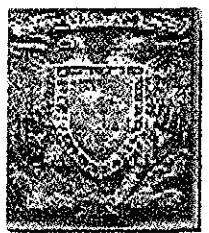
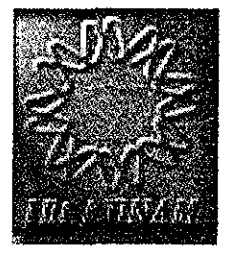


00562  
8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

"ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DEL GENE *Oct-4* MEDIANTE LA MANIPULACIÓN DE SU  
EXPRESIÓN, EN GÓNADAS EMBRIONARIAS DE RATÓN"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

BIÓL. LAURA SOCORRO RAMÍREZ ÁNGELES

DIRECTOR DE TESIS  
HILDA LOMELÍ BUYOLI

CUERNAVACA, MORELOS

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: LAURA SOCORRO

RIVERA ANGELES

FECHA: 23/10/2002

FIRMA: 

## DEDICATORIAS:

A mi padre.

Aunque cada uno de los detalles de nuestra vida no pueden incluirse en una dedicatoria, no olvides que el amor, alimentado con pequeños logros tuyos y míos, sigue siendo la mejor forma de sentirte cerca.

A mi mamá:

Porque aunque decidiste repartir tu vida entre nosotros, tengo la certeza de que tu entrega es incondicional y definitivamente una de las razones que poseo en la vida para creer que el amor es la razón más pura del ser humano.

A mi Familia

Por estar siempre presentes en mi existencia y hacerme presente en la suya.

## AGRADECIMIENTOS

A LA Dra. Hilda Lomelí por su apoyo incondicional durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Horacio Merchant Larios su asesoramiento y facilidades al visitar su laboratorio.

A la Dra. Norma Angelica Moreno Mendoza por compartir conmigo sus conocimientos en el cultivo de gónadas y agregados.

Al Dr. Alejandro Garcíarrubio.

A la Dra. Martha Vásquez por sus sugerencias y comentarios.

A la Dra. Verónica Narvárez, la Dra. Claudia Treviño Santa Cruz, el Dr. Jesús Santa Olalla, la Dra. Diana Escalante y el Dr. Mario Zurita por la revisión de mi tesis.

A la Unidad de síntesis del instituto de Biotecnología.

Al IQ. Virgilio Juárez por su apoyo técnico.

A la Bióloga Lorena López, por su apoyo en la unidad de microscopía.

Al M en C. Alejandro Marmolejo y al Sr. José Guadalupe Baltasar por su apoyo técnico durante mis visitas a su laboratorio.

Gracias a mis compañeros del laboratorio Vero, Enrique, Denhí, Toño, Diana y Ángel por su apoyo cariñoso y amistad.

Gracias a Toña y a Tak por compartir conmigo muchas cosas.

## RESUMEN

El papel que desempeña el factor de transcripción Oct-4 en el desarrollo de la línea germinal del ratón aún no se ha establecido ya que la mutación nula de Oct-4 es letal previo a la implantación. Se sabe que durante el desarrollo embrionario Oct-4 se encuentra en células indiferenciadas o pluripotentes, posteriormente su expresión se restringe a las células germinales primordiales (CGPs) hasta antes del inicio de la meiosis en ambos sexos. El patrón de expresión de Oct-4 está asociado al fenotipo indiferenciado y en las células germinales la pérdida de la expresión de Oct-4 se ha correlacionado con el inicio de la meiosis. Estos datos sugieren que la meiosis podría representar un proceso de diferenciación que requiere la pérdida de la expresión de Oct-4.

