

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DETECCION DE GENES QUE CONTIENEN EL
DOMINIO HMG EN EL EMBRION DE POLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A
LILIA LIZETTE GALVAN MIRANDA

CIUDAD UNIVERSITARIA, D.F.

JUNIO DE 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264490



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres, por la vida, su amor y su apoyo

A Daniel, gracias por tu amor, tu paciencia tan grande y tu apoyo.
In Ka'a Teech

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Irma Villalpando Fierro, por sus enseñanzas en el campo de la Biología de la Reproducción, por el tiempo compartido, en el laboratorio y en las comidas, y por el gran apoyo para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado que revisaron esta tesis, por sus comentarios y correcciones.

Al Biólogo Horacio Villafán, por el apoyo con las técnicas de Hibridación puntual, Southern blot y Northern blot.

Al Dr. Enrique Pedernera del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, por el apoyo para conseguir el huevo fértil y por la infraestructura de su laboratorio.

A Lupita, por su gran amistad y por todas sus enseñanzas sobre el pollo, a Horacio, por su amistad y por toda la ayuda y el apoyo para realizar esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Floria, Gloria, Pilar, Amanda, Doris, Perla, Yessenia, Laura y David, por su amistad y los muchos momentos compartidos a lo largo de estos años.

A mis amigos de la licenciatura: Josune, Carlos, Daniel, Emilio, Maru, Alejandro, con los cuales pase momentos muy gratos a lo largo de toda la carrera.

Al Programa de Becas de Fundación UNAM, por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Al CONACYT, por el apoyo otorgado al proyecto 2874N a nombre de la Dra. Irma Villalpando Fierro.

A Wendy y a Patty, por su cariño y su amistad incondicional.

A mis hermanas: Carolina, Frida y Elizabeth, a Rosi y a todos mis primos y tíos por su amor y su apoyo de toda la vida.

A mis abuelitos, Próspero, Paz y Federico, por su amor, su cariño, los momentos que pasamos juntos y sus enseñanzas.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por abrirme sus puertas para satisfacer mis aspiraciones de estudio y conocimiento de las ciencias biomédicas.

Este 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. Irma Villalpando Fierro.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
2.1 Bases cromosómicas de la diferenciación sexual en la Clase Aves.....	2
2.2 Morfogénesis gonadal en las aves.....	3
2.2.1 Origen y localización de las células germinales primordiales.....	3
2.2.2 Desarrollo de la gónada indiferenciada.....	4
2.2.3 Diferenciación sexual gonadal.....	5
2.3 Modulación epigenética del sexo.....	8
2.4 Establecimiento del eje hipotálamo-adenohipófisis-gónada.....	8
2.5 La familia de los genes Sox.....	10
2.6 Aspectos históricos sobre el gene de la diferenciación testicular.....	14
2.6.1 El factor determinante del testículo.....	14
2.6.2 Identificación del gene de la diferenciación testicular.....	15
2.7 El gen Sry.....	16
2.7.1 Características generales.....	16
2.7.2 Dominio de unión al ADN.....	17
2.7.3 Aspectos evolutivos.....	18
2.7.4 Expresión tisular.....	19
2.7.5 Estructura de la proteína del Sry.....	20
2.7.6 El Sry en las aves.....	22
2.8 Cascada de regulación en la diferenciación sexual del testículo.....	22
2.8.1 Hormona inhibidora de los conductos de Müller.....	23
2.8.2 El factor esteroideogénico 1.....	24
2.8.3 El gen Sox9.....	24
III. Planteamiento del problema e hipótesis	26

IV. Objetivos.....	27
4.1 Objetivo general.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
V. Material y métodos.....	28
5.1 Material biológico.....	28
a) Ovoscopia.....	28
b) Disección y almacenamiento del tejido.....	29
5.2 Identificación del sexo.....	30
5.3 Aislamiento del ADN.....	31
5.4 Aislamiento del ARN.....	32
5.5 Cuantificación de ácidos nucleicos.....	34
5.6 Sondas empleadas en la detección del ADN.....	34
a) Sonda del cromosoma W de las aves.....	34
b) Sonda de la caja HMG del Sry de ratón.....	35
5.7 Marcado de las sondas por el método de Random Primer.....	37
5.8 Southern blot.....	38
a) Digestión y separación de los fragmentos de ADN por electroforesis.....	38
b) Transferencia del ADN.....	39
c) Hibridación.....	39
d) Autoradiografía.....	40
5.9 Northern blot.....	41
a) Preparación de las muestras.....	41
b) Gel de agarosa.....	41
c) Transferencia del ARN total.....	41
d) Hibridación.....	42
VI. Resultados.....	43
6.1 Determinación del sexo de los embriones de pollo.....	43
6.2 Obtención de la sonda de la caja HMG del gen Sry.....	44
6.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos.....	45

6.4 Southern blot.....	47
6.5 Northern blot.....	48
VII. Discusión.....	50
VIII. Conclusiones.....	56
IX. Bibliografía.....	57

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxiribonucleico
AMH	Hormona antimülleriana u hormona inhibidora de los conductos de Müller
ARN	Ácido ribonucleico
CGPs	Células germinales primordiales
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetracético
H ₂ O-DEPC	Agua con Dietil Pirocarbonato
HAG	Hipotálamo-adenohipófisis-gónada
HL	Hormona luteinizante
HMG	Grupo de alta movilidad del inglés High Mobility Group
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SF-1	Factor esteroideogénico 1
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
$\alpha^{32}\text{PdATP}$	5' trifosfato de desoxiadenosina
aa	aminoácidos
c.p.m.	cuentas por minuto
d.i.	días de incubación
dpc	días <i>post coitum</i>
dpp	días post parto
kb	kilobases
min	minutos
ml	mililitros
pb	pares de bases
seg	segundos
μl	microlitros

I Resumen

El gen determinante de la diferenciación testicular, conocido como SRY/Sry en humanos y otros vertebrados regula la transcripción de otros genes que participan en la diferenciación sexual testicular en los mamíferos. Forma parte de la familia de genes SOX, cuyos productos se caracterizan por un dominio de unión al ADN denominado la caja HMG. En las aves, se han detectado homólogos del Sry en ambos sexos. El objetivo de la presente investigación fue determinar si se encuentran genes que contengan la secuencia del dominio HMG en hembras y machos del pollo y si éstas son específicas del sexo. Se aisló el ADN de gónadas embrionarias de pollo de 20 d.i. y el ARN total de gónadas de 6.5, 13.5 y 20 d.i. El sexo de las gónadas de 6.5 d.i. se identificó con la técnica de hibridación puntual con una sonda específica del cromosoma W de las aves que identifica a las hembras. Se hizo un experimento de Southern blot con una sonda para la caja HMG del Sry obtenida por la técnica de PCR. Así mismo, se realizó un Northern blot en las edades antes mencionadas. Los resultados del estudio de Southern blot mostraron que existen secuencias relacionadas al Sry en ambos sexos del embrión de pollo ya que se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 6 y 2 kb. En los experimentos de Northern blot se ven 2 bandas, a los 6.5 y 13.5 d.i. y a los 20 d.i. no se detectó ningún transcrito. Estos datos sugieren que existen en el pollo secuencias relacionadas con el Sry por la secuencia de la caja HMG. Sin embargo, no se logró detectar la expresión de éstos genes en las gónadas embrionarias del pollo, lo cual indica que éstos se expresan en otra etapa del desarrollo del pollo.

II. Introducción

2.1 Bases cromosómicas de la diferenciación sexual en la Clase Aves

Durante la fertilización, la unión de un ovocito con un espermatozoide, inicia una serie de procesos, cuyo resultado es un nuevo organismo. En estos eventos se da el establecimiento del sexo cromosómico (XX ó XY) al combinarse los cromosomas sexuales de las células progenitoras (Alberts y cols., 1994).

En los mamíferos, los machos son heterogaméticos, puesto que tienen un cromosoma sexual "X" y uno "Y" y las hembras son homogaméticas, ya que poseen dos cromosomas X. Sin embargo, en las aves la hembra es la heterogamética, con un cromosoma sexual Z y otro W y el macho es el heterogamético con dos cromosomas Z (Mittwoch, 1996).

El cromosoma W de las aves tiene algunas características comunes con el cromosoma Y de los mamíferos machos, por ejemplo, es pequeño y esencial en la determinación del sexo gonadal y casi totalmente heterocromático en todas las células del cuerpo a excepción de las germinales (Tone y cols., 1982). Hasta el presente no se sabe si el cromosoma W tiene genes que promuevan el desarrollo de la gónada femenina o si el sexo de las aves es determinado por el número de cromosomas Z (Mittwoch, 1996), ni tampoco se conocen los genes que controlan el desarrollo testicular en esta especie.

2.2 Morfogénesis gonadal en las aves

Después de establecerse el sexo cromosómico, se inicia la formación de la gónada, Este órgano está formado por CGPs, precursoras de los gametos, células epiteliales y mesenquimáticas, las cuales darán lugar a los demás tipos celulares que se encuentran en las gónadas adultas.

2.2.1 Origen y localización de las células germinales primordiales

Las CGPs en las aves se originan en el epiblasto de la zona central del área pelúcida (Eyal-Giladi y cols., 1981) como se observa en la figura 1. Estas células se van moviendo hacia el hipoblasto hasta llegar al borde anterior del área pelúcida en el lugar conocido como la creciete germinal en donde empiezan a multiplicarse. Durante el desarrollo del embrión, las CGPs se separan del hipoblasto y se localizan en la zona lagunar del mismo (Ginsburg y Eyal-Giladi, 1986). Posteriormente, las CGPs se internalizan en los vasos sanguíneos que se están formando en la región de la creciete germinal y empiezan a circular a través de todo el blastodisco embrionario. Aproximadamente a los 2.5 d.i., éstas células llegan a los vasos sanguíneos cercanos a la región urogenital, salen de ellos y se asocian al mesenterio dorsal para migrar hasta el epitelio germinal que forma la cresta genital (Kuwana, 1993). Sin embargo, aún no se conocen los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales las CGPs en ésta especie llegan hasta el blastema gonadal y se incorporan al epitelio germinal. Estudios realizados con CGPs de ratón proponen que algunas proteínas de la matriz extracelular como la fibronectina, actuarían como guías de contacto para que las CGPs se desplacen hasta la región de la futura gónada. (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986). Experimentos realizados en las aves sugieren que las CGPs son atraídas al epitelio celómico por algún factor quimiotáctico liberado por

éste (Kuwana, 1986), aunque no se descarta la posibilidad de que la fibronectina esté involucrada en este proceso ó que las CGP sean transportadas por migración pasiva debido a los movimientos morfogénéticos (Kuwana, 1993).

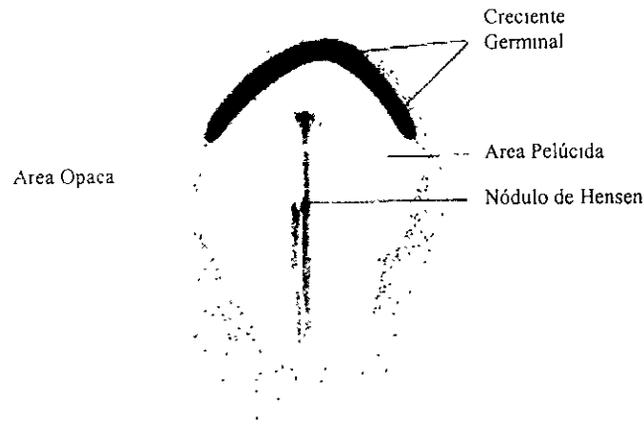


Figura 1. Vista dorsal de un embrión de pollo. Se observa la creyente germinal que contiene a las CGPs que se están multiplicando. Reproducida de Gilbert SF. *Developmental Biology*, 4ª edición, Sinauer Associates Inc. 1994, pag 793.

2.2.2 Desarrollo de la gónada indiferenciada

El primordio gonadal en las aves aparece como dos áreas longitudinales de mesodermo esplacnopleural orientadas ventrolateralmente hacia la cavidad celómica (Gilbert, 1994). Hasta el presente no se han determinado sistemáticamente los eventos celulares que ocurren antes y después de la diferenciación sexual de la gónada del embrión de pollo.

Merchant-Larios y colaboradores (1984b), analizaron las etapas iniciales de la morfogénesis gonadal en las aves en condiciones experimentales donde se impidió el desarrollo del mesonefros y se vió que al igual que en otros vertebrados, la gónada inicia

con la formación de una cresta gonadal que tiene dos tipos celulares diferentes: a) células epiteliales y b) células del mesenquima laxas, provenientes del área mesonéfrica.

El establecimiento de la gónada indiferenciada como tal no se ha descrito en las aves, sin embargo, en el ratón se ha visto que el epitelio celómico está separado claramente por vasos sanguíneos y por una lámina basal que es discontinua, lo que permite que tanto las células somáticas como las CGPs pasen a través de ésta (Merchant-Larios, 1978). Las células que forman el blastema gonadal (células epiteliales y CGPs) empiezan a condensarse y los vasos sanguíneos proliferan para formar los cordones sexuales, la gónada estructurada de esta forma recibe el nombre de gónada indiferenciada (Merchant-Larios, 1984a).

2.2.3 Diferenciación sexual gonadal

En las aves machos, el epitelio celómico deja de proliferar y las CGPs migran hacia los cordones sexuales (Merchant-Larios, 1984b), los cuales contienen a las células de Sertoli y a las CGPs, y entre estos se localizan las células de Leydig. Posteriormente, los cordones sexuales se separan de la corteza por la invasión de vasos sanguíneos y mesénquima proveniente de la región mesonéfrica, lo que da lugar a la túnica albúginea (Merchant-Larios, 1984b). Al completarse la diferenciación de las células de Sertoli, éstas comienzan la producción de la AMH (Münstemberg y Lovell-Badge, 1991), la cual, como su nombre lo indica, induce la regresión de los conductos del mismo nombre.

Las gónadas de las aves hembras se desarrollan asimétricamente; el ovario izquierdo crece más que el derecho y éste último finalmente sufre una regresión. En la gónada izquierda se diferencian dos regiones topográficas que en las aves están bien definidas: *la corteza y la médula*. El epitelio de la corteza de la gónada derecha pierde su arreglo

histológico y se transforma en una delgada capa de células planas separadas de los cordones epiteliales (Merchant-Larios, 1984b). Estudios realizados en el pollo indican que este proceso de diferenciación de las gónadas se inicia a los 6.5 di (Yoshida y cols., 1996).

