991).

Para amplificar cada segmento, se agregó a cada tubo una mezcla de 4  $\mu$ l de la solución de MgCl<sub>2</sub>, 8  $\mu$ l del amortiguador II PCR 10X, 0.5  $\mu$ l de la enzima Taq ADN Polimerasa, un volumen correspondiente a 40 picomoles de cada oligonucleótido sintético y un volumen de agua-DEPC para alcanzar un volumen final de reacción que, junto con los 20  $\mu$ l iniciales de ADNc, es igual a 100  $\mu$ l.

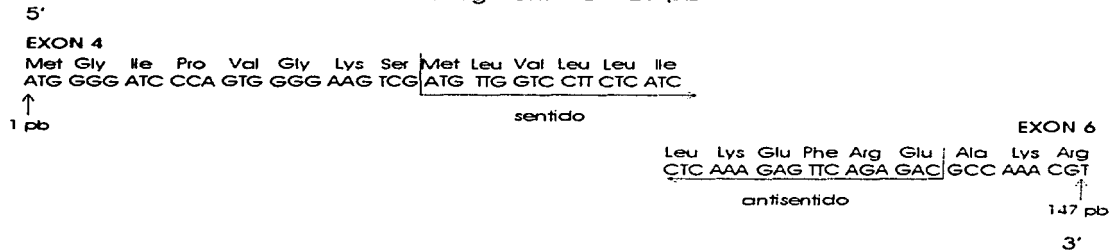
## IGF-II



### Fragmento A 153 pb



### Fragmento B 429 pb



**Esquema 5.-** Diseño de los oligonucleótidos para el IGF-II. Las flechas **enmarcan** las 18 bases que constituyen cada oligonucleótido. Se inicia la posición de las bases en los respectivos exones.

#### **d) Visualización de los productos amplificados**

Para determinar la presencia de los productos amplificados se prepararon geles de agarosa al 2% con amortiguador TBE 1X, pH= 8.0. Se empleó el marcador de peso molecular pBR 322 digerido con la enzima Hinf-1, del cual se tomaron 6  $\mu$ l y se mezclaron con 12  $\mu$ l de un amortiguador de carga. De esta mezcla se tomaron 7  $\mu$ l y se aplicaron al pozo del gel.

De cada tubo se tomaron 10  $\mu$ l del producto de la amplificación y se mezclaron con 5  $\mu$ l de amortiguador de carga y se colocó en el pozo del gel. Se realizó una electroforesis agregando amortiguador TBE 1X pH= 8.0 a 100 volts, 2 horas a temperatura ambiente. Cada gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.8% en agua destilada durante 10 minutos. Se lavó con agua destilada brevemente y los productos amplificados se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca Sigma (modelo T1202).

#### **e) Fotografías**

Los geles se fotografiaron con un Foto/Eclipse (FOTODYNE) y se imprimieron en papel térmico para la impresora Mitsubishi copy processor V.C.P. P67V modelo K65H.

## VI. RESULTADOS

### 1. Detección del sexo cromosómico

Las membranas empleadas en la técnica de hibridación en punto para determinar el sexo genético de los embriones, permitieron identificar a los embriones XY con claridad de manera rápida (24 horas) (Figura 1).

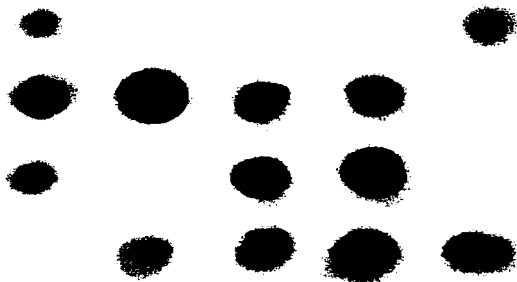


Figura 1. Se muestra una membrana de hibridación en la que los puntos oscuros corresponden al extracto hígado de los individuos XY y los espacios en blanco que permanecieron sin señal, a los embriones XX.



## 2. Expresión del ARNm para IGF- II

### a) IGF-II-A

En los embriones XX, se detectó el ARNm para el IGF-II-A desde los 10.5 d.g. (cresta urogenital). A la edad de 11 d.g., en la gónada indiferenciada XX, la banda para este ARNm es menos intensa que aquellas de las demás edades estudiadas. En los individuos XY, la expresión del IGF-II-A se inició también a los 10.5 d.g. (cresta urogenital), pero no se detectó a la edad de 11 d.g. (gónada indiferenciada) (Figura 2).

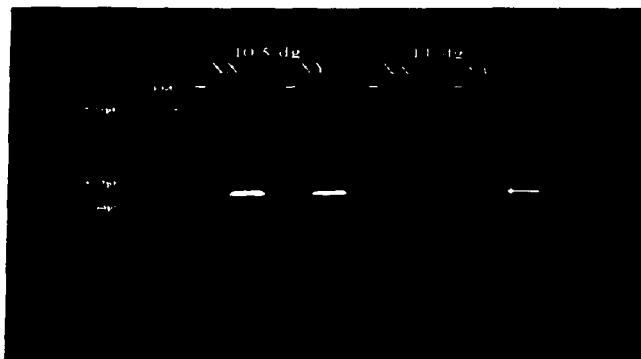


Figura 2. Perfil electroforetico del ADNc correspondiente al ARNm del IGF-II-A en la cresta urogenital (10.5 d.g.) y en la gónada indiferenciada (11 d.g.), de los embriones B6.Y<sup>DOM</sup>, XX y XY. La banda de 429 pb (flecha) corresponde al transcrito del IGF-II-A amplificado. Los sexos y las edades de los embriones se muestran en la parte superior de la figura. El experimento control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al tejido experimental (con transcriptasa reversa).

En la gónada indiferenciada XX de 11.5 d.g., se observó la banda correspondiente al ARNm del IGF-II-A y, en el ovario XX de 12 d.g. se detectó una banda muy intensa para este mensajero. En los individuos XY, la expresión del ARNm para el IGF-II-A, se inició nuevamente, en la gónada indiferenciada de 11.5 d.g. y la expresión continuó en los ovarios XY de 12 d.g. (Figura 3).

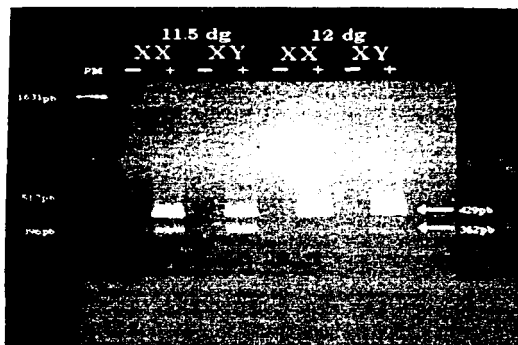


Figura 3. Electroforesis del ADNc correspondiente al ARNm del IGF-II-A en la gónada indiferenciada (11.5 d.g.) y en las gónadas de 12 d.g., de los embriones XX y XY B6.Y<sup>DOM</sup>. Los sexos y las edades de los embriones se indican en la figura. Las bandas de 429 pb y de 352 pb (flechas) corresponden al IGF-II-A y a la enzima Hprt, respectivamente. El experimento control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al experimental (con transcriptasa reversa).

En los ovarios XX de 14 d.g. la banda que corresponde al ARNm del IGF-II-A es tenue, pero la expresión de este transcrito en el ovario XX continúa hasta los 16 d.g. En los ovarios XX y XY de 14 y 16 d.g., se observó la banda para IGF-II-A y aparentemente no hay ninguna variación en la intensidad de las bandas (Figura 4).