El presente trabajo aborda diferentes estrategias experimentales, con la intención de analizar el papel de Oct-4 en el desarrollo de las CGPs. Nuestra estrategia principal fue tratar de suprimir la actividad de Oct-4 a través del uso de oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido. Para ello se llevaron a cabo cultivos de crestas genitales así como agregados gonadales. En estos sistemas se pusieron a prueba varios ODNs antisentido. Lamentablemente a pesar de los diferentes ensayos que se hicieron no logramos disminuir los niveles del RNAm de Oct-4. Otro procedimiento experimental para llevar a cabo nuestro objetivo, fue analizar la entrada a meiosis en ratones transgénicos que mantienen en las células germinales un alto nivel de expresión de Oct-4 durante todo el desarrollo embrionario. Los resultados de este ensayo sugieren la reducción en el número de células en meiosis cuando Oct-4 es sobreexpresado. En este sistema la meiosis solo se analizó de manera cualitativa por lo cual nuestra apreciación no es concluyente y deberá validarse por métodos cuantitativos. En el presente trabajo se establecen varios procedimientos *in vitro* para el estudio del desarrollo gonadal y de las CGPs. Estos procedimientos serán de utilidad para estudiar el inicio de la meiosis en el futuro.

# INDICE

## I. INTRODUCCIÓN

### I. CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

1. Origen de las CGPs 1
2. Proliferación y supervivencia 2
3. Migración 3
4. Diferenciación sexual 4
  - A) Diferenciación sexual gonadal 4
  - B) Diferenciación sexual de las CGPs 5
5. Meiosis 6

### II. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN OCT-4

1. Propiedades moleculares y estructura genómica 7
2. Expresión en el embrión 9
3. Función en el desarrollo temprano 11
4. Oct-4 en la línea germinal 11
  - A) Totipotencialidad vs entrada a meiosis 11
5. Blancos transcripcionales de Oct-4 14

### III. OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS (ODNs) ANTISENTIDO Y CULTIVO DE ÓRGANOS

1. Oligodeoxinucleótidos antisentido 15
2. Cultivo de gónadas embrionarias 16
3. Cultivo de órganos y ODNs antisentido 16

## II. OBJETIVOS 18

## III. JUSTIFICACIÓN 19

## IV. MEDIOS Y SOLUCIONES 20

## V. MÉTODOS 24

1. Animales 24
2. Obtención de gónadas 24
3. Cultivo de gónadas 24
4. Agregados de crestas genitales 24
5. Hibridación *in situ* en órganos completos 25
  - A) Fijación y almacenamiento 25
  - B) Preparación de la sonda 25
  - C) Gel para RNA 25

D) Transferencia	26
E) Hibridación	26
6. Procesamiento histológico	
A) Inclusión en parafina	27
B) Inclusión en EPON	27
C) Inclusión en LRW	27
7. Diseño de ODNs Antisentido	
A) Purificación de los ODNs antisentido.	28
8. Inmunofluorescencia	28
<b>VI. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	
1. Análisis del efecto de la supresión del gene Oct-4 en las CGPs	29
2. Análisis del efecto de la expresión continua de Oct-4 en las CGPs	30
<b>VII. RESULTADOS</b>	
<b>I. BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE OCT-4</b>	
1. Cultivo de gónadas	
A) Análisis de la expresión de marcadores en gónadas cultivadas	31
B) Cultivos en presencia de ODNs antisentido	32
2. Diseño de otros ODNs antisentido	33
3. Cultivos de agregados de gonadas embrionarias	
A) Viabilidad y entrada a meiosis en cultivos de agregados	35
B) Selección de los ODNs antisentido	36
C) Expresión de marcadores de las CGPs en cultivos de agregados	36
D) Cultivo de agregados con ODNs antisentido	37
<b>II. USO DE ÁCIDO RETINÓICO</b>	37
<b>III. SOBREENPRESIÓN Y EXPRESIÓN ECTÓPICA DE OCT-4 EN LA GÓNADA</b>	38
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	40
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	45
<b>IX. FIGURAS</b>	46
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	60



## I. INTRODUCCIÓN

### I. CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Los organismos con reproducción sexual requieren de la formación de gametos que al fusionarse generan al cigoto, célula que tiene la información necesaria para crear un nuevo individuo. Los gametos se originan de la línea germinal a través de diversos procesos. En los mamíferos, el linaje germinal se establece con la aparición de las células germinales primordiales (CGPs).