Esta etapa comprende también la diferenciación ó involución de uno de los dos tipos de conductos llamados de Müller ó de Wolff (Figura 2), los cuales darán lugar a las estructuras sexuales secundarias. La producción de testosterona en las células de Leydig hace que los conductos de Wolff se diferencien en epidídimo, vaso deferente y las vesículas seminales; la conversión de esta hormona en 5α dihidrotestosterona permite que se diferencien los genitales externos.

El conducto de Müller se desarrolla en oviducto y útero. En esta especie se ha detectado la presencia de AMH en los embriones de pollo hembras (Hutson y cols., 1981), sin embargo, esto no afecta el desarrollo del conducto izquierdo de Müller, y se ha propuesto que esto se debe a que los estrógenos lo protegen, al impedir que la AMH se una a sus receptores presentes en el conducto de Müller (MacLaughlin y cols., 1983).

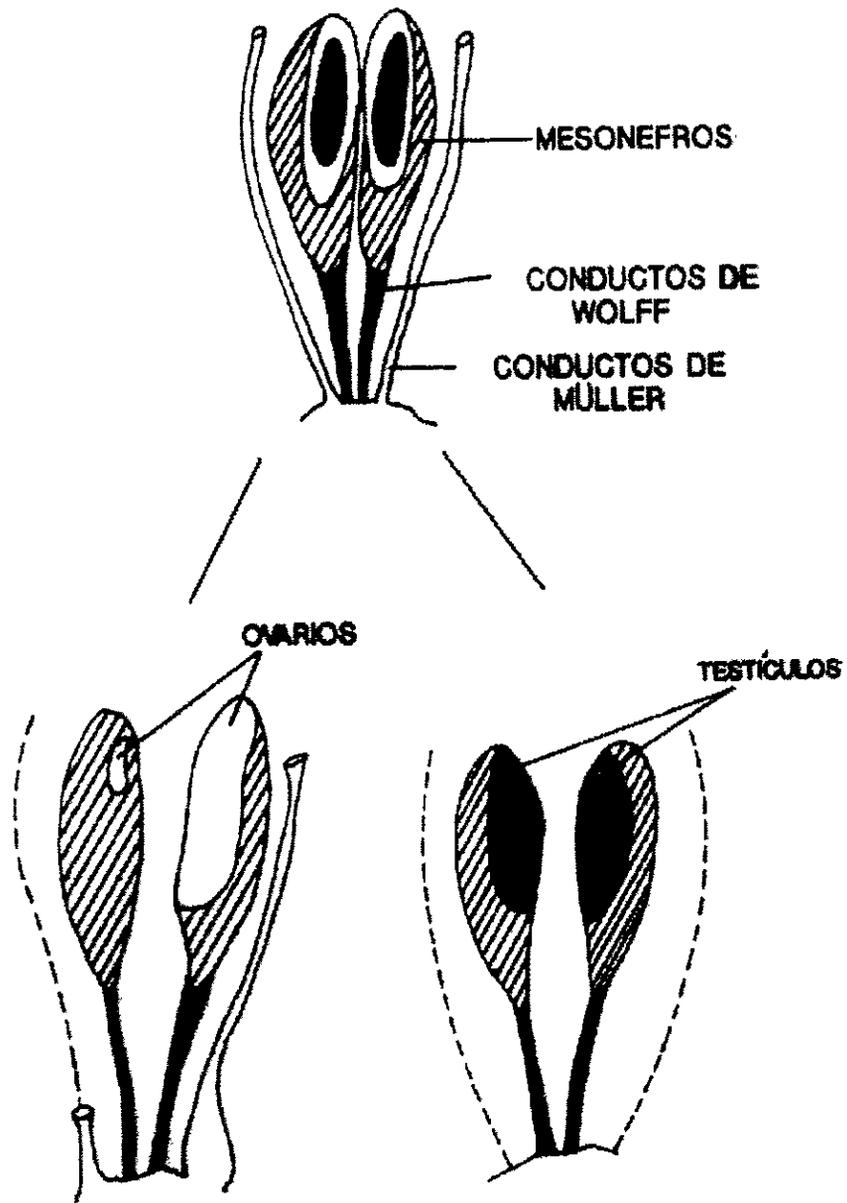


Figura 2. Diferenciación gonadal del embrión de pollo. En el esquema se aprecia a) el sistema de conductos de Müller y de Wolff y los tejidos que constituyen la gónada indiferenciada y b) las gónadas de las aves hembras y machos después de la diferenciación sexual.

2.3 Modulación epigenética del sexo

Los estrógenos son hormonas críticas para la diferenciación del ovario en las aves. Algunos estudios han demostrado que las gónadas embrionarias de pollo pueden sintetizar esteroides, incluyendo el estradiol, durante la diferenciación gonadal (Haffen, 1975; Scheib, 1983), y también que la gónada femenina es más activa esteroidogénicamente que la del macho (Imataka y cols., 1988).

La administración exógena de estrógenos puede feminizar las gónadas de embriones machos (Wolf y Ginglinger, 1935), mientras que el tamoxifén, que es un antagonista del estrógeno produce reversión sexual en las hembras genéticas (Maraud y Vergnaud, 1986). El tratamiento a embriones hembras con inhibidores de la aromatasas, enzima que sintetiza los estrógenos, induce la formación de testículos (Elbrecht y Smith, 1992). Estudios sobre el ARN mensajero del receptor a estrógenos en embriones de pollo (Smith y cols., 1997) demostraron que ambos sexos expresan transcritos de éste antes de la diferenciación gonadal, a partir de los 4.5 d.i., lo que implicaría que las gónadas indiferenciadas desarrollan la capacidad de responder a estrógenos. Estos autores plantean que sin embargo, la capacidad de sintetizar estrógenos es específica de las hembras y se da al diferenciarse la gónada femenina.

2.4 Establecimiento del eje hipotálamo-adenohipófisis-gónada

Los componentes del eje HAG funcionan independientemente durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario en los vertebrados, y la integración funcional de este eje endócrino ocurre solamente en las etapas finales del desarrollo (Willier, 1955).

En las aves, se ha comprobado que el eje HAG es funcional a partir del último tercio del desarrollo (Fugo, 1940 y Vogel, 1957) y la maduración funcional de éste parece ocurrir en tres etapas (Woods y cols., 1981a):

1. *Etapa de autonomía gonadal*: la síntesis y secreción de hormonas esteroides es funcionalmente independiente de la regulación hipotálamo-hipófisis.
2. *Etapa de regulación adenohipófisis-gónada*: el desarrollo gonadal se vuelve dependiente de gonadotropinas como la HL.
3. *Establecimiento del eje HAG*: hay una dependencia funcional, así como una interdependencia entre el hipotálamo y la adenohipófisis-gónada.

En el día 13 de incubación, en el embrión de pollo macho, la HL inicia la regulación de la síntesis y secreción de la testosterona en los testículos. Los niveles plasmáticos de ésta hormona alcanzan un valor máximo a los 13.5 d.i., estableciéndose la fase de alimentación positiva del eje adenohipófisis-gónada. Los altos niveles de testosterona provocan que la concentración de HL en el plasma disminuya inmediatamente después de los 13.5 d.i. iniciándose la fase de retroalimentación de este eje endócrino. El hipotálamo regula la secreción de HL en la adenohipófisis en el último tercio del desarrollo embrionario del pollo por la acción de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (GnRH) (Woods, 1987).

En los embriones de pollo hembras, hay evidencias de que las gonadotropinas de la adenohipófisis inician el control de la síntesis y secreción de estrógeno en los ovarios en el día 13.5, ya que Woods y Erton (1978) demostraron que los niveles de 17β -estradiol permanecen constantes en el ovario izquierdo desde los 6.5 hasta los 12.5 d.i. y después

aumentan marcadamente de los 13.5 a los 18.5 d.i. Así mismo, Woods y Brazzill (1981b) encontraron que los niveles de 17β -estradiol en el plasma presentan un perfil bifásico, idéntico al encontrado en los ovarios anteriormente. Estos resultados indican que el aumento en la síntesis y secreción de 17β -estradiol en los ovarios a partir de los 13.5 d.i. refleja la iniciación de la fase de alimentación positiva del eje adenohipófisis-gónada (Woods y cols., 1987).

2.5 La familia de los genes SOX

La familia de los genes SOX comprende a un grupo de proteínas caracterizadas por la presencia también de una caja HMG que tiene por lo menos 50% de homología en su secuencia con la caja HMG del Sry de ratón (Gubbay y cols., 1990, Denny y cols., 1992). El nombre de estos proviene del inglés (Sry-like Box), constituyen una familia grande de genes que codifican para factores de transcripción putativos (Ner, 1992). Los genes SOX están evolutivamente muy conservados ya que se han identificado genes con secuencias similares en *Drosophila*, reptiles, pájaros y mamíferos (Coriat y cols., 1993, Laudet y cols., 1993).

Por otra parte, los estudios de mapeo de estos genes han demostrado que se encuentran distribuidos al azar por todo el genoma, lo que indica una divergencia temprana de las subfamilias de las proteínas HMG durante la evolución (Pevny y Lovell-Badge, 1997). Los miembros de esta familia muestran un alto grado de conservación intraespecies (Collignon y cols., 1996, Uwanogho y cols., 1995, Kent y cols., 1996) e incluso se han encontrado genes ortólogos para algunos de ellos como es el caso de SOX2 que comparte

un 88% de homología con el gen Sox70D de *Drosophila*, también llamado *Dicheate* ó *fish-hook* (Russell y cols., 1996, Nambu y Nambu, 1996). La única excepción es el Sry ya que se ha detectado muy poca homología en las secuencias que están fuera de la caja HMG, incluso entre especies muy cercanas (Whitfield y cols., 1993, Tucker y Lundrigan, 1993).

Los genes SOX muestran patrones de expresión muy diversos a lo largo de la embriogénesis, donde están relacionados con decisiones tempranas del destino de las células y en una variedad de tejidos adultos, como se aprecia en la tabla 1 (Pevny y Lovell-Badge, 1997).

La expresión de éstos genes no está necesariamente restringida a un tipo celular particular; el gen SOX9 se expresa en las células de Sertoli durante su diferenciación, en condensaciones mesenquimáticas de las extremidades antes de la formación del cartilago y en el SNC (Wright y cols., 1995, Morais da Silva y cols., 1996, Healy y cols., 1996, Kent y cols., 1996). El SOX4 se expresa en el sistema inmune en las células pre-B y pre-T, precursoras de los linfocitos B y T y durante el desarrollo del corazón y del SNC (Van de Wetering y cols., 1993, Schilham y cols., 1996). Esto demuestra que los genes SOX juegan un papel muy importante en el establecimiento del destino de las células, pero el tipo específico de éstas dependerá del tejido en donde estén.

Las proteínas SOX comparten muchas características con factores de transcripción clásicos, el dominio HMG de éstas se une con alta afinidad a la secuencia A/T A/T CAA A/T G (Harley y cols., 1994, Connor y cols., 1994, Collignon y cols., 1996) y se ha visto que varias proteínas, como Sox4, Sox17 y Sox18 de ratón y SOX9 de humano activan la transcripción *in vitro* de construcciones de genes reporteros (Van de Wetering y cols., 1993,

Tabla 1.

GEN	ORTOLOGO	MAPEO	EXPRESIÓN
Grupo A			
SRY	Humano, roedor, marsupial	Humano Y	Cresta genital y testículo
Grupo B			
SOX1	Humano, ratón, pollo	Humano 8	SNC embrionario, cristalino
SOX2	Humano, ratón, pollo	Humano 3	Ectodermo primitivo, SNC, SNP, Intestino embrionario y endodermo
SOX3	Humano, ratón, pollo	Humano X	SNC embrionario
Sox14	Ratón	--	----
ZfSox19	Zebrafish	--	SNC embrionario
Sox15	Ratón	--	----
Sox70D	Drosophila	70D1-2	Blastodermo celular, neuroectodermo ventral y cefálico
Grupo C			
SOX4	Humano, ratón	Humano 6	Corazón y médula espinal embrionaria, células pre-B y pre-T en adulto
SOX11	Humano, ratón, pollo	Humano 2	SNC embrionario, neuronas post-mitóticas ----
SOX12	Humano, ratón	--	----
SOX20	Humano	Humano 17	----
Grupo D			
SOX5	Humano, ratón	Humano 6	Testículo adulto
SOX6	Humano, ratón	--	SNC embrionario y testículo adulto
Grupo E			
SOX8	Humano, ratón	--	----
SOX9	Humano, ratón, pollo	Humano 17, ratón 2	Condrocitos, cresta genital y testículo adulto, SNC, notocorda
SOX10	Humano, ratón	--	----
Grupo F			
Sox-7	Ratón	--	----
Sox-17	Ratón	--	Testículo
Sox-18	Ratón	ratón 2	Corazón, pulmón, músculo esquelético, hígado y cerebro de adulto

Tomada de Pevny y Lovell-Badge. 1997 *Curr Opin Genet Dev* 7:338-344.

Hosking y cols., 1995, Kanai y cols., 1996). Además, éstas proteínas presentan ciertas propiedades que sugieren que funcionan como organizadores de la estructura de la cromatina, ya que su unión al ADN ocurre en el surco menor y esto resulta en la inducción de ángulos en el ADN (Giese y cols., 1992, Werner y cols., 1995, Love y cols., 1995). Esta alteración de la cromatina podría facilitar la interacción de otros factores unidos en sitios adyacentes ó la de complejos nucleoprotéicos distantes con la maquinaria de transcripción basal, (Figura 3). Este fenómeno podría actuar también de manera negativa, al prevenir la unión de factores a los sitios adyacentes del surco mayor (Pevny y Lovell-Badge, 1997).

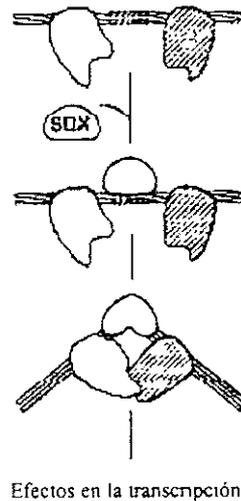


Figura 3. Modelo de acción de las proteínas Sox. Estas inducen un doblamiento en el ADN después de unirse a algunos sitios del mismo y esto pudiera promover interacciones proteína-proteína entre factores unidos a los lados del sitio de unión de las proteínas Sox, lo que podría formar complejos nucleoprotéicos con actividad biológica. Tomada de Pontiggia y cols., 1994 *EMBO J* 13:6115-6124.