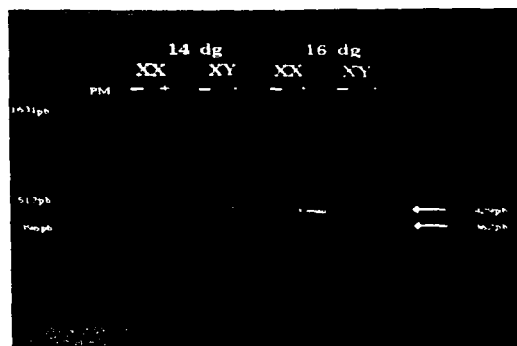


Figura 4. Se muestra el ADNc correspondiente al ARNm del IGF-II-A en las gónadas de 14 y 16 d.g., XX y XY de los embriones B6.Y<sup>-DOM</sup>. Los sexos y las edades de los embriones se muestran en la parte superior de la figura. El peso molecular del IGF-II-A es de 429 pb y el de la enzima Hprt es de 352 pb (flechas). El tejido control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al tejido experimental (con transcriptasa reversa).

## b) IGF-II-B

La presencia del ARNm para el IGF-II-B se observó en embriones XX y XY desde los 10.5 d.g. (cresta urogenital) y en las gónadas indiferenciadas de 11 d.g. (Figuras 5). No se observó ninguna variación con respecto a la intensidad de las bandas en este periodo.

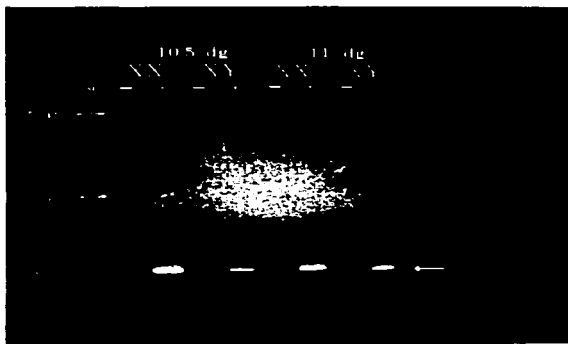


Figura 5. Perfil electroforético del ADNc correspondiente al ARNm del IGF-II-B en la cresta urogenital (10.5 d.g.) y en la gónada indiferenciada (11 d.g.), de los embriones XX y XY de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup>. Los sexos y las edades de los embriones se muestran en la parte superior de la figura. Este transcrito tiene un peso molecular de 153 pb (flecha). El experimento control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al tejido experimental (con transcriptasa reversa).

En las gónadas indiferenciadas de 11.5 d.g. de los embriones XX se detectó la expresión del ARNm del IGF-II-B y en los ovarios XX de 12 d.g., la banda correspondiente a este transcrito fue más tenue. En las gónadas indiferenciadas XY de 11.5 d.g., se observó que la banda correspondiente al ARNm para el IGF-II-B es menos intensa que aquella banda detectada en los ovarios XY de 12 d.g. (Figura 6).

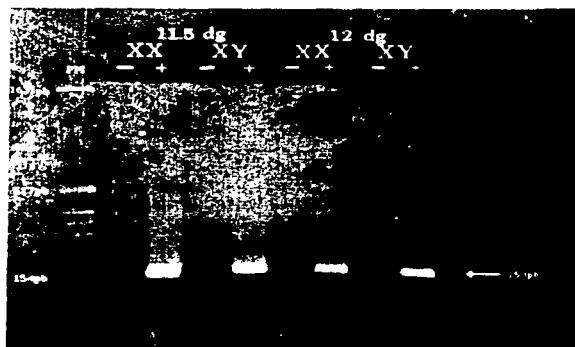


Figura 6. Electroforesis del ADNc correspondiente al ARNm del IGF-II-B en la gónada indiferenciada (11.5 d.g.) y en las gónadas de 12 d.g., de los embriones XX y XY de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup>. Los sexos y las edades de los embriones se indican en la parte superior de la figura. Las bandas de 153 pb corresponden al ARNm del IGF-II-B (flecha). El experimento control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al experimental (con transcriptasa reversa).

En los ovarios XX de 14 d.g., se observó la banda correspondiente al IGF-II-B y su intensidad fue mayor que la de la banda para los ovarios XX de 16 d.g. En los ovarios XY, detectamos la banda correspondiente al ARNm del IGF-II-B a los 14 d.g.; sin embargo la intensidad de la banda para este transcrito, fue mayor a los 16 d.g. (Figura 7).

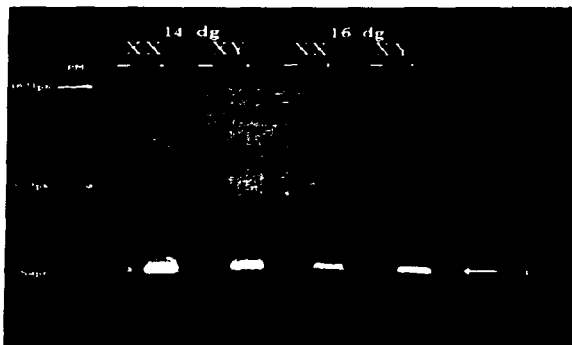


Figura 7. Perfil electroforético del ADNc correspondiente al ARNm del IGF-II-B en los ovarios XX y XY de 14 y 16 d.g., de la cepa de ratón B6. Y<sup>DOM</sup>. Los sexos y las edades se muestran en la figura. El peso molecular del transcrito para IGF-II-B es de 153 pb (flecha). El tejido control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al tejido experimental (con transcriptasa reversa).

### 3) Expresión del *Sry*

En los embriones B6.Y<sup>DOM</sup> la transcripción para este gen se inició a los 10.5 dg. y fue uniforme hasta los 11.5 dg. En las gónadas de 12 dg., no se identificó este ARNm (Figura 8).

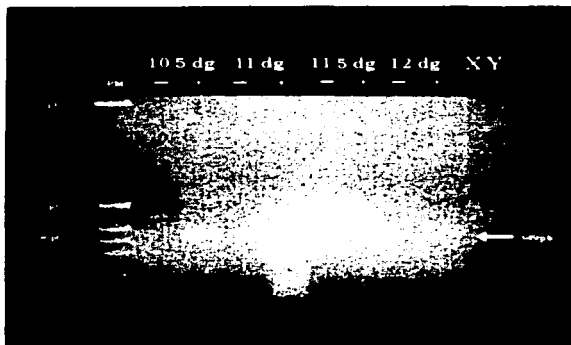


Figura 8. Electroforesis del ADNc correspondiente al ARNm del *Sry*, en los complejos urogenitales de 10.5 dg., y en las gónadas indiferenciadas de 11, 11.5 y 12 dg., de los embriones XY de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup>. Este transcrito tiene un peso molecular 349 pb (flecha). Las edades se indican en la parte superior de la figura. El control se muestra con signo (-) (sin transcriptasa reversa) y el signo (+) se refiere al experimental (con transcriptasa reversa).

### 4) Expresión de la enzima Hprt

Se evaluó la transcripción de esta enzima en las edades de 11.5 y 16 dg. y para ambos sexos se detectó el transcrito; sin embargo, la intensidad de la banda observada en los embriones de 16 dg. fue menor en ambos sexos (Figuras 2 y 3).

Los pesos moleculares para los cuatro mensajeros estudiados, corresponden a los publicados y mencionados anteriormente ( Melton y col., 1984 para la Hprt; Stempien y col., 1986 para el IGF-II-A e IGF-II-B y Gubbay y col., 1990 para el *Sry*).