En el ratón las CGPs se identifican por la expresión específica de moléculas como la fosfatasa alcalina (FA), los antígenos de superficie SSEA-1, EMA-1 y el factor de transcripción Oct-4 (Bendel-Stenzel et al., 1998). Utilizando la actividad de la FA como marcador de las CGPs se ha podido identificar el sitio de origen, la ruta de migración y la etapa del desarrollo en la cual las CGPs colonizan las crestas genitales. La etapa más temprana en la que pueden observarse las CGPs en el ratón es a los 7.5 días después del coito (dpc) localizadas en el mesodermo extraembrionario. Conforme avanza el desarrollo las CGPs proliferan y migran encontrándose en el recubrimiento epitelial del intestino posterior, entre los 9 y 9.5 dpc migran hacia el mesenterio dorsal integrándose finalmente a la gónada a los 10.5 dpc.

#### 1. Origen de las CGPs

El origen de las CGPs en el ratón no es un proceso del todo claro. Sin embargo, se ha determinado que sólo células del epiblasto proximal contribuyen a la formación de las CGPs y que su especificación depende de interacciones del epiblasto con los tejidos extraembrionarios (Tam y Zhou, 1996; McLaren, 2000). En los últimos años se han identificado algunos genes que afectan la aparición de las células germinales. Uno de estos genes es *Bmp-4* (Bone Morphogenetic Factor), cuya pérdida de función en tejidos extraembrionarios se asocia con la ausencia de CGPs (Lawson et al., 1999). Otras moléculas de esta familia como BMP-8 y BMP-2 tienen efectos similares (Ying et al., 2000; Ying y Zhao, 2001). Además se ha sugerido que la proteína SMAD 5 proteína mediadora de la respuesta a BMPs, se necesita para la generación de las CGPs en el epiblasto proximal. (Chang y Matzuk, 2001). Estos datos demuestran que señales inducidas por las proteínas BMP en el ectodermo

extraembrionario son requeridas para la especificación de las CGPs en el epiblasto proximal. Recientemente haciendo una búsqueda de genes presentes en las CGPs nacientes y ausentes en las células somáticas que las rodean, se identificaron dos genes (*fragilis* y *stella*) involucrados en el establecimiento del linaje germinal (Saitou et al., 2002). En este estudio, se demostró que en las células donde *fragilis* se expresa fuertemente se induce la expresión de *stella* y la represión de genes con caja homeótica, con lo cual se propone que las CGPs escapan de un destino somático.

## 2. Proliferación y sobrevivencia

Durante el desarrollo embrionario, las CGPs constituyen una población pequeña estimada en 50 células positivas a FA en el epiblasto (7.5 dpc), posteriormente se incrementan encontrando 26000 células a los 13.5 dpc (Ginsburg et al., 1990). Entre las moléculas involucradas en la proliferación y sobrevivencia de las CGPs se han descrito algunos factores de crecimiento como el factor *steel* (*sl*), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), el factor de crecimiento fibroblástico (bFGF), el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y la interleucina 4 (IL4). Todos ellos, estimulan la proliferación de las CGPs *in vitro* (De Felici y Pesce, 1994).

## 3. Migración

La migración de las CGPs puede dividirse en dos fases, la primera de migración pasiva (entre los 7.5 y 9 dpc) donde las CGPs se integran al intestino posterior a través de los movimientos morfogénicos del embrión y la segunda fase de migración activa (9.5-11.5 dpc), donde las CGPs salen del intestino y colonizan las crestas genitales (Figura 1). Las CGPs durante la migración pasiva no tienen características móviles, mientras que durante la migración activa las CGPs se asocian unas con otras a través de largos filopodios que se pierden al llegar a la gónada donde se agrupan en pequeños paquetes celulares (Gomperts et al., 1994). Existen varios mecanismos propuestos de como las CGPs son dirigidas para llegar a la gónada los cuales incluyen la quimiotaxis, la guía por contacto y la adhesión diferencial, entre otros. El *steel* factor (SLF) se expresa en forma de gradiente por la ruta migratoria de las CGPs, por lo cual se ha sugerido que pudiera ser un mecanismo de control en la migración a través de quimiotaxis capaz de dirigir a las CGPs hacia la gónada. (Keshet et al., 1991;