Se han encontrado genes blanco de varios genes SOX; por ejemplo la proteína Sox2 y, probablemente Sox1, participan en la regulación de la δ - y γ -cristalina, que se expresa en el cristalino del pollo y del ratón respectivamente (Kamachi y cols., 1995). El SOX4 en humanos transactiva al promotor CD2 en los linfocitos T del sistema inmune (Wotton y cols., 1995) y Sox9 ha sido implicado en la regulación de la expresión del gen de la colágena tipo II durante la condrogénesis del ratón (Ng y cols., 1997, Lefebvre y cols., 1997).

2.6 Aspectos históricos sobre el gen de la diferenciación testicular

2.6.1 El factor determinante del testículo

El mecanismo por el cual el sexo de un individuo es determinado ha sido una de las preguntas más relevantes en la embriología desde la antigüedad. En 1959, varios estudios realizados por Welshons y Russell (1959), Jacobs y Strong (1959) y Ford y cols., (1959a, 1959b) proporcionaron la evidencia de que los factores que determinaban el sexo masculino se encontraban en el cromosoma "Y". A partir de ese momento, comenzó una búsqueda más específica con el propósito de encontrar el gen responsable de la diferenciación del testículo, al cual se le llamó el factor determinante del testículo, TDF (del inglés Testis Determining Factor). Varios genes fueron propuestos como responsables de éste proceso, entre ellos, el antígeno H-Y (Wachtel y cols., 1975) y el gen ZFY (Page y cols., 1987), sin embargo, posteriormente su papel en la diferenciación sexual gonadal se descartó (McLaren y cols., 1984; Goldberg y cols., 1991; Sinclair y cols., 1988; y Palmer y cols., 1989).

2.6.2 Identificación del gen de la diferenciación testicular

En 1990, Sinclair y colaboradores, basándose en los mapas del cromosoma Y de humano que se elaboraron a partir de hombres con problemas de reversión sexual y de mujeres XY, aislaron una zona de 35 kb del brazo corto del cromosoma Y cercana a la región pseudoautosómica. Estos autores subclonaron y probaron esta región contra ADN de humano, bovino y ratón. de 50 clonas obtenidas, solamente una dió resultados positivos para los tres mamíferos (Figura 4). A este gen se le denominó SRY (del inglés Sex-determining Region Y) en humanos y Sry a su homólogo en otras especies. Su presencia fue posteriormente demostrada en 23 grupos, representados por 5 clases de vertebrados que incluyen especies heterocigóticas, con o sin cromosomas sexuales e incluso aquellas que presentan determinación sexual por temperatura (Tiersch, 1991).

Así mismo, se encontraron mutaciones en este gen en mujeres XY con disgenesia gonadal, es decir, los testículos no se desarrollan y los ovarios están formados por bandas de tejido fibroso inerte (Berta y cols., 1990; Jäger y cols., 1990). Los experimentos realizados por Koopman y colaboradores (1991) demostraron que el SRY era el TDF, ellos incorporaron la región conservada del Sry en embriones de ratones XX (hembras) y obtuvieron una reversión sexual, es decir, éstos se desarrollaron como machos aunque se determinó que eran estériles. Estos experimentos hicieron que se postulara al Sry como el único gen del cromosoma "Y" necesario para la determinación del testículo.

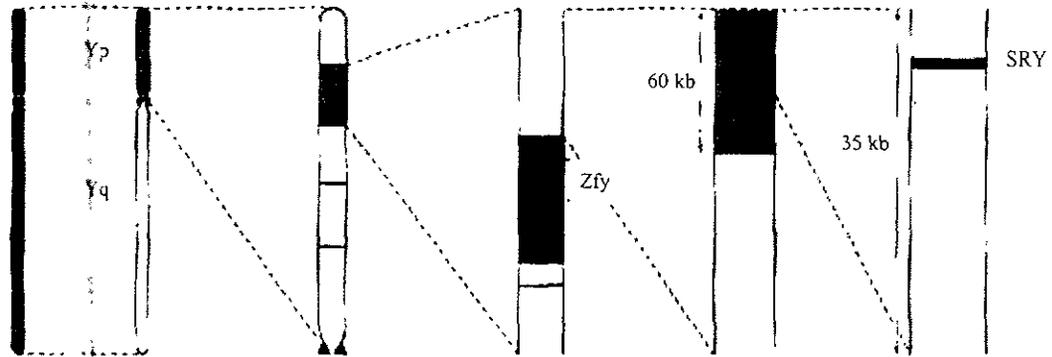


Figura 4. Localización del factor determinante del testículo. Esquema que describe como se identificó el TDF en la región pseudoautosomal del cromosoma "Y" del humano. Tomado de McLaren, A. 1990 *Nature* 351:96.

2.7 El gen Sry

2.7.1 Características generales

El gen SRY/Sry en humanos y ratón codifica para una proteína que se caracteriza por la presencia de un dominio de unión al ADN (caja HMG), el cual se describe más adelante. El gen Sry del ratón se localiza en la parte proximal del brazo corto del cromosoma Y (Capel y cols., 1993a) y el locus consiste de una región de 2739 pares de bases (pb) con un marco de lectura abierto y que está flanqueado por una secuencia invertida repetida de 17 kb (Gubbay y cols., 1992). El transcrito está formado por un sólo exón linear de un poco menos de 5 kb (Hacker y cols., 1995) y se utilizan 3 ó 4 sitios para iniciar la transcripción. En la figura 5 se observa una comparación del gen Sry de ratón con el de humano.

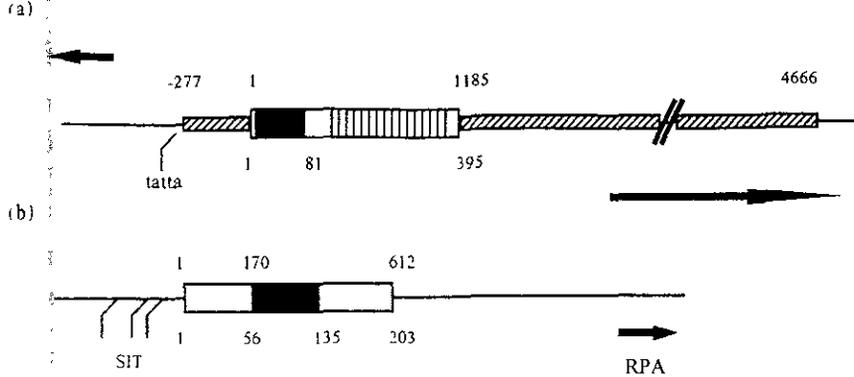


Figura 5. Comparación entre el loci, los transcritos y la proteína del Sry de ratón y el SRY de humano. El gen de ratón (a) se localiza entre una secuencia invertida repetida (flechas), el gen del humano (b) se localiza a 5 kb de la región pseudoautosomal (RPA). Los números indican la posición de los nucleótidos ó de los aa. tatta y SIT señalan los sitios de iniciación de la transcripción, el bloque negro en las proteínas indica la caja HMG y el bloque de rayas verticales en la proteína de ratón representa las secuencias repetidas de glutammas. Adaptada de Lovell-Badge y Hacker, 1995 *Phil Trans R Soc Lond B* 350:205-214.

2.7.2 Dominio de unión al ADN

La caja HMG es un elemento de unión al ADN que se encuentra en varias proteínas eucariotas (Jantzen y cols., 1990). El análisis de su secuencia indica que es una región de aproximadamente 70 aa con una carga neta positiva. La estructura general predicha es de dos alfa hélices hidrofílicas que componen la mitad carboxi-terminal (C-terminal) y una probable cadena beta plegada de carácter hidrofóbico en el extremo amino-terminal (N-terminal) (Bianchi y cols., 1992).

Las cajas HMG se pueden dividir en tres subgrupos (Ferrari y cols., 1992):

- a) Proteínas relacionadas con HMG1 (Kolodrubetz, 1990) que son componentes estructurales de la cromatina de todos los eucariotes.
- b) Proteínas que actúan como factores de transcripción de la ARN polimerasa I y polimerasas de ARN mitocondrial, como hUBF (Jantzen y cols., 1990).

c) Reguladores transcripcionales, como lo son: LEF1 (Travis y cols., 1991) y Sry (Gubbay y cols., 1990, Sinclair y cols., 1990).

Las cajas HMG interaccionan con el ADN de dos maneras: a) las que detectan formas estructurales del ADN y b) las que reconocen secuencias específicas del mismo (Ferrari y cols., 1992). La caja HMG del Sry reconoce la secuencia A/TAACAAT (Harley y cols., 1992, 1994) y su interacción con el ADN ocurre a través del zurco menor (Giese y cols., 1994). Al unirse, dobla el ADN formando un ángulo de aproximadamente 80° (Ferrari y cols., 1992) y se cree que este evento da lugar a la regulación transcripcional de los genes "blanco" del Sry.

2.7.3 Aspectos evolutivos

Aunque el Sry es un gen importante en la regulación de la determinación sexual, su análisis ha demostrado que evoluciona muy rápidamente. Los datos comparativos de poblaciones y los estudios del locus del Sry muestran una evolución muy rápida del gen entre especies y muy poca o ninguna variación intraespecie (Tucker y Lundrigan, 1995). La única región conservada de la proteína es la caja HMG y las secuencias que no forman parte de ésta tienen una tasa muy alta de sustituciones no-sinónimas de nucleótidos (Whitfield y cols., 1993; Tucker y Lundrigan, 1993). Se han comparado las secuencias del Sry entre marsupiales (Infraclasse Metateria) y mamíferos placentarios (Infraclasse Euteria), los cuales divergieron hace aproximadamente 150 millones de años y sin embargo, presentan el mismo tipo de diferenciación sexual (basado en la presencia del cromosoma Y) y se observó que la homología de la caja HMG es muy alta entre estas dos Infraclasses y fuera de esta región el resto del gen no presenta homología (Foster y cols., 1992).

Whitfield y cols. (1993) propusieron que la variación de éste gen contribuye a la especiación. Por otro lado, Hurst (1994) planteó que el locus del SRY estaría involucrado en un conflicto intragenómico entre el cromosoma Y y el resto del genoma, lo cual seleccionaría cambios en los genes involucrados. Veitia y cols. (1997) analizaron las secuencias localizadas en la región 5' del Sry de varios primates y encontraron motivos altamente conservados que podrían jugar un papel muy importante en el control de la expresión de éste gen al actuar como amplificadores. Los descubrimientos de Poulat y cols. (1997) acerca de la región carboxi-terminal del SRY sugieren que la tasa tan alta con la que evoluciona el SRY podría deberse no a una falta de función de la parte C-terminal de éste gen sino a una coevolución entre el SRY y otra proteína.

Estudios basados en las secuencias de humano y de marsupiales de los homólogos del gen Sox3 de ratón (Stevanovic y cols., 1993; Foster y Graves, 1994) han hecho que se proponga que el gen Sry se originó a partir de Sox3, ya que este se localiza en el cromosoma X de ambos mamíferos. Estos datos, aunados a otros estudios donde se ve la expresión de éste gen en la cresta genital durante la diferenciación sexual masculina (Collignon y cols., 1996) no son definitivos y no se descarta la posibilidad de que el Sry tenga otro origen, aunque actualmente el gen Sox3 se mantiene como el candidato más fuerte del precursor del Sry.

2.7.4 Expresión tisular

El Sry en el ratón se expresa en la gónada, sin embargo, tiene una amplia expresión en tejidos de marsupiales (Harry y cols., 1995) y en el humano en tejidos embrionarios como cerebro, hígado, tejido adrenal, gónadas, páncreas, intestino delgado, timo, bazo y corazón, así como en tejidos del adulto (corazón, hígado, riñón y testículo) (Clepet y cols.,

1993). Los principales sitios de expresión del Sry en el ratón son: a) en la cresta gonadal durante la diferenciación testicular en las células pre-Sertoli, donde se detecta un transcrito lineal a los 10.5 dpc cuya expresión se mantiene hasta los 12 dpc (Hacker y cols., 1995, Lee y Taketo, 1994 y Jeske y cols., 1995), y después empieza a declinar hasta desaparecer a los 13.5 dpc (Jeske y cols., 1996) y b) en el testículo adulto en las espermatogonias pre y postmeióticas, así como en algunas células somáticas (Zwingman y cols., 1993) donde se transcribe en formas circulares (Capel y cols., 1993b). Por otra parte se ha reportado la expresión de transcritos lineales y circulares de este gen en embriones de ratón en la etapa de preimplantación (Zwingman y cols., 1993, Boyer y Erickson, 1994, Cao y cols., 1995) aunque la relevancia biológica que tiene la expresión del Sry en esta etapa así como en la adulta, no ha sido determinada.

2.7.5 Estructura de la proteína del Sry

La proteína del Sry del ratón consiste de un dominio N-terminal de 2 aa, seguido por el dominio de la caja HMG de 79 aa y por último un dominio C-terminal de 314 aa, el cual está compuesto de una región rica en glutaminas e histidinas altamente repetitiva. La proteína predicha para el humano consiste de un dominio N-terminal de 56 aa, el dominio HMG de 79 aa, y el dominio C-terminal de 68 aa (Clepet y cols., 1993). La única región de homología entre la proteína de ratón y de humano es la caja HMG, no hay ninguna similitud entre los extremos N- y C-terminales y no hay una región rica en glutamina en la proteína de humanos (Hacker y cols., 1995). Este tipo de regiones se encuentran en factores de transcripción y la ausencia de ésta en el SRY de humanos podría explicar por que los ratones transgénicos para el gen SRY de humano no muestran ningún fenotipo de reversión sexual (Koopman y cols., 1991). Quizá esta región es importante en el ratón para

interacciones entre proteínas y por lo tanto promueve la activación ó represión de genes más adelante en la cascada de regulación (Nordqvist, 1995; Poulat y cols., 1997).

Werner y cols. (1995) determinaron por resonancia magnética nuclear la estructura terciara del complejo SRY-ADN. La caja HMG del SRY forma una "L" torcida y está compuesta por tres hélices, el brazo largo de la "L" está formado por la hélice 3 y el extremo N-terminal, el brazo corto está formado por las hélices 1, 2 y el extremo C-terminal.