## VII. DISCUSIÓN

Durante el período estudiado (10.5 a 16 d.g.), ocurren eventos morfo-fisiológicos y genéticos esenciales que conllevan a la diferenciación sexual de la gónada del ratón. Durante la diferenciación, la producción de diferentes grupos de proteínas por diferentes tipos celulares en el tiempo es muy importante. Nuestros resultados muestran que probablemente existen dos formas del ARNm maduro para IGF-II, las cuales denominamos como ARNm para IGF-II-A y ARNm para IGF-II-B.

En eucariontes., la expresión diferencial de genes puede ser modificada a nivel de transcripción, traducción, modificaciones en las proteínas y además al nivel del procesamiento del ARNhn y del transporte del ARNm maduro. La regulación de la expresión génica a este último nivel es crucial para el desarrollo embrionario. Las diferentes células pueden procesar el mismo ARNhn de distintas formas, creando así distintas poblaciones de ARNm maduros citoplásmicos (Gilbert, 1994).

La mayoría de las unidades de transcripción en los eucariontes están compuestas de secuencias codificadoras para un péptido, o *exones* que se encuentran interrumpidas por una ó más secuencias no codificadoras o *intrones*. La maduración del ARNm o splicing, es un proceso que comprende una serie de reacciones de corte y unión que resulta en la escisión precisa de los intrones del ARNhn y el empalme de los exones adyacentes para generar el ARNm maduro. Se han propuesto varias teorías para explicar el significado funcional y evolutivo de los intrones, pero se tienen muchas preguntas sin respuestas. Sin embargo, es claro que este proceso es esencial en la expresión génica de los eucariontes y como se mencionó anteriormente, en algunos casos la maduración alternativa del ARNm puede regular la expresión diferencial de genes (Hames, 1990).

Aunque en este trabajo encontramos dos especies distintas del ARNm maduro del IGF-II, no sabemos ahora si estos mensajeros se generan por un mecanismo de maduración alternativa ni tampoco si se están empleando promotores distintos a los ya descritos (Rotwein y Hall, 1990). El siguiente paso es verificar a través de análisis de secuencias nuestros resultados. Si éstos se corroboran, tendríamos que diseñar otros grupos de oligonucleótidos 5' y 3' que abarquen diferentes fragmentos del ARNm para IGF-II, así como investigar qué



otro tipo de elementos reguladores de la transcripción y la maduración del ARNm participan en este proceso.

Se sabe que en los mamíferos el locus para IGF-II es muy complicado y una variedad de transcritos son producidos por distintos promotores, procesos alternativos de empalme de exones, cortes en los ARNm y sitios de poliadenilación (Stempien y col., 1986 y Gray y col., 1987). El ARNm del IGF-II de ratón se ha analizado cuidadosamente; tres exones líder 5', se encuentran unidos alternativamente a los exones codificadores comunes (Rotwein y Hall, 1990). Estas tres formas de ARNm para el IGF-II, se han localizado en el hígado del recién nacido, placenta corioalantoidea, saco vitelino y embrión, desde los 9.5 d.g.: sin embargo no se analizó por separado cada órgano (Newell y col., 1994). Durante el desarrollo embrionario temprano del ratón, la distribución de los transcritos de IGF-II coincide con la distribución intracelular de la proteína IGF-II (Lee y col., 1990) por lo que se ha pensado que la regulación postranscripcional, no regula los sitios de síntesis de esta proteína. Sin embargo, la expresión del IGF-II humano se ha examinado en varios tejidos fetales y adultos así como en tumores y se ha visto que hay diferencias en el tamaño de los ARNm lo cual implica que la maduración alternativa puede ser un mecanismo que regule la expresión del IGF-II (Stempien y col., 1986). Es factible que nuestras observaciones con respecto a la variación en la intensidad de las bandas durante el desarrollo gonadal en ambos sexos, refleje la manera en que son reguladas y utilizadas las dos formas de los ARNm maduros del IGF-II. Así mismo, es posible que el ARNm del IGF-II-A en las gónadas indiferenciadas XY de 11 d.g., esté sujeto a cambios ocasionados por eventos de regulación de la expresión génica a varios niveles.

La elección de sitios alternativos de corte en los ARNhn puede ser regulada de manera tejido-específica y/o tiempo-específica, de tal manera que sería consecuencia de la acción de factores externos expresados diferencialmente. La expresión espacio-temporal del ARNhn producido por maduración alternativa puede ser regulada a nivel de la estabilidad del ARNm o a nivel de la elección del sitio de corte. En el primer caso, todas las versiones del ARNhn generadas por maduración alternativa serían constitutivas, pero algunas se degradarían rápidamente con nucleasas específicas cuya expresión o actividad esté sujeta a su vez a mecanismos de regulación. En el segundo caso, podrían existir reguladores positivos o negativos que modulen la afinidad de un factor general de la maduración del ARNm para

los sitios alternativos de corte o podrían existir factores especializados que reconocieran directamente los sitios relevantes de corte. Otra posibilidad es que estos últimos factores organizaran el ARNhn de tal manera que se favoreciera la utilización de un grupo particular de sitios de corte (Hames, 1990).

La expresión de genes sujetos a la maduración alternativa implica la utilización de diferentes sitios de corte 5' ó 3' en varias combinaciones (Leff y col., 1986). Además de generar los diferentes péptidos producidos por células diferenciadas, el proceso de maduración alternativo es empleado por eventos tempranos de diferenciación en el desarrollo embrionario que determinan el tipo celular. Por ejemplo, estudios recientes han demostrado que este mecanismo de procesamiento diferencial del ARNhn tiene un papel importante en la determinación del sexo fenotípico en *Drosophila* (Baker y col., 1987). Durante el período de larva el gen *tra* sintetiza activamente un transcrito que es procesado hacia un ARNm general (encontrado en hembras y machos) o como un ARNm femenino-específico. Sólo las hembras contienen este mensajero producido por maduración alternativa. Aparentemente, esta maduración alternativa femenina del gen *tra* surge de la competencia de dos posibles sitios 3' (aceptores) de corte en el intrón. Se ha propuesto que esta competencia es alterada por la presencia o ausencia del producto funcional del gen *Sex-lethal*. Posiblemente el producto del gen *Sex-lethal* controla cual de los 2 sitios 3' de corte es empleado (Gilbert, 1994).