Pesce et al., 1997; De Felici y Pesce, 1994) Diversas observaciones sugieren que la migración activa requiere de interacciones de las CGPs con ellas mismas así como con moléculas de la matriz extracelular y con células somáticas. Estas interacciones están reguladas por moléculas como las cadherinas involucradas en las interacciones entre CGPs-CGPs (Bendel-Stenzel et al., 2000), Ep-CAM y glicoproteínas como laminina (LM), fibronectina (FN) y colágena IV (CIV) que se expresan en el camino de migración de las CGP (Alvarez-Buylla y Merchant-Larios, 1986; ; De Felici y Dolci, 1989; Garcia-Castro et al., 1997; Belvé, 1998). El trabajo más significativo donde se demuestra la participación de las moléculas de matriz extracelular en la migración se reportó recientemente. En este estudio se encontró que la mutación nula para la integrina  $\beta 1$  altera negativamente la capacidad migratoria de las CGPs (Anderson et al., 1999). Este es el único caso donde se ha demostrado la participación de una proteína en la migración de las CGPs *in vivo*.

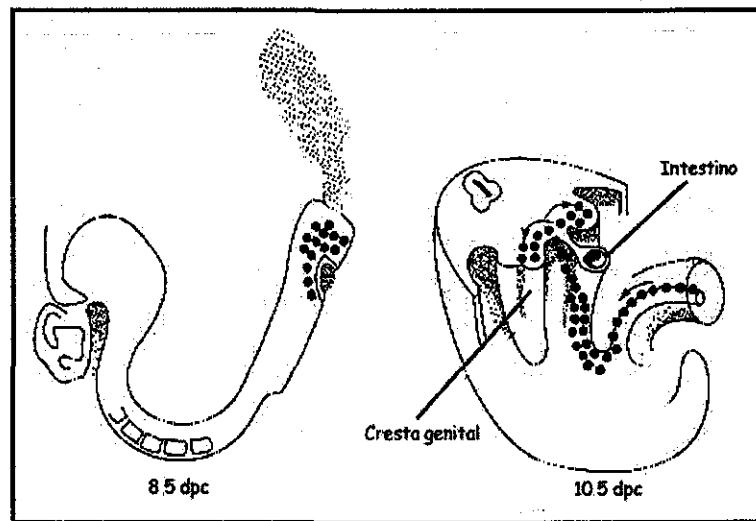


Figura 1. Migración de las CGPs. Las CGPs en el ratón migran del epiblasto proximal hacia el intestino posterior para colonizar las crestas genitales  
Hogan 1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 4. Diferenciación Sexual

### A) Diferenciación sexual gonadal

La diferenciación sexual en mamíferos, inicia con el establecimiento del sexo cromosómico que ocurre con la fertilización. Posteriormente la gónada se diferencia en ovario o testículo y como consecuencia de ello, diferencian los genitales internos y externos. En el ratón, las gónadas se identifican a partir de los 10.5 dpc, tiempo en el que se conocen como gónadas indiferenciadas. Esta estructura consiste de CGPs y células somáticas. Esta etapa se caracteriza por la llegada de las CGPs a la gónada, la condensación de las células somáticas y el depósito gradual de lámina basal llevando a la segregación de un compartimento epitelial y otro estromático (Merchant-Larios et al., 1993; Merchant-Larios y Taketo, 1991)

La gónada indiferenciada no presenta estructuras morfológicas típicas para machos o hembras. Conforme avanza el desarrollo dependiendo de la presencia o ausencia del cromosoma Y ocurren cambios en la organización celular que determinan la diferenciación hacia testículo u ovario. En la gónada indiferenciada dichos cambios están influenciados por la expresión del gene determinante del testículo (*Sry*). El gene *Sry* está presente en el cromosoma Y y codifica para un factor de transcripción de la familia HMG ("*High Motility Group*") que se expresa en las células somáticas de la gónada de macho (10.5 dpc), induciendo una cascada genética involucrada en la organogénesis del testículo. Entre los genes cuya expresión es inducida directa o indirectamente por *Sry* se encuentran: la hormona anti-Mülleriana (HAM), involucrada en la regresión de los conductos Müllerianos; La proteína Sox9 (*Sry-like HMG-box protein 9*) asociada con la reversión sexual y expresada entre los 11.5 y 12.5 dpc exclusivamente en las células de Sertoli. El Sf-1 ("*steroidogenic factor 1*") que se expresa en las células de Sertoli para regular la HAM y en precursores de las células de Leydig para la síntesis de esteroides. Por otra parte se sabe de otros genes que participan en el desarrollo gonadal tales como: *Wt1* ("*Wilms tumor*") que participa en el desarrollo temprano de la gónada regulando positivamente la expresión de Sf1 (Werner et al., 1996; Nachtigal et al., 1998) y *Dax 1* cuya expresión se restringe después de los 12.5 dpc a las hembras (Capel, 2000).