El dominio HMG del SRY incluye una secuencia común de las proteínas de unión a calmodulina (CaM). Harley y cols. (1996) demostraron que la unión calcio-dependiente del SRY a CaM, provoca un cambio conformacional en el SRY y es específicamente inhibida por un fragmento de ADN que contiene la secuencia consenso que reconoce la caja HMG. Estos datos sugieren que la CaM podría regular la actividad del dominio de unión del SRY al ADN, además la proteína HMG1 también se une a la CaM por lo que éste fenómeno pudiera ser una característica de la familia de las cajas HMG.

Poulat y cols. (1997) encontraron que los últimos 7 aa de la parte carboxi-terminal del SRY forman un dominio que se une a la proteína SIP-1 (del inglés SRY Interacting Protein 1), mediante uno de los dos dominios PDZ (nombrados así por las proteínas PSD-95, Disc-large y Zo-1) que contiene ésta, los cuales están formados por 80 aa y han sido descritos como módulos mediadores en las interacciones entre dos proteínas (Niethammer y cols., 1996). Se ha propuesto que la proteína SIP-1 podría contribuir a la unión de dos moléculas del SRY ó de una molécula del SRY con un factor de transcripción, el cual pudiera proveer al SRY de un dominio de transactivación, del cual carece (Laudet y cols., 1993;) ó, probablemente el SRY podría pertenecer a un complejo nucleoproteico. Estos datos demuestran que las partes fuera de la caja HMG sí tienen un papel funcional.

2.7.6 El Sry en las aves

En las aves el sexo heterogamético son las hembras (ZW), y hay evidencias de que el cromosoma W se requiere para el desarrollo del tejido ovárico, y que la dosis de cromosomas Z parece influir en el desarrollo testicular (Lin y cols., 1995).

Se ha propuesto la existencia de un homólogo del Sry en las aves, y se han realizado algunos estudios para identificarlo basándose en el PCR, amplificando ADN genómico ó partiendo de ARN total y utilizando oligonucleótidos degenerados basados en la caja HMG del Sry (Griffiths, 1991; Coriat y cols., 1993; McBride y cols., 1997) y aunque no se ha logrado identificar un homólogo del Sry, se han encontrado varias secuencias relacionadas al Sry (Sox). Entre los genes Sox localizados en el pollo, los estudios realizados (Kent y cols., 1996; Morais da Silva y cols., 1996) demostraron que el gen Sox9 se expresa durante la diferenciación gonadal, en los embriones de pollo machos, a los 6.5 d.i. y que la localización de este gen es autosómica.

Estos datos hablan de la importancia de este gen en el desarrollo testicular de los vertebrados, y aunque Sox9 es el primer gen específico para el desarrollo de los machos detectado en las aves, no se le puede atribuir un rol determinante en la diferenciación sexual del pollo, ya que el fenotipo de macho representa la vía que se sigue normalmente en la diferenciación sexual de las aves.

2.8 Cascada de regulación en la diferenciación sexual del testículo

Se ha propuesto que el Sry actúa como un promotor del encendido y apagado de genes en el desarrollo al iniciar una cascada de expresión que lleva a la diferenciación testicular. Sin embargo, el mecanismo por el cual la proteína Sry lleva a cabo este proceso

no se conoce, aunque se asume que afecta la transcripción de genes "blanco" más adelante en la vía de la diferenciación sexual masculina. Los experimentos de cotransfección *in vitro* han demostrado que la proteína Sry tiene la habilidad de activar la transcripción mediante la unión de la caja HMG a las secuencias del ADN mencionadas anteriormente y que se encuentran en los promotores de los supuestos genes blanco (Haqq y cols., 1993; Cohen y cols., 1994; Dubin y Ostrer, 1994) aunque *in vivo* no se han encontrado genes que sean activados por Sry.

2.8.1 Hormona inhibidora de los conductos de Müller

El gen de la AMH codifica para una de las dos hormonas involucradas en la diferenciación sexual masculina. Su expresión en el ratón es inicialmente detectada en la gónada los 11.5 dpc y su expresión se mantiene hasta los 7 dpp, a partir de esa fecha declina hasta llegar a niveles basales a los 43 dpp (Münsternberg y Lovell-Badge, 1991). Debido a los perfiles de expresión de la AMH y del Sry en el ratón, se propuso que éste último podría activar a la AMH *in vivo* durante la determinación sexual (Haqq y cols., 1993), sin embargo, estudios posteriores sugirieron que otro gen, denominado SF-1 podría estar involucrado en éste proceso (Haqq y cols., 1994; Shen y cols., 1994). También se propuso que la AMH regulaba negativamente la expresión de Sry, sin embargo ésta teoría se descartó dado que ratones mutantes en el gen de la AMH no presentan alteraciones en el patrón de expresión del Sry (Jeske y cols., 1996).

2.8.2 El factor esteroideogénico 1

El SF-1 es un miembro de la familia de receptores nucleares a hormonas que carece de ligando el cual regula la expresión de las hidroxilasas en células corticales adrenales, células de la teca y de Leydig (Lala y cols., 1992; Honda y cols., 1993). Ratones deficientes del SF-1 no desarrollan tejido gonadal, ni glándulas adrenales y mueren a los 8 dpp debido a insuficiencia adrenocortical (Luo y cols., 1994), lo cual demuestra la importancia de éste gen en el desarrollo. Estudios recientes (Giuli y cols., 1997) sobre la expresión de la AMH y sobre el promotor de este gen muestran que SF-1 activa a la AMH *in vivo* en las gónadas embrionarias masculinas y también en las gónadas postnatales de ambos sexos. Sin embargo, la expresión de SF-1 se detecta desde los 9 dpc en la cresta genital, en contraste con la AMH que se expresa desde los 12.5 dpc, lo cual sugiere funciones adicionales para el SF-1.

2.8.3 Gen Sox9

Se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 del ratón, tiene 2 intrones (Wright y cols., 1995) y además de la caja HMG tiene un dominio de activación cercano a una región rica en poliglutaminas y prolina (Südbeck y cols., 1996). Este gen se expresa durante la embriogénesis en el cartílago y, mutaciones en él, producen displasia campomélica en los humanos (DC) (Foster y cols., 1994; Wagner y cols., 1994), es un síndrome de malformación esquelética y en algunos casos se presentan diferentes grados de reversión sexual en pacientes genéticamente machos. Estos estudios no sólo confirman el papel de Sox9 en la DC sino que lo colocan en la vía de la determinación sexual masculina (Capel, 1995; Sinclair, 1995). Estudios de Sox9 en embriones de ratón y pollo mostraron un patrón de expresión, específico para machos, en la cresta genital durante la diferenciación gonadal

(Kent y cols., 1996; Morais da Silva y cols., 1996). Específicamente en el embrión de pollo, este gen se expresa en ambos sexos antes de la diferenciación gonadal y a los 6.5 d.i. deja de expresarse en las hembras y lo sigue haciendo en los machos. La presencia de este patrón de expresión en ambas especies implica que Sox9 se ha conservado en la vía de la determinación testicular de los vertebrados.

Hipótesis:

En las aves, como en los demás vertebrados, existen genes de la familia Sox involucrados en el desarrollo de la gónada. Es posible que alguno de ellos este ligado al sexo y tenga una expresión diferencial durante la diferenciación sexual gonadal.

IV. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar si se encuentran genes que contengan la secuencia del dominio HMG en hembras y machos del pollo White Leghorn y si éstas son específicas del sexo.

4.2 Objetivos particulares

- a) Obtener una sonda de la caja HMG del Sry, con la técnica de PCR.
- b) Demostrar la presencia de secuencias de la familia de genes Sox en el embrión de pollo por la técnica de Southern blot.
- c) Determinar la expresión de estas secuencias en las gónadas del embrión de pollo con la técnica de Northern blot a los 6.5, 13.5, y 20 d.i..

V. Material y Métodos

5.1 Material biológico

Se utilizaron huevos fértiles de la cepa White Leghorn procedentes de la granja Aves Libres de Patógenos Específicos (ALPES) y se incubaron a 37°C y 80% de humedad en una incubadora marca James MFG Co. Los tiempos de incubación fueron de 6.5, 8, 13.5, y 20 d.i., correspondientes a las etapas de desarrollo 27-28, 31, 39 y 45 respectivamente (Hamburger y Hamilton, 1951).

Para obtener la sonda del Sry, se utilizó un ratón macho adulto de la cepa CD1 del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB). Como controles de los experimentos de hibridación se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa B6, pertenecientes a la colonia de la Dra. Irma Villalpando Fierro (IIB), de 7 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron bajo condiciones de luz-obscuridad en períodos 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.

a) Ovoscopia

Esta técnica se empleó para evaluar el desarrollo y la viabilidad de los embriones de pollo y consiste en observar el huevo en el día de incubación deseado a contraluz de una lámpara en un cuarto oscuro. En los primeros días se observa una red de vasos sanguíneos que es indicativa del desarrollo del embrión y más adelante se distingue al embrión mismo en el punto donde convergen todos los vasos sanguíneos.

b) **Dis**sección y almacenamiento del tejido

• **Embriones de pollo:** éstos se extrajeron del huevo haciendo un corte circular en el extremo de la cámara de aire, se retiró la membrana papiracea y se colocaron en una caja de Petri estéril. Los embriones se decapitaron y se realizó un corte diagonal para exponer el sistema urogenital (Figura 6).

Ratón: Los ratones adultos se sacrificaron por dislocación cervical, se les aplicó en el abdomen una solución de benzal:etanol (1:1) y se realizó un corte en "v", se retiraron los intestinos y se extrajeron las gónadas.

Las gónadas tanto de pollo como de ratón, se disectaron, se pusieron en medio MEM (minimal essential medium) de Gibco BRL, y se enjuagaron con NaCl al 0.9%. El tejido se puso en un tubo Eppendorf estéril tratado con H₂O-DEPC y se almacenó a -70°C en un ultracongelador Forma Scientific, modelo 8416, hasta que se utilizó para la extracción de ADN o ARN total. El H₂O-DEPC se preparó de la siguiente manera: a 1 litro de agua bidestilada se le agregó 1 ml de DEPC y se disolvió, después de 24 horas el DEPC se inactivó en un autoclave con una presión de 15 libras/pulgada durante 80 min. Para tratar los tubos, éstos se agregaron a la solución después de disolver el DEPC y se dejaron 24 horas para después meterlos al autoclave junto con el H₂O-DEPC.

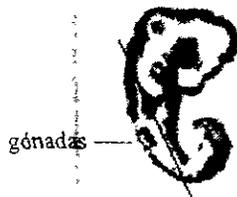


Figura 6. Embrión de pollo. En el esquema se observa un embrión de 6.5 d.i. La raya transversal indica la posición postero-caudal en la que se encuentran las gónadas y el corte que se hace para exponer estos órganos y poder aislarlos.

5.2 Identificación del sexo

El sexo de los embriones de 8 a 20 d.i., así como el de los ratones, se determinó bajo un microscopio estereoscópico con base en la diferenciación morfológica de las gónadas. Los embriones de pollo de 6.5 d.i. se sexaron siguiendo la técnica de hibridación puntual descrita por Nishioka (1988). En el momento de extraer las gónadas embrionarias, se separó un pedazo de tejido del embrión (corazón e intestinos) y se almacenó a -20°C hasta que se procesaron las muestras. Se descongeló el tejido, se le añadieron 500 μl de buffer SET (Tris 0.5 M, EDTA 0.5 M) y se homogeneizó con un pistilo estéril. Se le agregaron 25 μl de SDS al 10% y 2.5 μl de Proteinasa K de Boehringer Mannheim (10 mg/ml) y se incubó a 60°C dos horas en un baño Eppendorf, modelo Thermomixer 5436. Se tomaron 5 μl del tubo y se colocaron en el cuadro correspondiente (1 cm^2) de una membrana Hybond N+ de nylon cargada positivamente y previamente cuadrículada de Amersham. La membrana se homeó a 80°C con vacío dos horas en un horno de Precision Scientific modelo 5831. Se dejó 15 min con solución desnaturizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) y otros 15 min con solución neutralizante (NaCl 1.5 M, 0.5 M Tris/HCl, pH 7.2, EDTA 0.001 M). Después la membrana se prehibridó dentro de una bolsa de plástico sellada por calor con 10 ml de la solución de prehibridización (Sulfato de Dextran al 5%, Formamida al 50%, NaCl 1 M, SDS al 0.5%) y 0.2 mg/ml de esperma de salmón desnaturizado 5 min a 95°C y se dejó prehibridizando toda la noche a 44°C en un baño Baxter, modelo Durabath.

Al día siguiente, se hibridó con 5×10^6 c.p.m. de la sonda específica del Cromosoma W marcada con $\alpha^{32}\text{P}$ dATP (ver más adelante), previamente desnaturizada 5 min a 94°C y se dejó incubando toda la noche a 44°C en el mismo baño. Luego se lavó 2 veces 15 min a

temperatura ambiente con SSC 2X, tomado de una solución stock de SSC 20X (NaCl 3 M, Citrato de Sodio 0.3 M), una vez 15 min a 65°C con una solución de SSC 2X y SDS al 0.1% y 15 min a 65°C con una solución de SSC 0.2X y SDS al 0.1%. La membrana se colocó entre dos hojas blancas limpias para secarla, se montó dentro de un cassette con pantallas amplificadoras marca DuPont, modelo Cronex Lightning Plus-T con una placa de rayos X debajo de la membrana. Se cerró el cassette y se dejó exponiendo a -70°C toda la noche y se reveló la placa.

5.3 Aislamiento del ADN

El tejido embrionario, previamente almacenado a -70°C se descongeló, se hicieron grupos de cada edad, se le agregaron 500 µl de buffer SET a cada uno y se homogenizaron en un homogenizador marca Tri-R Instruments, modelo 563C, con un pistilo de punta de teflón marca Weathon. En el caso del tejido de ratón, éste se homogeneizó en 5 ml de buffer SET y las cantidades de las otras soluciones se ajustaron con respecto a este volumen inicial. Una vez homogeneizado el tejido, se le añadió 25 µl de una solución al 10% de SDS y 2.5 µl de Proteinasa K, se agitó en un vortex marca Lab Line modelo Mistral Mixer 1192 y se incubó a 60°C una hora en un baño Eppendorf, modelo Thermomixer 5436. Después se le agregaron al tubo 200 µl de fenol saturado con TRIS, se mezcló en el vortex y se centrifugó a 14,000 r.p.m. 2 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se colectó con una pipeta Pasteur estéril, se colocó en un tubo Eppendorf estéril y se repitió la extracción con el fenol. A la fase acuosa se le agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (0.5:24:1), se agitó en el vortex y se centrifugó del mismo modo que las veces

anteriores. El sobrenadante se colectó con una pipeta Pasteur estéril y se pasó a otro tubo Eppendorf, al que se le añadió un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en el vortex y se centrifugó. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se le agregó 20 μ l de NaCl 5M. se mezcló 10 segundos y se le añadió el doble del volumen de la fase acuosa de etanol al 95%; se esperó 5 segundos y se mezcló, invirtiendo el tubo, hasta que se formó la hebra de ADN, la cual se tomó con un rodillo de vidrio y se pasó a un tubo limpio. Se le añadieron 150 μ l de agua estéril para disolver al ADN y se repitió la precipitación con el NaCl y el etanol al 95%. El rodillo con el ADN se metió a un tubo Eppendorf que tenía 250 μ l de etanol al 50% para lavarlo y después se pasó a otro tubo al cual se le agregaron 10 μ l de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) para disolver el ADN, se retiró el rodillo y se guardó el tubo a -20°C .