Así mismo, diferentes estudios genéticos han mostrado que los factores que constituyen la maquinaria de transcripción forman una red interdependiente, cuya operación dirige el desarrollo embrionario de manera ordenada. Además, el gran número de intrones de los ARNhn y la falta de conservación en sus secuencias internas sugieren que algunos factores externos, son los responsables de preparar el ARNhn para la selección correcta de sitios de corte y empalme (Hames, 1990). Probablemente varios factores de transcripción podrían modular el proceso de maduración alternativa del IGF-II. En el caso de los individuos XY el gen determinante del testículo, *Sry*, inicia su expresión al mismo tiempo que el IGF-II en los complejos urogenitales XY de 10.5 d.g.. Sería factible pensar que este gen modula la maduración del IGF-II de manera alternativa. Para afirmar lo anterior y saber si existe alguna interrelación entre ambos genes se podría empezar por investigar la expresión del IGF-II durante la diferenciación sexual de la cepa normal B6 y comparar con los

resultados obtenidos para la cepa B6.Y<sup>DOM</sup>. Se ha visto que el *Sry* se une a secuencias específicas del ADN y se ha propuesto que induce o inhibe la transcripción de otros loci. (Haqq y col. 1993 para el MIS y la P450arom y Kent y col., 1996 para el *Sox9*). Además al unirse al ADN provoca un giro, lo cual podría facilitar la interacción con otros factores unidos a sitios adyacentes o permitir la interacción de potenciadores distantes, con la maquinaria básica de transcripción. Contrariamente, una distorsión severa en el ADN prevendría la unión de otros factores a sitios adyacentes (Pevny y Lovell-Badge, 1997). También sería interesante estudiar si existe interrelación con otros genes importantes en la diferenciación sexual de la gónada del ratón normal e investigar su papel en la reversión sexual del B6.Y<sup>DOM</sup>. Entre ellos se encuentra el factor esteroideogénico 1 (SF-1) el cual regula la expresión del MIS y de algunas enzimas esteroideogénicas en el embrión de ratón y su delección provoca que no se diferencie el testículo (Ikeda y col., 1994 y Luo y col., 1994). Así mismo, el gen *Sox9* participa en el desarrollo del testículo del ratón y del pollo (Kent y col., 1996).

Por otra parte, se ha propuesto que el lactógeno placentario regula la expresión del IGF-II en cultivos de fibroblastos (Adams y col., 1983); sin embargo, no se ha estudiado el papel de éste durante el desarrollo de la gónada. Para estudiar lo anterior, se podrían realizar cultivos de los complejos urogenitales y gónadas en un medio suplementado con IGF-II, con y sin el lactógeno placentario y observar los cambios en la producción del IGF-II por radioinmunoensayo.

#### *Posibles funciones del IGF-II en el ovario XX y en el ovario XY*

En la presente investigación detectamos el ARNm para el IGF-II-A y el ARNm para el IGF-II-B en los complejos urogenitales y en las gónadas embrionarias de los ratones XX de la cepa B6.Y<sup>DOM</sup>, desde los 10.5 hasta los 16 d.g. Cuando las CGP's llegan a la cresta urogenital, continúan su división y como consecuencia, su número aumenta localmente. La llegada de estas células coincide con el comienzo de una intensa proliferación por parte de las células mesenquimatosas que forman el blastema gonadal. A pesar, de que el origen de las células somáticas gonadales no se conoce con precisión, la primera señal de su actividad es una proliferación intensa y constante, asociada al proceso invasivo. La gonada indiferenciada

posee elementos estromáticos y vasculares (Merchant-Larios y col., 1993) y carece de componentes nerviosos evidentes (Zamboni, 1989). La presencia temprana de los ARNm del IGF-II sugieren que podría participar como un factor mitogénico, tanto en las CG's como en las somáticas que forman la cresta urogenital (10.5 d.g.) y durante el establecimiento de la gónada indiferenciada (de los 11 a los 12 d.g.) ya que se ha propuesto un papel importante del IGF-II, como un factor que controla la proliferación y posiblemente la diferenciación de algunos órganos en el embrión de ratón (DeChiara y col., 1990).

Por otra parte, se conoce muy poco acerca de los factores locales que controlan la diferenciación temprana del ovario y el inicio de la foliculogénesis en la vida embrionaria del ratón y en los mamíferos en general. El desarrollo del ovario es un proceso gradual que comienza con la aparición de elementos estromáticos y capilares en el margen dorsal de la gónada. Éstos se organizan en cordones de tejido estromático y capilar y penetran al blastema gonadal en sentido dorso-ventral. Como resultado se forma un sistema ramificado de cordones ováricos interconectados y conforme las CGP's son incorporadas a estos cordones, estas células comienzan a diferenciarse a través de un proceso llamado foliculogénesis (Merchant-Larios, 1978 y Zamboni, 1989). Durante la primera fase de éste, las ovogonias inician un periodo de intensa actividad mitótica, en el cual la división del núcleo no es seguida de la división citoplásmica y como consecuencia, se forman sincicios de ovogonias. Dentro de éstos hay flujo de organelos e información y por consiguiente, la maduración de las CG's de cada sincicio, ocurre de manera sincrónica al menos por un tiempo. Los conjuntos de ovogonias continúan con el proceso de mitosis y juntas inician la profase de la primera división meiótica (13.5 a 15 d.g.) la cual es posteriormente interrumpida en el estadio diplóteno (17 a 18 d.g.), hasta la pubertad (Merchant-Larios, 1978 y Zamboni, 1989). La participación de uno o varios factores de proliferación y/o diferenciación en el desarrollo del ovario, es sin lugar a duda importante. Entre éstos, algunos como el EGF, FGF y el TGF- $\beta$ , aparentemente participan en procesos mitóticos y de diferenciación de las células del ovario adulto, así como en el proceso de angiogénesis en diferentes especies de mamíferos (Baird y col., 1989; Schomberg, 1989; Skinner, 1989). Los IGF's potencian el crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa y de la teca en diferentes especies de mamíferos adultos (Baranao y Hammond, 1984; Adashi y col., 1985a y 1985b; Davoren y col., 1985; Barbieri y col., 1986; Cara y Rosenfield, 1988;

Veldius, 1989; Hammond y col., 1989 y 1991 y Kamada y col., 1992). El hecho de que el mensajero para el IGF-II está presente en el periodo en que se lleva a cabo la morfogénesis ovárica, hace pensar que este factor podría contribuir en este proceso. Actualmente, se desconoce el papel que podría tener el IGF-II en el ovario embrionario de ratón por lo que son necesarios experimentos para conocer al respecto. Por otra parte, el IGF-II en conjunto con los factores de crecimiento EGF, FGF y TGF- $\beta$ , podría participar en la formación del ovario. Sin embargo, hasta el presente no se sabe nada sobre el mecanismo a través del cual este factor, pudiera actuar en conjunto con los demás para dirigir la diferenciación y el desarrollo del ovario.

En este trabajo identificamos el ARNm para el IGF-II-A y el IGF-II-B desde los 10.5 d.g. hasta los 16 d.g., en los complejos urogenitales y en los ovarios de los embriones XY. Es posible que también la presencia de la proteína del IGF-II pudiera ser importante en el desarrollo del testículo *in vivo*. Sin embargo, en esta cepa los testículos normales nunca se forman en la vida embrionaria. Merchant-Larios y colaboradores (1991) postularon que el mecanismo que controla la invasión y la proliferación de las células estromáticas al inicio de la diferenciación sexual del testículo y/o del ovario debe ser el responsable del tamaño de estos órganos; según Mittwoch (1989), este mecanismo podría modular la determinación sexual gonadal. De esta manera, se plantea que el IGF-II podría formar parte del mecanismo de proliferación; sin embargo, esta suposición debe esperar confirmación experimental a través del estudio de la participación del IGF-II en la formación de un testículo normal.

Diferentes grupos de investigadores han buscado la causa de la reversión sexual en el ratón B6.Y<sup>DOM</sup> (Eicher y Washburn, 1982-1996; Nagamine y col., 1987; Palmer y Burgoyne, 1991 y Taketo y col., 1991, entre otros). Se ha propuesto que el retraso en la formación del testículo, el cual permite el desarrollo de un ovario, no se debe a un efecto intrínseco al cromosoma Y<sup>DOM</sup> sino a la combinación de éste con el genoma de la cepa B6. Lee y colaboradores (1994), reportaron que el gen *Sry* inicia su expresión normalmente, en los embriones XY, pero que su inactivación se llevó a cabo 1 ó 2 días después. Sin embargo, el comienzo de la expresión de los genes para algunas enzimas que participan en la biosíntesis de esteroides y el MIS, está retrasado (12 a 24 horas) en los ovotestis y su expresión está ausente en los ovarios XY. Por lo tanto, el inicio tardío de la ruta determinante del testículo,

no es programado por el alelo *Sry* del *M. musculus domesticus* en sí, sino que debe ser consecuencia de un mecanismo de regulación transcripcional (o postranscripcional) erróneo. Nuestros resultados apoyan la observación con respecto al inicio de la transcripción del *Sry*; sin embargo, no detectamos este mensajero de los 12 a 14 d.g. Es posible que la cantidad de ARNm no fuese suficiente para amplificar, pero para cada experimento utilizamos grupos de 6 pares de complejos urogenitales o gónadas (según la edad). Se excluye la posibilidad de la degradación del ARN porque: 1) el tejido se congeló a  $-70^{\circ}\text{C}$  inmediatamente después de aislarlo (a esta temperatura se inactivan las ARNsas), 2) el ARN total se purificó en presencia de isotiocinato de guanidina que es un reactivo que inhibe las ARNsas, 3) el ARN total se almacenó por un lapso de tiempo muy corto después de haberse purificado (24 horas) y 4) porque todo el material que estuvo en contacto con el ARN se trató con DEPC (el cual inactiva cualquier compuesto orgánico al romper los enlaces carbono-carbono) y después se esterilizó 80 minutos a 120 libras/pulgada<sup>2</sup>. Durante el análisis de la expresión del *Sry*, el MIS y algunas de las enzimas esteroideogénicas, Lee y su grupo señalan distintos patrones de expresión entre los ovarios y los ovotestis XY, lo cual sugiere que para estos genes existen diferencias entre los individuos. Sin embargo, cabe mencionar que aún bajo el microscopio estereoscópico que empleamos para aislar el tejido, no es posible diferenciar un testículo hasta los 13 d.g. Debido a lo anterior, nuestros resultados con respecto a la expresión del *Sry*, se refieren al grupo de complejos urogenitales (10.5 d.g.) y a las gónadas indiferenciadas (11, 11.5 y 12 d.g.) que fueron sexadas como XY. Además verificamos si el cromosoma "Y" está presente en cada uno de los complejos urogenitales y gónadas utilizadas a través de la técnica de hibridación en punto con la sonda 145SC5, específica para secuencias repetidas del cromosoma "Y" del ratón *Mus musculus*. Con este método observamos una señal de hibridación muy intensa en los embriones XY y ninguna en los XX a pesar de la cantidad tan pequeña de tejido que se aplicó a cada membrana.

En el presente estudio el patrón de expresión de la enzima *Hprt* que fue empleado como control, también coincide con el mostrado por Lee y Taketo (1994). A los 11.5 d.g. estos autores detectaron una banda muy intensa en los complejos urogenitales de ambos sexos; sin embargo, a los 16 d.g. esta banda es muy tenue. Sus observaciones y las nuestras, descartan la posibilidad de un error humano al realizar las técnicas de purificación del ARN y de la amplificación.

Al analizar la expresión del IGF-II-A en las embriones XY, observamos que este mensajero no está presente en las gónadas indiferenciadas de 11 d.g. Durante el estudio de la expresión del IGF-II-A y del IGF-II-B, así como de la enzima HpRT, utilizamos un par de complejos urogenitales o un par de gónadas indiferenciadas (dependiendo de la edad de gestación). Es posible, que a la edad de 11 d.g. en los individuos XY, la cantidad de ARNm para el IGF-II-A en las gónadas indiferenciadas sea muy pequeña por lo que no fue posible amplificarla. Es necesario confirmar su ausencia, para lo cual se podría emplear la técnica de hibridación *in situ*, permitiendo así la localización de un mensajero presente en pequeñas cantidades en los tipos celulares que lo expresan. Lo anterior no fue posible debido a que recientemente estamos incorporando la técnica en el laboratorio.

Hasta el presente, éste es el primer estudio de la expresión del mensajero para IGF-II en la gónada embrionaria del ratón y es necesario confirmar la presencia de ambos tipos de mensajeros maduros (IGF-II-A e IGF-II-B). Nuestros resultados están en controversia con aquellos obtenidos por Beck y su grupo (1987) en el embrión de rata. Estos investigadores emplearon una sonda específica para IGF-II, a través de hibridación *in situ* para el ARNm. Este grupo de investigadores describió que los sitios con mayor expresión eran el hígado y el saco vitelino, mientras que en el sistema urogenital no se detectó este mensajero. Posteriormente, Bondy y colaboradores (1990), localizaron el ARNm para el IGF-II con la técnica de hibridación *in situ* en el embrión de rata, de 14 y 15 d.g. En los tejidos vascular, muscular y cartilaginoso, así como en el hígado, la hipófisis y el plexo coroideo entre otros, se encontraron cantidades abundantes de este transcrito. Sin embargo, el ARNm del IGF-II tampoco fue identificado en la gónada. Es posible que la utilización de una técnica tan sensible como la RCP, nos permitiera localizar este mensajero, aún a partir de la pequeña cantidad de células que forman las gónadas que analizamos. Otra posibilidad, es el hecho de que exista una diferencia especie-específica para la transcripción del IGF-II o, que se exprese en cantidades tan pequeñas que no haya sido posible detectarlo en la rata.

En 1996, Baker y colaboradores describieron el efecto que se observó por una mutación nula para el IGF-I en el ratón. Estos animales son enanos estériles, en los cuales se han observado severas malformaciones sobre todo en el tracto reproductor. Estas manifestaciones fenotípicas están correlacionadas con la ausencia de los ARNm para el IGF-I ya que los machos carecen de los niveles adecuados de testosterona para llevar a cabo la

masculinización del aparato reproductor así como la producción de espermatozoides viables es muy baja. Las hembras mutantes no ovulan aún después de la administración de gonadotropinas y poseen un útero infantil. Por otra parte, los mutantes para IGF-II son enanos al nacer y se reproducen de manera normal. Es posible que el IGF-II en el ratón esté involucrado en los procesos de crecimiento.

La función que podría tener el IGF-II en el desarrollo de la gónada del ratón podría analizarse con la técnica de hibridación *in situ* a través de la cual podríamos conocer los tipos celulares que expresan el ARNm y por inmunohistoquímica los tipos celulares en los que produce y en los que está presente la proteína. Estos estudios se podrían complementar con la localización de los diferentes receptores para IGF-II ya que hasta ahora se conocen dos (Liu y col., 1993), así como por el análisis de la participación de las IGFBP's, en el desarrollo ontogenético de la gónada. Estos datos en conjunto, nos permitirían conocer las funciones autócrinas/parácrinas del IGF-II y su contribución durante la diferenciación gonadal con mayor certeza.

Finalmente, se propone que el IGF-II podría participar como factor promotor importante de la división celular, durante el establecimiento de la gónada indiferenciada, así como en el proceso de crecimiento y maduración de las células somáticas de la gónada en los individuos XX como XY. Algunos factores, como el *Sry*, podrían modular el proceso de corte de intrones y empalme de exones en los ovarios XY.