5.4 Aislamiento del ARN

Se empleó la técnica reportada por Chomczynski y Sacchi (1987) para aislar el ARN total de las gónadas de pollo de las edades ya mencionadas, así como de las gónadas de ratones hembras y machos de 7 semanas de la cepa B6. El tejido embrionario que se disecó previamente se descongeló, se hicieron pools de acuerdo al sexo de cada edad e inmediatamente se le añadieron 500 μ l de solución D, que se preparó a partir de la solución stock de Tiocanato de Guanidina (Tiocanato de Guanidina 4 M, Citrato de Sodio 25 mM, pH 7. Sarcosyl al 0.5% y β -mercapto-etanol 0.1 M), tomando 5 ml de ésta y 36 μ l de β -mercapto-etanol y se homogeneizó en un homogenizador marca Tri-R Instruments, modelo

563C, con un pistilo de punta de teflón marca Weathon. Posteriormente, se agregaron secuencialmente: 50 µl de acetato de sodio 2M pH 4, 500 µl de fenol saturado con H₂O-DEPC y 100 µl de una solución 49:1 de cloroformo-alcohol isoamílico recién preparada y agitando la muestra en el vortex después de agregar cada solución. Luego de mezclarla bien y observar que se forma una emulsión, se dejó en hielo 15 min y se centrifugó a 14,000 r.p.m. 20 min a 4°C en una centrifuga Eppendorf modelo 5402. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se le agregó un volumen igual de isopropanol, se mezcló 10 segundos con la mano y se puso en hielo seco para precipitar el ARN total media hora. Después se centrifugó la muestra igual que la primera vez y se decantó la fase acuosa, el botón del precipitado se resuspendió en 150 µl de solución D y se volvió a precipitar con un volumen igual de isopropanol 30 min en hielo seco y a centrifugar a 14,000 r.p.m. 20 min a 4°C. El tubo se decantó y se colocó boca abajo sobre una gasa estéril para eliminar todo el isopropanol. Finalmente la muestra se lavó tres veces de la siguiente manera: se agregaron 500 µl de etanol al 75%, se centrifugó la muestra a 14,000 r.p.m. por 10 min a 4°C y se decantó el etanol con una gasa estéril. Se colocó el tubo en un desecador media hora para secar el botón de ARN total, se resuspendió en H₂O-DEPC y se almacenó a -70°C por un periodo máximo de una semana.

5.5 Cuantificación de los ácidos nucleicos

Para cuantificar la cantidad de ADN recuperado, se tomó 1 μl de la muestra y se diluyó en 999 μl de agua estéril, se colocó la dilución en una celda para espectrofotómetro de cuarzo marca SIGMA y se leyó en un espectrofotómetro de Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 3000 con luz UV a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm.

Para cuantificar la cantidad de ARN recuperado, se tomaron 2 μl de la muestra y se diluyeron en 798 μl de H_2O -DEPC, la dilución se puso en la cubeta de cuarzo antes descrita y se leyó en las mismas condiciones que el ADN.

5.6 Sondas empleadas en la detección del ADN

a) Sonda del cromosoma W de las aves

Para obtener la sonda del cromosoma W se digirió el plásmido pUGD1201, amablemente donado por el Dr Akira Ogawa de la Universidad de Tohoku en Japón, con la enzima EcoRI. Este plásmido contiene una unidad repetitiva de 1.2 kb específica del cromosoma W de las aves, la cual fue insertada en el sitio de restricción EcoRI del plásmido pUC9. La reacción de digestión estándar consiste en poner en un tubo Eppendorf tratado con DEPC y estéril: 1 μg de ADN, 2 μl del buffer React 3 (GIBCO BRL), 0.2 μl de la enzima EcoRI (GIBCO BRL), y agua destilada estéril para llegar a un volumen final de 20 μl . La digestión se corrió en un gel de agarosa al 1.5% a 100v 60 min en buffer TBE 1X preparado a partir de una solución 5X de TBE (Tris 89 mM, Acido Bórico 89 mM y EDTA 2.5 mM, pH 8) y se tiñó 10 min con una solución de bromuro de etidio (BrEt) de 0.04 mg en 50 ml de agua bidestilada, se observó en el transiluminador y se cortó la banda que

contiene a la sonda del cromosoma W, correspondiente a 1,200 pares de bases. A continuación se electroeluyó colocando la banda de agarosa dentro de una bolsa de diálisis, marca Spectrum Medical Industries, modelo Spectra/Por molecularporous membrane tubing, junto con 500 µl de Buffer TBE 1X. Esta se colocó dentro de la cámara de electroforesis con buffer TBE 1X y se corrió a 100 volts 10 min. Se recuperaron los 500 µl de buffer TBE de la bolsa de diálisis y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril, se agregaron 15 µl de NaCl 5M y 1 ml de etanol absoluto y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó el tubo a 14,000 r.p.m. 20 min a 4° C, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 300 µl de etanol al 75%, tres veces. Finalmente se resuspendió en 2 µl de agua estéril y se almacenó a -20°C hasta que se utilizó.

b) Sonda de la caja HMG del Sry de ratón

Para obtener esta sonda, se realizó un PCR en un termociclador marca Perkin Elmer Cetus, modelo 9600. Se utilizó el estuche para amplificar ADN (Perkin Elmer), y como cebadores los oligonucleótidos reportados por Lee y Taketo (1994), que amplifican la caja HMG del Sry y unas bases más hacia los extremos de ésta y cuyas secuencias son:

Sry1: 5'CTGGTGACAATTGTCTAGAG^{3'}

Sry2: 5'TGTGGGTTCCCTGTCCCACTG^{3'}

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ l que contenía 50 mM de KCl, 10 mM de TrisHCl, 5 mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 2.5 U de Polimerasa Taq, 40 pmol de cada oligonucleotido y 0.5 μ g de ADN de hígado de ratón macho. El ADN se desnaturalizó por 5 min a 95°C y después se le agregaron los demás reactivos de una solución stock. Las muestras se sometieron a los siguientes ciclos:

15 seg a 94°C
15 seg a 65°C 29 ciclos
30 seg a 72°C

15 seg a 94°C
15 seg a 65°C 1 ciclo
10 min a 72°C.

Se sacaron los tubos, se les agregaron 15 μ l de buffer de corrida (Azul de Bromofenol 0.12 % y Glicerol 30%) y se colocaron aproximadamente 30 μ l en cada pozo de un gel de agarosa al 1.5% con TBE 0.5X, el cual se corrió a 100 volts por 1:30 hrs en TBE 1X. Posteriormente, se tiñó el gel con BrEt, se observó en el transiluminador y se cortó la banda del Sry para electroeluir la de la manera descrita anteriormente.

5.7 Marcado de las sondas por el método de Random Primer

Una vez que se purificó el fragmento del Sry y el del Cromosoma W, se utilizó el estuche de marcado de ADN por Random Primer de GIBCO BRL para marcar radioactivamente con $\alpha^{32}\text{PdATP}$ (NEN) las dos sondas. En un tubo Eppendorf se pusieron los 15 μl de la sonda y se les agregaron 2 μl de cada uno de los dNTPs no marcados radioactivamente: 5' trifosfato de desoxitimidina (dTTP), 5' trifosfato de desoxicitidina (dCTP) y 5' trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), 15 μl del buffer de random primers, 50 μCi de $\alpha^{32}\text{PdATP}$, y agua destilada estéril a completar un volumen de 49 μl . Se mezcló todo, se le agregó 1 μl del fragmento Klenow y se resuspendió todo con la micropipeta. El tubo se incubó a 25°C dos horas y después se le agregaron 5 μl del buffer de paro.

Durante las dos horas que se incubó la muestra, se preparó una columna de Sephadex G50 (Sigma) para separar por cromatografía de permeación en gel los nucleótidos que no se incorporaron y purificar el fragmento del Sry. La columna se montó en una jeringa desechable estéril de 1 ml a la que primero se le empacó un trozo de fibra de vidrio estéril, después se le fue agregando poco a poco, evitando la formación de burbujas, el Sephadex suspendido en buffer TEN 1X diluido a partir de una solución stock de TEN 10X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 10 mM, pH 8) hasta que se llenó la jeringa. Después se colocó dentro de un tubo de vidrio corex, que contenía en su interior un tubo Eppendorf sin tapa y se centrifugó en una centrifuga marca Beckman, modelo GS-6R a 4,000 r.p.m. 6 min a 4°C, para empacar el Sephadex en la columna. Posteriormente, se le agregó más Sephadex de modo que se volvió a llenar la jeringa y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y después se repitió una vez más el procedimiento.

Finalmente se le agregó a la columna buffer TEN 1X hasta que se llenó la jeringa y se volvió a centrifugar a 4,000 r.p.m. 6 min a 4°C, este proceso se repitió dos veces y después se guardó en el refrigerador hasta que se utilizó.

Luego de agregar el buffer de paro a la muestra, se le agregaron 105 ml de buffer TEN 1X. Se sacó la columna del refrigerador y se montó otra vez en el tubo corex con un tubo Eppendorf limpio, se tomaron los 160 µl de la muestra y se colocaron en el centro de la columna y se centrifugó a 4,000 r.p.m. 6 min a 4°C. Finalmente, se sacó el tubo Eppendorf del tubo corex y se tomaron 2 µl que se colocaron en otro tubo para contar la incorporación de P³² en un contador de centelleo marca Packard modelo Tri-Carb 1500. Al otro tubo se le puso su tapa y se congeló a -20°C hasta que se utilizó la sonda.

5.8 Southern blot

a) Digestión y separación de los fragmentos de ADN por electroforesis

Se tomaron 10 µg de ADN de pollo de 20 d.i. y de ratón B6 de 7 semanas, de hembra y de macho y se digirieron con la enzima de restricción BamHI (G↓GATCC) basándose en la reacción estándar mencionada anteriormente. Las cantidades se ajustaron para digerir 10 µg de ADN en un volumen final de 200 µl. El tubo se incubó 2 horas a 37°C en un baño marca Eppendorf modelo Thermomixer 5436. Durante la incubación, se preparó un gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE 0.5X, cuando se terminó de digerir el ADN se concentró en un concentrador marca SAVANT hasta tener un volumen de 20 µl al que se le agregaron 6 µl de buffer de corrida. Se cargaron las muestras en el gel de agarosa, también se colocó en un pozo marcador de peso molecular (ADN de λ digerido con las enzimas

Hind III y EcoR1) y se corrió a 110 volts 2 horas y media en buffer TBE 1X para que se separaran los fragmentos del ADN.

b) Transferencia del ADN

El ADN se transfirió con vacío a una membrana de nylon marca Hybond N⁺ de Amersham con el sistema de transferencia por vacío VacuGene XL de Pharmacia Biotech. Se montó la unidad, la membrana de nylon se humedeció con agua estéril, se colocó en la unidad y encima de ella se puso el gel de agarosa. Se prendió la bomba de vacío a 50 mbar, se pusieron 40 ml de solución despurinizante (HCl 0.25 M) encima del gel de agarosa y se dejó 7 minutos. Después se retiró la solución, ladeando la unidad para recuperarla por una de las esquinas y se agregaron 40 ml de la solución desnaturalizante (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) encima del gel, y se dejó otros 7 minutos. Se recuperó la solución, se pusieron 40 ml de la solución neutralizante (Tris 1 M, NaCl 1.5 M pH 7.5) y se dejó otros 7 minutos. Finalmente se le agregó a la unidad 1 litro (lt) de la solución de transferencia (SSC 2X) y se dejó 1 hora, se quitó esta solución y se removió el gel, pelándolo por un extremo. Se apagó la bomba de vacío, se retiró la membrana de nylon y se puso a secar entre 2 hojas blancas limpias. Para fijar el ADN a la membrana se colocó en un horno con vacío a 80°C 2 horas.

c) Hibridación

Se siguió el protocolo de Amersham para hibridación de ácidos nucleicos descrito en el manual de la membrana Hybond N⁺. Antes de hibridar la membrana con la sonda del Sry, ésta se prehibridó de la siguiente manera: se prepararon 25 ml de la solución de prehibridación: SSPE 20X (NaCl 3.6 M, Fosfato de Sodio 0.2 M, EDTA 0.02 pH 7.7) Denhardtts 100X (2% w/v BSA, 2% w/v Ficoll, 2% w/v Polivinilpirrolidona) SDS 10%,

NaCl al 0.9%, la membrana se metió en una bolsa de su tamaño y se puso a desnaturalizar ADN de espermatozoos de salmón en un baño marca Eppendorf modelo Thermomixer 5436 a 95°C por 5 min para después meterlo en hielo hasta que se utilizó. Se le agregó a la bolsa con la membrana la solución de prehibridación y 0.2 mg del ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado, se le sacaron todas las burbujas que tenía y se selló por calor. La bolsa se sumergió en un baño María marca Baxter modelo Durabath a 65°C y se dejó toda la noche prehibridando. Al día siguiente se cortó una esquina de la bolsa y se le agregó a la solución la sonda marcada radioactivamente, aproximadamente 15×10^6 c.p.m, se volvió a sellar ésta y se colocó dentro del baño María a 65°C y se dejó hibridando hasta el día siguiente. Se retiró la bolsa del baño y se colocó detrás de una mampara de acrílico, se vació la solución dentro de un frasco de desechos radioactivos. Se cortaron 3 orillas de la bolsa, se removi6 la membrana con pinzas y se colocó en una caja de Petri grande de vidrio a la que se le agregaron 100 ml de una solución de SSPE 2X y SDS al 0.2%, se dejó 15 min a temperatura ambiente y después se vació la solución en el frasco de desechos radioactivos, este lavado se repitió una vez más y después se le agregaron 100 ml de una solución de SSPE 1X, SDS 0.2% y se dejó 15 min a 65°C en una incubadora marca New Brunswick Scientific, modelo G24 Environmental Incubator Shaker. El último lavado se hizo con 100 ml de una solución de SSPE 0.1X, SDS 0.2%, por 10 min a 65°C.

d) Autoradiografía

Se tomó la membrana y se colocó entre dos hojas blancas limpias para secarla, después se puso dentro de una bolsa limpia la cual se selló por calor. En un cuarto oscuro, se montó la membrana dentro de un cassette con pantallas amplificadoras, con dos placas de rayos X (una encima y otra debajo de la membrana), inmovilizándolas con cinta

adhesiva. Se cerró el cassette y se dejó exponiendo a -70°C durante 3 ó 4 días para después revelar las placas de rayos X.