## VIII. CONCLUSIONES

1. Probablemente existen dos formas maduras del mensajero para el IGF-II durante el desarrollo de la gónada XX y XY en la cepa B6.Y<sup>DOM</sup>.
2. El ARNm para las formas maduras del ARNm del IGF-II-A y del IGF-II-B, se empieza a expresar a los 10.5 d.g., en los complejos urogenitales XX y XY.
3. La expresión del ARNm para el IGF-II-A y el IGF-II-B se mantuvo constante hasta los 16 d.g. en el ovario XX.
4. El ARNm para el IGF-II-B, se expresa de manera uniforme hasta los 16 d.g., en los ovarios XY de la cepa de ratón B6.Y<sup>DOM</sup>.
5. El ARNm para el IGF-II-A se expresa de manera diferencial en los individuos XY.

Se propone que el IGF-II podría participar como un factor mitogénico y de diferenciación importante, para las CG's y las células somáticas, en el establecimiento de la gónada indiferenciada, así como durante la subsecuente diferenciación de los tipos celulares que forman el ovario. La transcripción del IGF-II durante el desarrollo de la gónada en el ratón, probablemente sea regulada por diferentes mecanismos. Algunos factores como el *Sry*, podría modular el procesamiento de ARNhn del IGF-II en los ovarios XY.

## IX. REFERENCIAS

- Adams SO, Nissley SP, Handwerger S, Rechler MM 1983 Developmental patterns of insulin-like growth factor-I and -II synthesis and regulation in rat fibroblasts. *Nature* 302(10):150152.
- Adashi EY, Resnick CE, Brodie AMH, Svoboda ME, Van Wyk JJ 1985a Somatomedin-C-mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 117:2313-2320.
- Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, Svoboda ME, Van Wyk JJ 1985b Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cells growth and function. *Endocrine Rev* 6:400-420.
- Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ 1986 Follicle stimulating hormone enhances somatomedin C binding to cultured rat granulosa cells. *J Biol Chem* 261:3923-3926.
- Alvarez-Buylla A, Merchant-Larios II 1986 Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res* 165:362-368.
- Baird A, Emoto N, Shimasaki S, Gonzalez AM, Fauser B, Hsueh JW 1989 Fibroblast growth factors as local mediators of gonadal function. En: Hirschfield AN (Ed) *Growth factors and the ovary*. Plenum Press, Nueva York y Londres, 151-162.
- Baker B, Nagoshi RN, Burtin KC 1987 Molecular genetic aspects of sex determination in *Drosophila*. *BioEssays* 6:66-70.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A 1996 Effects of an *Igf1* gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endo* 10(7):903-918.
- Baranao JLS, Hammond JM 1984 Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 124:484-490.
- Barbieri RL, Makris A, Randall RW, Daniels G, Kissstner RW, Ryan KJ 1986 Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocr Metab* 62:904-910.
- Beck F, Samani NJ, Penschow JD, Thorley B, Tregear GW, Coghlan JP 1987 Histochemical localization of IGF-I and -II mRNA in the developing rat embryo. *Development* 101:175-184.
- Berta P, Hawkins J, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M 1990 Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.
- Bishop CE, Boursot P, Baron B, Bonhomme F, Hatat D 1985 Most classical *Mus musculus domesticus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus musculus* Y chromosome. *Nature* 315(2):70-72.

- Blundell TL y RE Humbel 1980 Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature Lon* 287:781-787.
- Bondy CA, Wermer H, Roberts CT, LeRoith D 1990 Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and type I IGF receptor gene expression in early organogenesis: Comparison with IGF-II gene expression. *Mol Endo* 4(9):1386-1398.
- Buehr M, Gu S, McLaren A 1993 Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117:273-281.
- Burgoyne PS, Buehr M, Koopman P, Rossant J, McLaren A 1988 Cell autonomous action of the testis-determining gene:Sertoli cells are exclusively XY in XX/XY chimeric mouse testes. *Development* 102:443-450.
- Cara JF, Rosenfield RL 1988 Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology* 123:733-739.
- Carlisle C, Winking H, Weichenhan D, Nagamine CM 1996 Absence of correlation between *Sry* polymorphisms and XY sex reversal caused by the *M. m. domesticus* Y chromosome. *Genomics* 33:32-45.
- Chiquoine AD 1954 The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec* 118:135-146.
- Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Bioch* 162:156-159.
- Coward P, Nagai K, Chen D, Thomas HD, Nagamine CM, Lau YF 1994 Polymorphism of a CAG trinucleotide repet within *Sry* correlates with B6.Y<sup>DOM</sup> sex reversal. *Nat Genet* 6:245-250.
- Davoren JB, Hsueh AJW, Li CH 1985 Somatomedin C augments FSH-induced differentiation of cultured rat granulosa cells *Am J Physiol* 249:26-33.
- Davoren JB, Kasson BG, Li CH, Hsueh AJW 1986 Specific insulin-like growth factor I and II-binding sites on rat granulosa cells: Relation to IGF action. *Endocrinology* 119:2155-2162.
- DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson E 1990 A growth deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78-80.
- Eicher EM, Washburn LL, Whitney III JB, Morrow KE 1982 *Mus poschiavinus* Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 217:535-537.
- Eicher EM, Washburn LL 1983 Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene. *J Exp Zool* 228:297-304.
- Eicher EM, Washburn LL 1986 Genetic control of primary sex determination in mice. *Ann Rev Genet* 20:327-360.

- Eicher EM, Shown EP, Washburn LL 1995 Sex reversal in C57BL/6J-Y<sup>POS</sup> mice corrected by a Sry transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 350(1333):263-268.
- Eicher EM, Washburn LL, Schork NJ, Lee BK, Shown EP, Xu X, Dredge RD, Pringle MJ, Page DC 1996 Sex determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-Y<sup>POS</sup> sex reversal. *Nature Genet* 14:206-209.
- Elgin RG, Busby WH, Clemmons DR 1987 An insulin-like growth factor (IGF) binding protein which enhances the biological response to IGF-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3254-3259.
- Erllich HA, Gelfand D, Sninsky JJ 1991 Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 225:467-470.
- French-Constant C, Hollingsworth A, Heasman J, Wylie CC 1991 Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development* 113:1365-1373.
- Filson AJ, Louvi A, Elstratiadis A, Robertson J 1993 Rescue of the T-associated maternal effect in mice carrying null mutations in *Igf-2* and *Igf-2r*, two reciprocally imprinted genes. *Development* 118:731-736.
- Florini JR, Magri KA, Ewton DZ, James PL, Grindstaff K 1991 "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem* 266:15917-15923.
- Ford CE, Jones KW, Polani PE, de Almeida J, Briggs JH 1959 A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's Syndrome). *Lancet* 4:711-713.
- Foster JK, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovel-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Marshall GJA 1992 Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupial. *Nature* 359:531-533.
- Francke U y Taggart TR 1980 Comparative gene mapping: Order of loci on the X chromosome is different in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77(6):3595-3599.
- Giese K, Cox J, Grosschedl R 1994 The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:185-195.
- Gilbert SF 1994 *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Inc. 450-452
- Ginsburg M, Snow MHL, McLaren A 1990 Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110:521-528.
- Godin I, Wylie CC 1991 TGF $\beta$ <sub>1</sub> inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113:1451-1457.
- Godin I, Wylie CC, Heasman J 1990 Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108:357-363.