5.9 Northern blot

a) Preparación de las muestras

Se utilizaron 15 μg de ARN por cada muestra (en un volumen final de 4.5 μl), a los que se le agregaron 12.5 μl de formamida, 2.5 μl de buffer MOPS 10X (Acido N-Morfolino Propanosulfónico 0.2 M, Acetato de Sodio 0.5 M pH7.0, Na_2EDTA 0.01 M), y 4 μl de formaldehído al 37%. Se incubaron 5 min a 65°C y se le agregaron 2.5 μl de una mezcla de glicerol 50% (v/v) y 1 mg/ml de azul de bromofenol.

b) Gel de agarosa

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con 1.5 g de agarosa, 73 ml de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ y 10 ml de MOPS 10X, se fundió la mezcla y se le agregaron 17 ml de formaldehído al 37%. Se gelificó a 4°C , se cargaron las muestras y se corrió con MOPS 1X a 100 volts 65 min.

c) Transferencia del ARN total

Se siguió el protocolo de VacuGene para transferir ARN, se lavó el gel dos veces con $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ con agitación 15 min, se montó la cámara de transferencia, se colocó el gel del mismo modo que para el Southern blot y se pusieron 40 ml de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ encima del gel por 5 min. Se retiró el agua y se agregaron 40 ml de la solución alcalinizante (NaOH

50 mM) otros 5 min y después 40 ml de solución neutralizadora (TrisCl 0.1 M, pH 7.4). Por último, se agregó a la cámara 1 lt de solución de transferencia (SSC 2X) y se dejó transferir por 1 hora. Se retiro el papel de nylon, se dejó secar y luego se fijó con vacío 2 horas a 80°C.

d) Hibridación

La membrana se prehibridó del mismo modo que se reportó para el Southern blot, excepto que sólo se hizo durante dos horas a 65°C con agitación. Después se hibridó con 20×10^6 cpm de la sonda del Sry toda la noche a 65°C. Los lavados y la autoradigrafía se hicieron del mismo modo que para el Southern blot y posteriormente la membrana se tiñó para observar la localización de los ARN ribosomales, primero se colocó la membrana en una solución de ácido acético al 5%, durante 15 min y después se pasó a una solución de acetato de sodio 0.5 M, pH 5.2 y azul de metileno al 0.04% por 5-10 min, por último, la membrana se enjuagó en H₂O-DEPC hasta que se observaron las bandas de los ARN ribosomales.

VI. Resultados

6.1 Determinación del sexo de los embriones de pollo

Se determinó el sexo de los embriones de pollo de 6.5 d.i. en las membranas utilizadas en la hibridación puntual (Figura 7), las cuales permitieron identificar a los embriones hembras a través de la presencia de puntos oscuros donde hibridó la sonda del cromosoma W y a los machos por la ausencia de los mismos. Se utilizaron muestras de hígado de pollo de 20 d.i. de ambos sexos, como controles positivo y negativo.

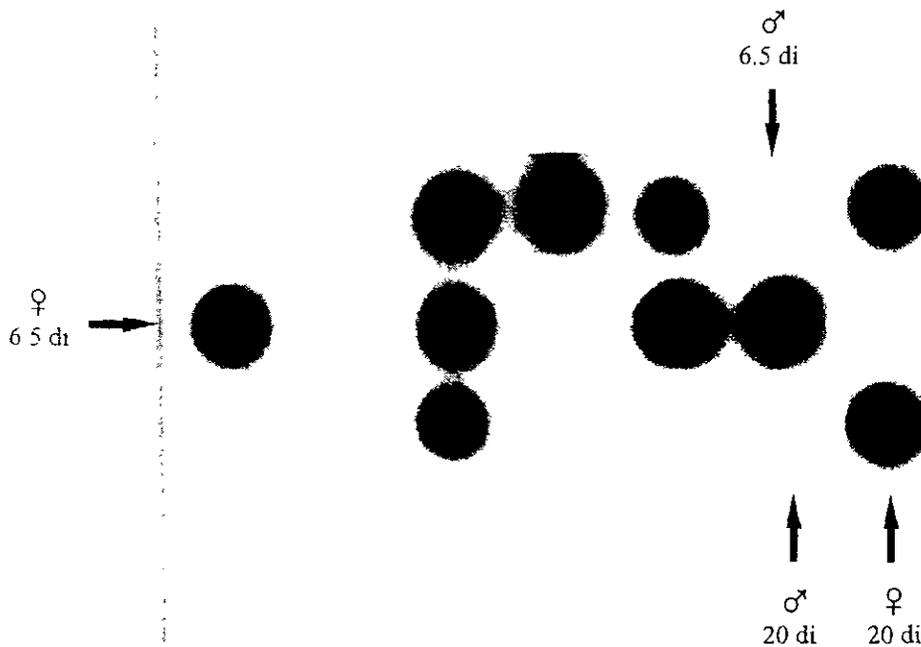


Figura 7. Membrana de hibridación puntual. Los puntos oscuros corresponden a la presencia del cromosoma W, detectado por hibridación puntual, en algunas de las hembras sexadas y los espacios en blanco denotan a algunos de los machos. Los controles utilizados se localizan en la parte inferior derecha de la membrana y corresponden a muestras de hígado de pollo de 20 d.i. de macho (σ) y de hembra (♀) respectivamente.

6.2 Obtención de la sonda de la caja HMG del Sry

La amplificación del ADN de hígado de ratón con los oligonucleótidos Sry1 y Sry2 dió como resultado dos bandas, una de 349 pb, la cual corresponde teóricamente a la secuencia del dominio HMG del Sry y otra de aproximadamente 450 pb. Para purificar la banda de 349 pb, ésta se electroeluyó y se corrió un gel para comprobar la pureza (Figura 8).

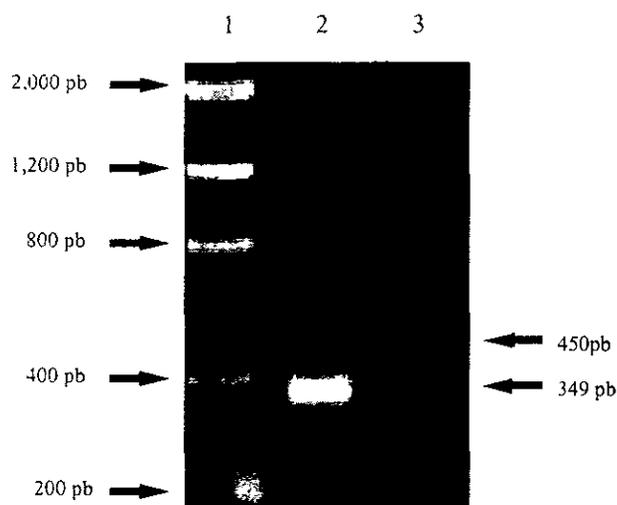


Figura 8. Amplificación de la caja HMG del Sry. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular Low DNA mass ladder, en el carril 2 se muestran los dos productos que se obtuvieron de la amplificación del ADN de ratón con los oligos Sry1 y Sry2. En el carril 3 se ve la banda correspondiente a la sonda del Sry después de la purificación por el método de electroelusión.

6.3 Cuantificación de los ácidos nucleicos

Para aislar el ADN total de las muestras y obtener suficientes microgramos de este, se hizo un pool de gónadas del mismo sexo de cada edad. Se realizó una dilución (1:1000 μ l) y se midió en el espectrofotómetro. Para obtener la cantidad de ADN total por muestra, se multiplicó la densidad óptica (D.O.) obtenida a 260 por 50 μ g/ml y el resultado se multiplicó a su vez por el factor de dilución. Los resultados se observan en la tabla 2.

Muestra	Número de gónadas	Concentración (μ g/ μ l)	Pureza (D.O. ²⁶⁰ / ₂₈₀)
20 d.i. ♀	4	1.83	1.9
20 d.i. ♂	8	1.51	1.9
Ratón B6 ♀	6	1.59	2
Ratón B6 ♂	1	0.65	2

D.O. Densidad óptica

Tabla 2. Se muestra la concentración y pureza del ADN de pollo y de ratón utilizado en la prueba del Southern blot, así como la edad y el sexo de las muestras analizadas.

Para aislar el ARN total de las muestras se pesaron aproximadamente 50 mg de gónadas de cada sexo, para poder obtener un exceso de ARN, aunque para el Northern blot se utilizaron 5 μ g de cada muestra. Los resultados se presentan en la tabla 3, para obtener la concentración de cada muestra, se multiplicó la D.O. obtenida a 260 por 40 μ g/ml y este resultado se multiplicó a su vez por el factor de dilución (800 μ l).

Muestra	Cantidad de tejido (mg)	Concentración (μ g/ μ l)	Pureza (D.O. ²⁶⁰ / ₂₈₀)
6.5 d.i. ♀	50 \pm 3	4.84	1.84
6.5 d.i. ♂	50 \pm 3	4.2	1.82
13.5 d.i. ♀	50 \pm 3	2.32	1.95
13.5 d.i. ♂	50 \pm 3	2.12	1.95
20 d.i. ♀	50 \pm 3	1.2	2.1
20 d.i. ♂	50 \pm 3	2.08	2
Ratón CD1 ♀	100	5.06	1.9
Ratón CD1 ♂	100	5.9	1.9

D.O. Densidad óptica

Tabla 3. Se observa la cantidad de tejido utilizada para aislar el ARN de las muestras analizadas de cada edad, así como la concentración y la pureza obtenidas para cada una de éstas.

6.4 Southern blot

Se digirieron 10 μg de ADN total de cada muestra con la enzima de restricción BamHI. Se utilizó ADN de pollo hembra y macho de 20 d.i. y como controles, 10 μg de ADN total de ratón B6 hembra y macho (Figura 9). La sonda de la caja HMG del Sry identificó 2 bandas en ambas muestras de pollo (hembra y macho) de aproximadamente 6.0 kb y 2.0 kb. Como se observa en la figura, la sonda dió una señal muy intensa en los controles ya que se observa un barrido y no se pueden identificar bandas individuales.

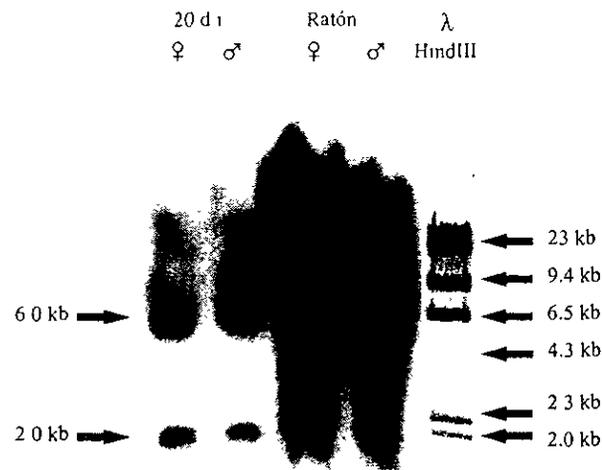


Figura 9. Southern blot. Se muestran las bandas detectadas por Southern blot del ADN total en los embriones de pollo masculinos y femeninos de 20 d.i., hibridados con la sonda del Sry. El último carril muestra el marcador de peso molecular λ HindIII.

6.5 Northern blot

En el análisis por Northern blot del ARN total de pollo de 6.5 y 13.5 d.i. (figura 10), se observan dos bandas en las muestras tanto de hembra como macho. En el segundo Northern blot (figura 11), que tiene las muestras de pollo de 20 d.i. y los controles de ratón, no se aprecia ninguna banda en las muestras de pollo y en las de ratón se observan 4 bandas.

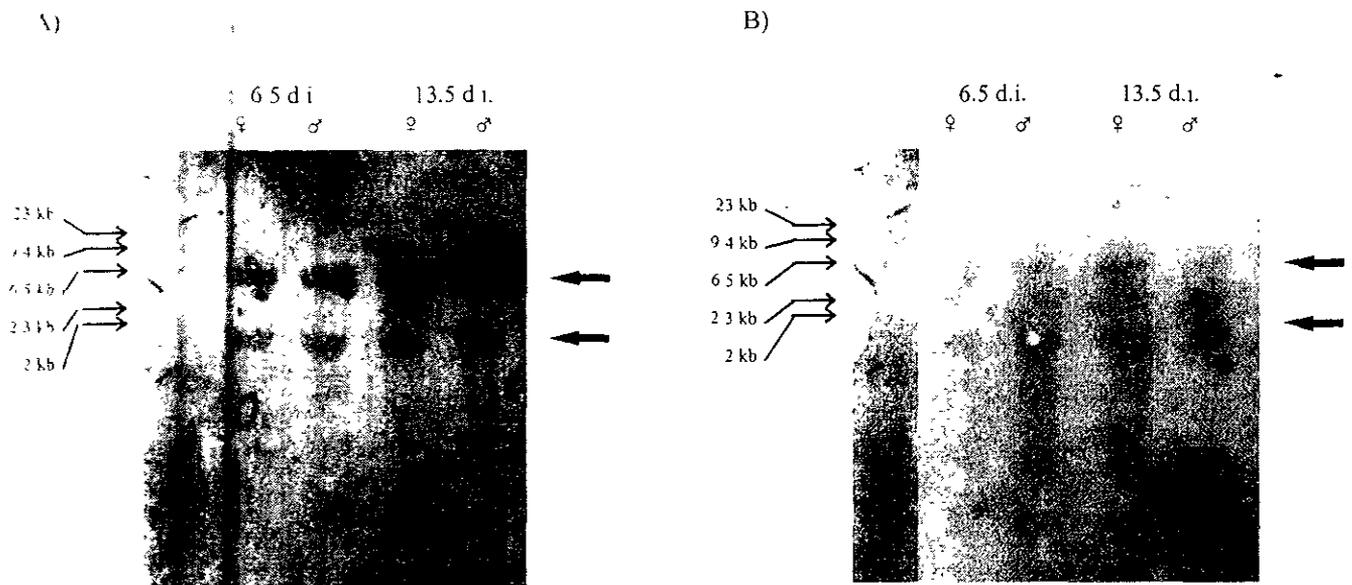


Figura 10. Northern blot de 6.5 y 13.5 d.i.. a) Se observa la membrana de nylon, con las muestras de ARN total, teñida con azul de metileno, b) Northern blot de las muestras de pollo de 6.5 y 13.5 d.i. de ambos sexos. El marcador de peso molecular es ADN de λ digerido con la enzima Hind III.