- Graves PE, Erickson RP 1992 An amino acid change in the DNA-binding region of Sry, found in *Mus musculus domesticus* and other species, does not explain C57BL/6J-Y<sup>DOM</sup> sex reversal. *Biochem Biophys Res Commun* 185:310-316.
- Gray A, Tam AW, Dull TJ, Hayflick J, Pintar J, Cavenee WK, Koufos A, Ullrich A 1987 Tissue-specific and developmentally regulated transcription of the insulin-like growth factor 2 gene. *Dev Biol* 6(4):283-295.
- 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/C<sub>17-20</sub> Lyase, and p450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135(1):262-268.
- Gubbay J, Collington J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R 1990 A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.
- Hanbel AC, Eddy EM 1986 Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. *Gamete Res* 15:25-34.
- Hammond JM, English HF 1987 Regulation of deoxyribonucleic acid synthesis in cultured porcine granulosa cells by growth factors and hormones. *Endocrinology* 120:1039-1046.
- Hammond JM, Mondschein JS, Canning SF 1989 Insulin-like growth factors (IGFs) as autocrine/paracrine regulators in the porcine ovarian follicles. En: AN Hirshfield (Ed) *Growth factors and the ovary*. Plenum Press 107-102.
- Hammond JM, Mondschein JS, Samaras SE, Smith SA, Hagen DR 1991 The ovarian insulin-like growth factor system. *J Reprod Fert Suppl* 43:199-203.
- Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA 1993 SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1097-1101.
- Haselbacher GK, Schwab ME, Pasi A, Humbel RE 1985 Insulin-like growth factor II (IGF II) in human brain: Regional distribution of IGF II and of higher molecular mass forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2153-2157.
- Hernandez ER, Roberts CT, LeRoith B, Adashi EY 1989 Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology* 125:572-574.
- Heyner S, Smith RM, Schultz GA 1989 Temporally regulated expression of insulin and insulin-like growth factors and their receptors in early mammalian development. *BioEssays* 11:171-176.
- Hitzeman SJW 1962 Development of enzyme activity in the Leydig cells of the mouse testis. *Anat Rec* 143:351-362.

- Ikeda Y, Shen WL, Ingraham HA, Parker KL 1994 Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of steroid hydroxylases. *Molec Endroc* 8:654-662.
- Jacobs PA, Strong JA 1959 A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-303.
- Jäger RJ, Anvret M, Kerstin H, Scherer G 1990 A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene *SRY*. *Nature* 384:452-454.
- Jost A 1947 Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Archs Anat Microsc Morph Exp* 36:271-315.
- Jost A 1953 Studies on sex differentiation in mammals. *Rec prog Horm Res* 8:379-418.
- Jost A 1972 A new look at the mechanisms controlling sex differentiation in mammals. *Johns Hopkins Med J* 130:38-53.
- Kamada S, Kubota T, Taguchi M, Wen-Rong I, Sakamoto S, Aso T 1992 Effects of insulin-like growth factor-II on proliferation and differentiation of ovarina granulosa cells. *Horm Res* 37:141-149.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P 1996 A male-specific role for *SOX9* in vertebrates sex determination. *Development* 122:2813-2822.
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R 1990 Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348:450-452.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R 1991 Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351:117-121.
- Lee CH, Taketo T 1994 Normal Onset, but prolonged expression, of *Sry* gene in the B6. gene in the B6.Y<sup>DOM</sup> sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 165:442-452.
- Lee JE, Pintar J, Efstratiadis A 1990 Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development* 110:151-159.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson J, Efstratiadis A 1993 Mice carrying null mutations of the genes encoding Insulin-like Growth Factor I (*Igf-1*) and type I IGF receptor (*Igflr*). *Cell* 75:59-72.
- Lovell-Badge R 1992 Testis determination: soft talk and kinky sex. *Curr Biol* 2:596-601.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.
- Macaulay VM 1992 Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 65:311-320.

- McElreavy K, Vilain E, Abbas N, Herskowitz I, Fellous M 1993 A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3368-3372.
- McLaren A 1984 Chimeras and sexual differentiation. En: Le Douarin N, McLaren A (Eds) *Chimeras in developmental biology*. Academic Press: 381-399.
- McLaren A 1985 Relating of germ cells sex to gonadal differentiation. En: Halvorsen HO, Monroy A (Eds) *The origin and evolution of sex*. Liss:289-300.
- McLaren A 1990 The making of male mice. *Nature* 351:96.
- McLaren A, Buehr M 1990 Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31:185-195.
- Melton DW, Konecki DS, Ledbetter DH, Hejtmencik JF, Caskey CT 1981 *In vitro* traslation of hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase mRNA: Characterization of a mouse neuroblastoma cell line that has elevated levels of hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(11):6977-6980.
- Melton DW, Konecki DS, Brennan J, Caskey CT 1984 Structure, expression and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2147-2151.
- Merchant-Larios H 1978 Ovarian differentiation. En: Jones RE (Ed) *The vertebrate ovary*. Plenum Publishing Corp. Cap 2:47-81
- Merchant-Larios H 1984 Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Belerkom J, Motta PM (eds) *Ultrastructure of reproduction*. Martinus Nijhoff Publ. Boston. Cap 3:19-30.
- Merchant-Larios H, Taketo T 1991 Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microscop Tech* 19:158-171.
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M. 1993 The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37:407-414.
- Merriman HL, La Tour D, Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ, Strong DD 1990 Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-II induce *c-fos* in mouse osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 46:258-264.
- Mintz B, Russell ES 1957 Gene-induced embryological modifications of primordial germ cells in the mouse. *J Exp Zool* 134:207-237.
- Mittwoch B 1971 Sex determination in mammals and tempo of growth: possibilities vs. switches. *J Theor Biol* 137:445-455.

- Mondschein JS, Hammond JM, Canning SF 1989 Profiles of immunoreactive insulin-like growth factors (IGFs)-I and -II in porcine follicular fluid (FF) and granulosa cell conditioned medium (GCCM). *Biol Reprod* (Suppl. 1):191. Abstr.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R 1996 *Sox9* expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in the testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genet* 14:62-68.
- Nagamine CM, Carlisle C 1996 The dominant white spotting oncogene allele *Kit*<sup>W<sup>42J</sup></sup> exacerbates XY<sup>DOM</sup> sex reversal. *Development* 122:3597-3605.
- Nagamine CM, Taketo T, Koo GC 1987 Morphological development of the mouse gonad in *tda-1* XY sex reversal. *Differentiation* 33:214-222.
- Nagamine CM, Taketo T, Koo GC 1987 Studies on the genetics of *tda-1* XY sex reversal in the mouse. *Differentiation* 33:223-231.
- Newell S, Ward A, Graham C 1994 Discriminating translation of insulin-like growth factor-II (IGF-II) during mouse embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 39:249-258.
- Nishioka Y 1988 Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology* 38:181-185.
- Nishioka Y, Lamothe E 1986 Isolation and characterization of a mouse Y chromosomal repetitive sequence. *Genetics* 113:417-432.
- Nissley P, Lopaczynski W 1991 Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors* 5:29-33.
- Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, Wilson CA, Claiton RN 1989 Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124:2671-2679.
- Palmer SJ, Burgoyne PS 1991 *In situ* analysis of fetal, prepuberal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112:265-268.
- Pevny LH y Lovell-Badge R 1997 *Sox* genes find their feet. *Current Opinion in Genetics & Development*. 7:338-344.
- Poretsky L, Grigorescu F, Scibel M, Moses AC, Flier JS 1985 Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor -I receptors in normal human ovary. *J Clin Endocr Metab* 61:728-734.
- Ramasharma K, Li CH 1987 Human pituitary and placental hormones control human insulin-like growth factor II secretion in human granulosa cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2643-2647.
- Rotwein P y Hall LJ 1990 Evolution of insulin-like growth factor II: Characterization of the mouse IGF-II gene and identification of two pseudo-exons. *DNA and Cell Biol* 9:725-735.



- Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T 1989 *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Sell C, Dubenil G, Deveaud WH, Miura M, Coppola D, DeAngelis T, Rubin R, Efstratiadis A, Baserga R 1994 Effects of a null mutation of the type-1 IGF receptor gene on growth and transformation of mouse embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 14:3604-3612.
- Shomberg DW 1989 Growth factor- Gonadotropin interactions in ovarian cells. En: Hirschfield AN (Ed) *Growth factors and the ovary*. Plenum Press, Nueva York y Londres, 131-140.
- Sinclair AH, Berga P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN 1990 A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
- Skinner MK 1989 Transforming growth factor production and action in the ovarian follicle: Theca cell-granulosa cell interactions. En: Hirschfield AN (Ed) *Growth factors and the ovary*. Plenum Press, Nueva York y Londres, 141-150.
- Sklar MM, Kiess W, Thomas CL, Nissley 1989 Developmental expression of the tissue insulin-like growth factor II/manose 6-phosphate receptor in the rat. Measurement by quantitative immuno blotting. *J Biol Chem* 264:16733.
- Soares MB, Ishii DN, Efstratiadis A 1985 Developmental and tissue-specific expression of a family of transcripts related to rat insulin-like growth factor II mRNA. *Nucl Acids Res* 13:1119-1134.
- Stempien MM, Fong NM, Rall LB, Bell GI 1986 Sequence of a placental cDNA encoding for the mouse insulin-like growth factor II precursor. *DNA* 5(5):357-361.
- Stott D, Wylie C 1986 Invasive behaviour of mouse primordial germ cells *in vitro*. *J Cell Sci* 86:133-144.
- Stylianopoulou F, Herbert J, Soares MB, Efstratiadis A 1988 Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:141-145.
- Taketo T, Koide S 1981 *In vitro* development of testis and ovary from indifferent fetal mouse gonads. *Develop Biol* 84:61-66.
- Taketo T, Seen CD, Koide SS 1986 Requirement of serum components for the preservation of primordial germ cell in testis cords during early stages of testicular differentiation *in vitro* in the mouse. *Biol Reprod* 34:919-924.
- Taketo-Hosotani T, Nishioka Y, Nagamine CM, Villalpando I, Merchant-Larios H 1989 Development and fertility of ovaries in the B6.Y<sup>DOM</sup> sex reversed female mouse. *Development* 107:95-105.
- Taketo T, Saeed J, Roberge S, Matsuo N, Koide SS 1991 Regulation of testicular differentiation and testosterone production in the fetal mouse gonad *in vitro*. *J Steroid Biochem Molec Biol* 38(4):523-531.

- Taketo T, Saeed J, Nishioka Y, Donahoe K 1991 Delay of testicular differentiation in the B6.Y<sup>DOM</sup> ovotestis demostreated by immunocytochemical staining for Müllerian inhibiting substance. *Dev Biol* 146:386-395.
- Tam PPL, Snow MHL 1981 Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryo. *J Embryol exp Morph* 64:133-147.
- Veldhuis JD 1989 Regulatory actions of the insulin-like growth factor, IGF-I (somatomedin-D), on sterol metabolism by ovarian cells. En: Hirshfield AN (Ed) *Growth factors and the ovary* Plenum Press, Nueva York y Londres, 121-130.
- Vergouwen RPPFA, Jacobs SCiPM, Huiskamp R, Davids JAG, Rooij DG 1991 Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fert* 93:233-243.
- Villalpando-Fierro I, Villafán-Monroy H, Pacheco P 1996 Delayed espression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) gene in the XY sex- reversed female mouse ovary. *Int J Cev Biol* 40:477-482.
- Voutilainen R, Miller WL 1987 Coordinate tropic hormone regulation of mRNAs for insulin-like growth factor II and cholesterol side-chain-cleavage enzyme, in human steroidogenic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1590-1594.
- Voutilainen R, Miller WL 1988 Developmental and hormonal regulation of m RNAs for insulin-like growth factor II and steroidogenic enzymes in human fetal adrenals and gonads. *DNA* 7(1):9-15.
- Washburn LL, Eicher EM 1989 Normal testis determination in the mouse depends on genetic interaction of a locus on chromosome 17 and the Ychromosome. *Genetics* 123:173-179.
- Zamboni L 1989 Overview of embryological and fetal development of the ovary and testis. En: Hirshfield AN (Ed) *Growth factors and the ovary* Plenum Press, Nueva York y Londres, 15-22.
- Zapf J, Froesch ER 1986 Insulin-like growth factors/Somatomedins: Structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Res* 24:121-130.
- ZwingmanT, Erickson RP, Boyer T, Ao A 1993 Transcription of the sex-determining region genes Sry and ZFY in the mouse preimplantation embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:814-817.

## X. APENDICE

### SOLUCIÓN DE HIBRIDACIÓN

Se preparó una solución de formamida 50%, sulfato de dextrán 25%, SDS 0.5% y NaCl 1M. Esta solución debe prepararse en el momento de emplearse y no se almacena más allá de una hora.

### 20X SSC

Se pesaron 175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio para aforar a 1 litro. El pH se ajustó con NaOH a 7.0. Se esterilizó 30 minutos.

### AGUA TRATADA CON DEPC

Se utilizó 1 litro de agua bidestilada al cual se agregó 1 ml de DEPC y se agitó hasta que éste se disolvió completamente. Después de 24 horas, el DEPC fue inactivado en un autoclave con una presión de 15 libras/pulgada, 80 min.

### FENOL SATURADO CON AGUA

Los cristales de fenol deben estabilizarse a temperatura ambiente y estos se fundieron bajo una campana en un baño de María a 60°C. Se agregó agua tratada con DEPC en una proporción 1:1 con el fenol; se agitó con una barra magnética durante 30 min después de los cuales se dejó saturar a 4°C, hasta el día siguiente. Se eliminó el agua sobrenadante y este procedimiento se realizó dos veces más. Finalmente, se agregaron 0.1 g de hidroxiquinoleína y 200 µl de β-mercapto-etanol. Se trabajó en condiciones de esterilidad total durante todo el proceso de saturación del fenol y se almacenó a 4°C.

#### SOLUCIÓN DE TIOCINATO DE GUANIDINA

25g de tiocianato de guanidina fueron disueltos en 29.3 ml de agua tratada con DEPC, filtrada, a 65°C. 15 min., en agitación. A esta solución se agregaron 1.76 ml. de citrato de sodio 0.75M, pH=7 y 2.64 ml. de sarcosyl al 10% en agua tratada con DEPC. Se almacenó a temperatura ambiente durante 3 meses.

#### SOLUCIÓN "D"

Se disolvieron 36  $\mu$ l de  $\beta$ -mercapto-etanol en 5 ml de solución de tiocianato de guanidina. La solución se puede almacenar a temperatura ambiente 1 mes, cubierta de la luz. El material utilizado para elaborar la solución fue esterilizado después de ser tratado con DEPC.

#### AMORTIGUADOR TRIS-BORATO-EDTA (TBE) 5X

Para preparar 1 litro de éste, se disolvieron 54 g de TRIS-Base, 27.5 g de ácido bórico y 20 ml de EDTA 5M. Se ajustó el pH a 8.0 y se almacenó en un frasco color ámbar a temperatura ambiente.

#### AMORTIGUADOR DE CARGA

Consiste en una solución de Azul de Bromofenol al 25% y de glicerol en agua al 30%. Se almacenó a 4°C.