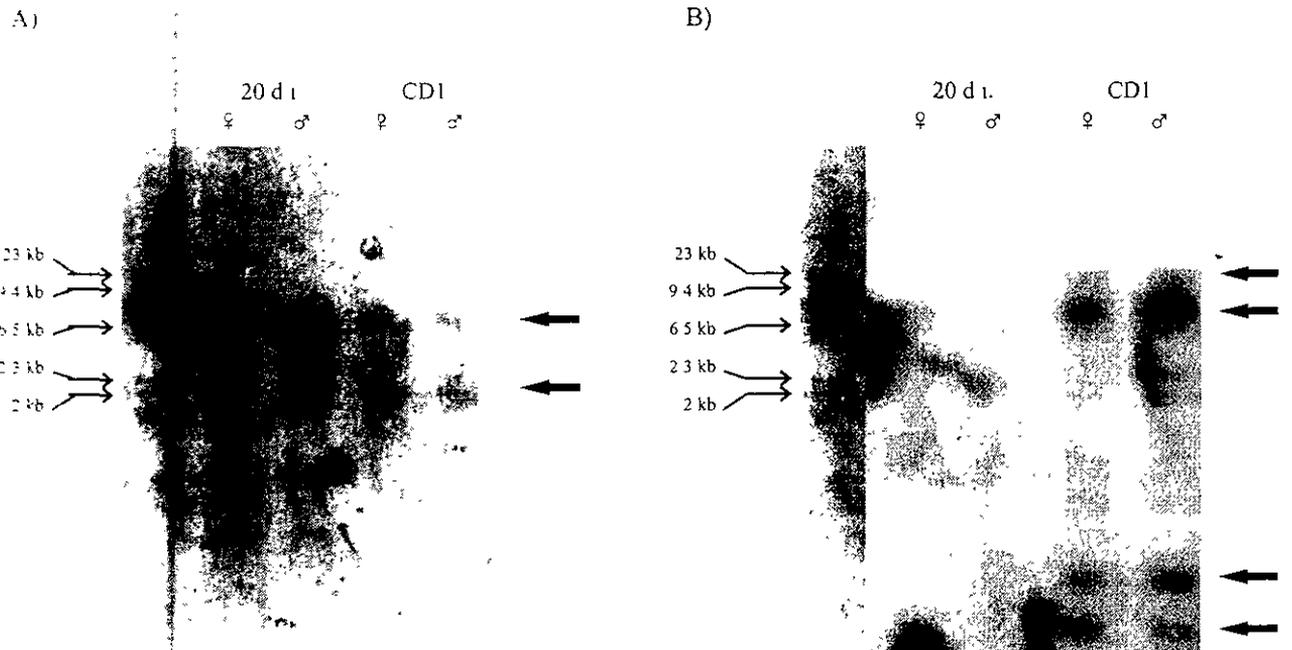


Figura 11. Northern blot de 20 d.i. a) Se observa la membrana de nylon, con las muestras de ARN total, teñida con azul de metileno, b) Northern blot de las muestras de pollo de 20 d.i. y de ratón de ambos sexos. El marcador de peso molecular es ADN de λ digerido con la enzima Hind III.

VII. Discusión

En la presente investigación se estudió la presencia y expresión de genes con la secuencia del dominio HMG en el embrión de pollo. La purificación del ADN y ARN total de las muestras fue satisfactoria ya que se aisló suficiente material para llevar a cabo los experimentos de hibridación y este se mantuvo en un rango de pureza de 1.8 a 2. Esto nos permitió asegurarnos que los ácidos nucleicos estaban libres de proteínas o de reactivos agregados durante la purificación para los experimentos de Southern ó Northern blot.

Debido al estado de gónada indiferenciada que presentan los embriones de 6.5 di, fue necesario sexarlos por el método de hibridación puntual, utilizando una sonda específica del cromosoma W de las aves. El método de hibridación puntual se adaptó en este estudio para sexar embriones de pollo a partir de la técnica descrita originalmente por Nishioka (1988) para ratones *Mus musculus domesticus* y que en el laboratorio se utiliza rutinariamente para sexar embriones y ratones durante el desarrollo postnatal. En experimentos preeliminares se utilizó tejido de embriones de edades de 13.5, 15 y 20 di, cuyo sexo se reconoce morfológicamente y se pudo comprobar que la sonda reconoce solamente a las hembras por lo que podemos afirmar que esta técnica es una buena alternativa para sexar embriones de pollo de etapas indiferenciadas y con la cual se pueden manejar muchas muestras de manera simultánea, ya que para este estudio se utilizaron aproximadamente 150 embriones de cada sexo de la etapa de 6.5 d.i.

Para realizar la sonda de la caja HMG del Sry se utilizaron los oligonucleótidos reportados por Lee y Taketo (1994) quienes observaron un sólo producto de PCR al amplificar cDNA de ratón de la cepa B6. Sin embargo, en nuestros experimentos se observan dos bandas, una de 349 pb que corresponde a la reportada por los autores y otra de aproximadamente 450 pb. Las dos bandas que encontramos en el presente estudio podrían ser diferentes copias del Sry, ya que se ha visto que existen varias copias de este gen en diferentes especies de ratón. Lundrigan y Tucker (1997) analizaron especies africanas de ratón y detectaron de 2 a 4 copias del Sry en éstas. Así mismo, Nagamine (1994) estudió especies europeas y asiáticas de ratón y observó que hay de 2 a 6 transcritos en las especies asiáticas y que en el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) sólo hay una copia de éste gen, sin embargo, no se aclara que cepa de esta especie se utilizó para los experimentos que reportan. En el presente estudio se realizaron experimentos de PCR utilizando muestras de las cepas B6 y CD1; y se obtuvieron para el primero una banda (349 pb) y para el segundo dos bandas (349 y 450 pb), lo que sugiere que podría haber más de una copia del Sry entre cepas de una misma especie.

Por otra parte, no se puede descartar la posibilidad de que la otra banda observada al amplificar el Sry sea resultado de un artefacto debido a las condiciones del PCR empleadas en el presente estudio, por ejemplo, las temperatura utilizada para la fase de alineamiento del ADN y los oligonucleótidos pudo ser muy alta (65°C), ó la especificidad durante la elaboración de la sonda, que estaría en función de la concentración de las sales de MgCl₂ aplicada en nuestros experimentos, fue baja (5mM) comparada con la alta astringencia (7mM de MgCl₂) empleada por Jeske y cols. en 1996 para amplificar el Sry de ratón. Para

confirmar que las dos bandas vistas corresponden a éste gen, habría que secuenciarlas y analizarlas.

Los experimentos realizados en el presente estudio confirmaron los datos obtenidos por Tiersch y cols. en 1991, ya que se encontraron secuencias relacionadas con el Sry en hembras y machos en los embriones de pollo estudiados. El ADN total de las muestras se digirió con la enzima de restricción BamHI y se observaron dos bandas, una de 6 kb y la otra de 2 kb. El barrido que se observa en los carriles de los controles de ADN de ratón podría deberse a que faltó lavar con una mayor astringencia la membrana o a que ésta se sobreexpuso durante la autoradiografía y por lo tanto no se distinguen bandas en éstos.

Se utilizaron embriones de pollo de 6.5, 13.5, y 20 d.i. para el experimento de Northern Blot las cuales son etapas que abarcan momentos del desarrollo sexual embrionario y donde sería interesante observar la expresión de genes de la familia Sox como el Sry o el Sox9. A partir de los 6.5 d.i. se da el inicio de la diferenciación gonadal en el pollo, y en mamíferos se ha demostrado la expresión del Sry en esta etapa de diferenciación que en los ratones comienza a los 11.5 dpc. La otra etapa sería la del establecimiento del eje HAG, a los 13.5 d.i. ya que en las aves este proceso ocurre en la fase embrionaria y podría esperarse un control de las hormonas hipofisiarias sobre el Sry. Finalmente, los 20 d.i., son un día antes de la eclosión.

En el experimento de Northern blot con las muestras de 6.5 y 13.5 d.i., se detectaron dos bandas, cuya expresión es muy débil en ambos sexos de estas edades. La revisión del gel de agarosa después de la transferencia mostró que se transfirió todo el ARN total a la membrana de nylon, por lo tanto es posible que las membranas hayan tenido un alto contenido de ARN ribosomal, lo que ocasionó una hibridación inespecífica de la sonda con este tipo de ARN. Al comparar las bandas del Northern blot con la membrana de nylon teñida con azul de metileno se ve que las bandas corresponden a los ARN ribosomales.

En el segundo experimento no se detectó ninguna banda en las muestras de 20 d.i., además hubo una reacción inespecífica de la sonda, lo cual probablemente se deba a errores en la prehibridación cuando se realizó el bloqueo con el ADN de esperma de salmón ya que posiblemente éste no se mezcló homogéneamente a lo largo de la membrana lo cual provocó esta reacción. En los controles empleados de ratón adulto hembra y macho se aprecian 4 bandas bien definidas en ambos sexos que muy probablemente corresponden a genes con una caja HMG. Además, no se logró identificar una banda específica de los machos, como la reportada por Capel y colaboradores (1993b) que es de 1.3 kb y corresponde al transcrito circular de este gen en los ratones machos adultos, por lo que se descarta que alguno de estos genes sea el Sry. Dada la alta homología que hay entre las cajas HMG de los genes SOX y el Sry podemos suponer que la sonda reconoció secuencias de genes Sox, por lo que sería necesario subclonar y secuenciar las bandas que se observan en los controles del Northern blot, para aclarar a que genes corresponden éstas.

Se detectaron secuencias que corresponden a genes de la familia Sox y que contienen una caja HMG como se planteó en la hipótesis, sin embargo, estas secuencias no son específicas del sexo del pollo, ya que se observan en ambos sexos. Por otra parte, no se pudo detectar la expresión de estos genes en embriones de pollo como se esperaba y lo más probable es que los genes que se detectaron en el experimento de Southern blot no se expresen durante las etapas estudiadas.

En un estudio publicado recientemente no se logra localizar el gen Sry en las aves (McBride y cols., 1997) por métodos de PCR y solamente se encuentran secuencias relacionadas con éste, una de las cuales pertenece al Sox9. Este gen se expresa antes de la diferenciación sexual en ambos sexos en los embriones de pollo (Morais da Silva y cols., 1996) y se apaga en las hembras durante la diferenciación gonadal. Estos y otros datos sugieren que el Sox9 está más conservado evolutivamente que el Sry, ya que el primero se encuentra en vertebrados como los mamíferos, las aves y las tortugas marinas como la *Lepidochelys olivacea* (Merchant 1998, datos sin publicar) y el Sry sólo se ha encontrado en mamíferos. Aunque el Sry es importante en la diferenciación sexual masculina de los mamíferos, el gen Sox9 parece ser fundamental en las aves durante la diferenciación sexual, por lo que es necesario estudiar con mayor profundidad los mecanismos por los cuales este gen interviene en la diferenciación ovárica y testicular, ya sea como un regulador negativo de la expresión de genes ó como un activador de la transcripción de otros en los vertebrados inferiores.

Finalmente, habría que profundizar más en el estudio del mecanismo de diferenciación sexual de las aves, para determinar que otros genes de los ya descritos para mamíferos, como el gen SF 1 ó el Dax1, actúan en esta especie e incluso habría que investigar que genes se localizan en el cromosoma W, homólogos a los que se localizan en el cromosoma X de los mamíferos y que provocan la diferenciación sexual de la gónada femenina, como el gene Dax1 que ha sido propuesto recientemente (Swain y cols., 1998) como un antagonista del Sry durante la diferenciación sexual gonadal de los mamíferos.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos llevan a plantear los siguientes experimentos con el fin de responder las preguntas que surgieron al termino de este trabajo:

- a) Utilizar los oligonucleótidos reportados por Jeske y cols., (1996) para obtener una sonda específica del Sry de ratón.
- b) Repetir los experimentos de Northern blot con otra sonda, que sea más específica para el Sry.
- c) Secuenciar las bandas del Sry que se amplifican en el PCR con el ADN de ratón para comprobar su naturaleza.

VIII. Conclusiones

1. La técnica estandarizada para el sexado por hibridación puntual de embriones de pollo hembras (ZW), es confiable.
2. Existen secuencias relacionadas al dominio HMG en ambos sexos del pollo, que probablemente corresponden a genes de la familia Sox.
3. No se detectó la expresión de los genes que reconoció la sonda de la caja HMG en hembras y machos del embrión de pollo.
4. La sonda utilizada no reconoce al gen Sry de ratón, ya que no es sexo-específica.

IX. Bibliografía

Alberts B, Bray D, Lewis J et al. 1994 *Molecular Biology of the Cell* 3ª edición. Garland Publishing Inc. Pp 1011-1014.

Alvarez-Buylla A, Merchant-Larios H. 1986 Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res* 165:362-368.

Berta P, Ross HJ, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. 1990 Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.

Bianchi ME, Falciola L, Ferrari S, Lilley DMJ. 1992 The DNA binding site of HMG1 protein is composed of two similar segments (HMG boxes) both of which have counterparts in other eukaryotic regulatory proteins. *EMBO J* 11:1055-1063

Boyer TR, Erickson RP. 1994 Detection of circular and linear transcripts of Sry in pre-implantation mouse embryos: differences in requirement for reverse transcriptase. *Biochem Biophys Res Commun* 198:492-496.

Cao QP, Gaudette MF, Robinson DH, Crain WR. 1995 Expression of the mouse testis determining gene Sry in male preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 40:196-204.

Capel B. 1995 New bedfellows in the mammalian sex-determining affair. *Trends Genet* 11:161-163.

Capel B, Rastberry C, Dyson J, Bishop CE, Simpson E, Vivian N, Lovell-Badge R, Rastan S, Cattanach BM. 1993a Deletion of Y chromosome sequences located outside the testis determining region can cause XY female sex reversal. *Nat Genet* 5:301-307.

Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1993b Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 73:1019-1030.

Clepet C, Schaffer AJ, Sinclair AH, Palmer MS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1993 The human SRY transcript. *Hum Molec Genet* 2:2007-2012

Cohen DR, Sinclair AH, McGovern JD. 1994 Sry protein enhances transcription of Fos-related antigen 1 promoter constructs. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4372-4376.

Collignon J, Sockanathan S, Hacker A, Cohen-Tannoudji M, Norris D, Rastan S, Stevaovic M, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1996 A comparison of the properties of Sox-3 with Sry and two related genes, Sox-1 and Sox-2. *Development* 122:509-520.

Connor F, Cary PD, Read CM, Preston NS, Driscoll PC, Denny P, Crane-Robinson C, Ashworth A. 1994 DNA binding and bending properties of the post-meiotically expressed Sry related protein Sox-5. *Nucleic Acids Res* 22:3339-3346.

Coriat AM, Müller U, Harry JL, Uwanogho D, Sharpe PT. 1993 PCR amplification of SRY-related gene sequences reveals evolutionary conservation of the SRY-box motif. *PCR Methods Appl* 2:218-222.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.

Denny P, Swift S, Brand N, Dabhade N, Burton P, Ashworth A. 1992 A conserved family of genes related to the testis determining gene, Sry. *Nucleic Acids Res* 20:2887

Dubin RA, Ostrer H. 1994 Sry is a transcriptional activator. *Mol Endocrinol* 8:1182-1192

Elbrecht A, Smith RG. 1992 Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science* 225:467-470.

Eyal-Giladi H, Ginsburg M, and Fabarov AA. 1981 Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J Embryol Exp Morphol* 65:139-147.

Ferrari S, Harley VR, Pontiggia A, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1992 SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* 11:4497-4506.

Ford CE, Jones KW, Miller OJ, Mittwoch M, Penrose LS, Ridler M, Shapiro A. 1959a The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet* 1:709-710.

Ford CE, Jones KW, Polani P, De Almeida JC, Briggs JH. 1959b A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713.

Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Marshall-Graves JA. 1992 Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY-related sequences in marsupials. *Nature (London)* 359:531-533.

Foster JW, Dominguez-Steglich MA, Guioli S, Kwok C, Weller PA, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Schafer AJ. 1994 Campomelic dysplasia and autosomal sex-reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530.

Foster JW, Graves JA. 1994 An SRY-related sequence on the marsupial X chromosome: implications for the evolution of the mammalian testis determining gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1927-1931

Fugo NW. 1940 Effects of hypophysectomy in the chick embryo. *J Exp Zool* 85:271-297.

Giese K, Cox J, Grosschedl R. 1992 The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69:1-20.

- Giese K, Pagel J, Grosschedl R. 1994 Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3368-3372.
- Gilbert SF. 1994 *Developmental Biology* 4^a edición. Sinauer Associates Inc. Pp 755-756.
- Ginsburg M, Eyal-Giladi H. 1986 Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J Embryol Exp Morphol* 95:53-71.
- Goldberg EH, McLaren A, and Reilly B. 1991 Male antigen identified serologically does not identify a factor responsible for testicular development. *J Reprod Immunol* 20:305-309.
- Griffiths R. 1991 The isolation of conserved DNA sequences related to the human sex-determining region Y gene from the Lesser black-backed gull (*Larus fuscus*). *Proc R Soc Lond B* 244:123-128.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow PN, and Lovell-Badge R. 1990 A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow PN, Lovell-Badge R. 1992 Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7953-7957
- Giuli G, Shen WH, Ingraham HA, 1997 The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian Inhibiting Substance, *in vivo*. *Development* 124:1799-1807.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1995 Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121:1603-1614.
- Haffen K. 1975 Sex differentiation of avian gonads *in vitro*. *Am Zool* 15:257-272.
- Hamburger V and Hamilton HL. 1951 A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Haqq CM, King CY, Donahoe PK, Weiss MA. 1993 Sry recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1097-1100.
- Haqq CM, King CY, Ukiyama E, Falsafi S, Haqq TN, Donahoe PK, Weiss MA. 1994 Molecular basis for mammalian sexual determination: activation of Müllerian inhibiting substance gene expression by SRY. *Science* 266:1494-1500.
- Harley VR, Jackson DI, Hextall PJ, Hawkins JR, Berkovits GD, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1992 DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and females. *Science* 255:453-456.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1994 Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucl Acids Res* 22:1500-1501.

Harley VR, Lovell-Badge R, Goodfellow PN, Hextall PJ. 1996 The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett* 391:24-28.

Harry JL, Koopman P, Brennan FE, Graves JA, Renfree MB. 1995 Widespread expression of the testis-determining gene SRY in a marsupial. *Nat Genet* 11:347-349.

Healy C, Uwanogho D, Sharpe PT. 1996 Expression of the chicken Sox9 gene marks the onset of cartilage differentiation. *Ann NY Acad Sci* 785: 261-262.

Honda SI, Morohashi KI, Nomura M, Takeya H, Kitajama M, Omura T. 1993 Ad4BP-regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem* 268:7494-7502.

Hosking BM, Muscat GEO, Koopman P, Dowhan DH, Dunn TL. 1995 *Trans*-activation and DNA-binding properties of the transcription factor *Sox-18*. *Nucleic Acids Res* 22:2626-2628.

Hurst LD. 1994 Embryonic growth and the evolution of the mammalian Y chromosome. II. Suppression of selfish Y-linked growth factors may explain escape from X-inactivation and rapid evolution of Sry. *Heredity* 73:233-243.

Hutson J, Ikawa H, Donahoe PK. 1981 The ontogeny of Mullerian Inhibiting Substance in the gonads of the chicken. *J Pediatr Surg* 16:822-827.

Imataka H, Suzuki K, Inano H, Kohmoto K, Tamaoki B. 1988 Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: the sexual difference. *Gen Comp Endocrinol* 71:413-418.

Jacobs PA, Strong JA. 1959 A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183:302-302.

Jäger RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. 1990 A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348:452-454.

Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. 1990 Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344:830-836.

Jeske YWA, Bowles J, Greenfield A, Koopman P. 1995 Expression of a linear sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet* 10:480-482.

Jeske YWA, Mishina Y, Cohen DR, Behringer RR, Koopman P. 1996 Analysis of the role of *Amh* and *Fra1* in the Sry regulatory pathway. *Mol Reprod Dev* 44:153-158.

- Kanai Y, Kanai-Azuma M, Noce T, Saido TC, Shiroishi T, Hayashi Y, Yazaki K. 1996 Identification of two Sox17 messenger RNA isoforms, with and without the high mobility group box region, and their differential expression in mouse spermatogenesis. *J Cell Biol* 133:667-681.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. 1996 A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122:2813-2822.
- Kolodrubetz D. 1990 Consensus sequence for HMG1 like DNA binding domains. *Nucl Acids Res* 18:5565.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, and Lovell-Badge R. 1991 Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117-121.
- Kuwana T, Maedasuga H, Fujimoto T. 1986 Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage *in vitro*. *Anat Rec* 215:403-406.
- Kuwana T. 1993 Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Dev Growth and Differ* 35(3):237-243.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL. 1992 Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu factor 1. *Mol Endocrinol* 6:1249-1258
- Laudet V, Stehelin D, Clevers H, 1993 Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 21:2493-2501.
- Lefebvre V, Huang WD, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. 1997 SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro-alpha 1 (II) collagen gene. *Mol Cell Biol* 17:2336-2346.
- Lee CH, Taketo T. 1994 Normal onset but prolonged expression, of Sry gene in the B6.Y^{DOM} sex-reversed mouse gonad. *Dev Biol* 165:442-452.
- Lin M, Thorne MH, Martin IC, Sheldon BL, Jones RC. 1995 Electron microscopy of the seminiferous epithelium in the triploid (ZZZ and ZZW) fowl, *Gallus domesticus*. *J Anat* 186:563-576.
- Love JJ, Li X, Case DA, Giese K, Grosshedl R, Wright PE. 1995 Structural basis for DNA binding by architectural transcription factor LEF-1. *Nature* 376:791-795.
- Lovell-Badge R, Hacker A. 1995 The molecular genetics of Sry and its role in mammalian sex determination. *Phil Trans R Soc Lond B* 350:205-214.
- Lundrigan BL, Tucker PK. 1997 Evidence for multiple functional copies of the male sex-determining locus, Sry, in African murine rodents. *J Mol Evol* 45:60-65.

- 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.
- MacLaughlin D, Hutson J, Donahoe P. 1983 Specific estradiol binding in embryonic müllerian ducts: a potential modulator of regression in the male and female chick. *Endocrinology* 113:141-145.
- Maraud R, Vergnaud O. 1986 Development of interstitial cells in experimentally sex-reversed gonads of genetically female chick embryos. *Gen Comp Endocrinol* 63:464-470.
- Maraud R, Vergnaud O, Rashedi M. 1990 New Insights on the mechanism of testis differentiation from the morphogenesis of experimentally induced testes in genetically female chick embryos. *Am J Anat* 158:429-437.
- McBride D, Sang H, Clinton M. 1997 Expression of Sry-related genes in the developing genital ridge/mesonephros of the chick embryo. *J Reprod Fertility* 109:59-63.
- McLaren A. 1990 The making of male mice. *Nature* 351:96.
- McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P, Hogg H. 1984 Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312:552-555.
- Merchant-Larios H. 1984a Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In: *Ultrastructure of reproduction*. Chap 3 pp19-30. Martinus Nijhoff Publ. Boston.
- Merchant-Larios H, Popova L, Reyss-Brion M. 1984b Early morphogenesis of chick gonad in the absence of mesonephros. *Develop Growth and Differ* 26(5):403-417.
- Merchant-Larios H. 1978 Ovarian Differentiation. In: *The vertebrate ovary*. Jones RE (de) Chap 2 pp47-81. Plenum Publishing Corp.
- Mittwoch U. 1996 Sex-determining mechanisms in animals. *Trends in Ecol and Evol* 11:63-67.
- 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 testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14:62-68.
- Münsterberg A, Lovell-Badge R. 1991 Expression of the mouse anti-müllerian hormone gene suggests a role in both female and male sexual differentiation. *Development* 113:613-624.
- Nagamine CM. 1994 The testis-determining gene, SRY, exists in multiple copies in Old World rodents. *Genet Res* 64:151-159.

- Nambu PA, Nambu JR. 1996 The *Drosophila fishhook* gene encodes a HMG domain protein essential for segmentation and CNS development. *Development* 122:3467-3475.
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P. 1997 SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108-121
- Niethammer M, Kim E, Sheng M. 1996 Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Nishioka Y 1988 Application of Y chromosomal repetitive sequences to sexing mouse embryos. *Teratology* 38:181-185.
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, Mc Gillivray B, De la Chapelle A, Brown LG. 1987 The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51:1091-1104.
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas EN, and Fellous M. 1989 Genetic evidence that ZFY is not the testis determining factor. *Nature* 342:937-939.
- Pevny LH, Lovell-Badge R. 1997 Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev* 7:338-344.
- Poulat F, de Santa Barbara P, Desclozeaux M, Soullier S, Moniot B, Bonneaud N, Boizet B, Berta P. 1997 The human testis determining factor SRY binds a nuclear factor containing PDZ protein interaction domains. *J Biol Chem* 272:7167-7172.
- Pontiggia A, Rimini R, Harley VR, Goodfellow PN, Lovell-Badge R, Bianchi ME. 1994 Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13:6115-6124.
- Russell SRH, Sanchez-Soriano N, Wright CR, Ashburner M. 1996 The *Dichaete* gene of *Drosophila melanogaster* encodes a SOX-domain protein required for embryonic segmentation. *Development* 122:3669-3676.
- Scheib D. 1983 Effects and role of estrogens in avian gonadal differentiation. *Differentiation* 58:281-290.
- Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, Ya J, De Boer PAJ, Van de Wetering M, Verbeek S, Lamers WH, Kruisbeek Am, Cumano A, Clevers H. 1996 Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expression in mice lacking Sox-4. *Nature* 380:711-714.

Shen WH, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. 1994 Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77:651-661.

Sinclair AH. 1995 New genes for boys. *Am J Hum Genet* 57:998-1001.

Sinclair A, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Firschauf A-M, Lovell-Badge R, and Goodfellow P. 1990 A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.

Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer M, Goodfellow PN, Graves JAM. 1988 Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determining gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 336:780-783.

Smith CA, Andrews JE, Sinclair AH. 1997 Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J Steroid Biochem Molec Biol* 60:295-302.

Stevanovic M, Lovell-Badge R, Collignon J, Goodfellow PN. 1993 SOX3 is an X-linked gene related to SRY. *Hum Molec Genet* 2:2007-2012.

Südbeck P, Schmitz ML, Baeuerle PA, Scherer G. 1996 Sex reversal by the loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet* 13:230-232.

Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. 1998 *Dax1* antagonizes *Sry* action in mammalian sex determination. *Nature* 391:761-767.

Tiersch TR, Mitchell MJ, and Wachtel SS. 1991 Studies on the phylogenetic conservation of the SRY gene. *Hum Genet* 87:571-573.

Tone M, Nakano N, Takao E, Narisawa S, and Mizuno S. 1982 Demonstration of W chromosome-specific repetitive DNA sequences in the domestic fowl, *Gallus g. domesticus*. *Chromosoma* 86:551-569.

Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R. 1991 LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes Dev* 5:880-894.

Tucker PK, Lundrigan BL. 1993 Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. *Nature* 364:715-717.

Tucker PK, Lundrigan BL. 1995 The nature of gene evolution on the mammalian Y-chromosome: lessons from Sry. *Phil Trans R Soc Lond B* 350:221-227.

Woods JE. 1987 Maturation of the hypothalamo-adenohypophyseal-gonadal (HAG) axes in the chick embryo. *J Exp Zool Suppl* 1:265-271.

Wotton D, Lake RA, Farr CJ, Owen MJ. 1995 The high-mobility group transcription factor, SOX4, transactivates the human CD2 enhancer. *J Biol Chem* 270:7515-7522.

Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J, Evans T, Gangadharan V, Greenfield A, Koopman P. 1995 The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9:15-20.

Yoshida K, Shimada K, Saito N. 1996 Expression of p450_{17 α} hydroxylase and p450 aromatase genes in the chicken gonad before and after sexual differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 102:233-240.

Zwingman T, 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.