En los machos la diferenciación de la gónada inicia con la organización del compartimento epitelial en cordones testiculares, posteriormente se diferencian las células de Sertoli y el estroma se

diferencia en células de Leydig, células mioides, células endoteliales y fibroblastos formando el testículo. En el ovario entre los 15 y 16 dpc se inicia la foliculogénesis que consiste en la individualización de los ovocitos por las células foliculares, estas células se diferenciarán posteriormente en células de la teca, fibroblastos y células esteroideogénicas. (Byskov, 1986; Merchant-Larios y Taketo, 1991).

## B) Diferenciación sexual de las CGPs.

La diferenciación sexual de las CGPs inicia como un proceso independiente de su sexo cromosómico. La diferenciación de las CGPs en ovogonias o espermatogonias se determina por el ambiente gonadal que las rodea de tal forma que en un ambiente somático masculino las CGPs XX o XY se determinan como espermatogonias mientras en un ambiente femenino lo harán como ovogonias. Por esta razón, la diferenciación sexual de las CGPs depende de la diferenciación previa de los componentes somáticos de las crestas genitales. (McLaren, 1995).

La diferenciación sexual de las CGP se manifiesta a los 13.5 dpc cuando en las hembras aparecen las primeras CGPs meióticas. Estas células, progresan hasta paquiteno y diploteno de la profase I de la primera división meiótica, para después entrar en reposo meiótico. En este estadio permanecen hasta la pubertad cuando se reinicia la meiosis la cual se completa sólo si el óvulo es fecundado. En los macho a los 13.5 dpc, las CGPs se detienen en la fase G1 del ciclo celular y reinician la mitosis a los 7 días de desarrollo postnatal (dpc) (McLaren, 1984).

Los mecanismos que determinan que las CGPs inicien la meiosis en hembras y el reposo mitótico en los machos no se conocen. En un principio, la observación de que las CGPs ectópicas entraban en meiosis independientemente del sexo del embrión sugirió que las CGPs estaban determinadas a entrar en meiosis automáticamente pero en los machos eran prevenidas de hacerlo. (Byskov, 1986; Dolci et al., 1993; Zamboni y Upadhyay, 1983). Observaciones posteriores demostraron que las CGPs XY que no alcanzan la cresta genital y son atrapadas en el primordio adrenal inician la meiosis, mientras las CGPs XY atrapadas en el mesonefros algunas inician la meiosis y otras se desarrollan como proespermatozonias. Con estas observaciones se postuló la existencia de un factor difusible producido por la cresta genital de macho capaz de prevenir la entrada a meiosis (McLaren, 1984). Posteriormente se demostró que tanto las CGPs de machos como de hembras tienen la capacidad de

entrar en meiosis al agregarlas con células de pulmón, demostrándose así, que la entrada a meiosis es un proceso autónomo, independiente del ambiente somático y apoyando la idea de que las crestas genitales de macho secretan un factor inhibidor de la meiosis (FIM) del cual las CGPs pueden ser rescatadas antes de los 12.5 dpc (McLaren y Southee, 1997). Al realizar disgregados de gónadas de hembra que se agregaron con CGPs de macho o viceversa se encontró que las CGPs XY reciben la señal inhibidora de la meiosis entre los 11.5 y 12.5dpc, mientras que las CGPs XX son capaces de responder a esta señal hasta los 12.5 dpc; después de este día si el factor inhibidor no actúa entran irreversiblemente en meiosis (Adams y McLaren, 2002). Aunque la identidad y participación del factor inhibidor de la meiosis en la diferenciación sexual de las CGPs no se ha identificado, un trabajo reciente sugiere que señales de la vía transduccional en la que participa el receptor gp130 podrían estar involucradas en la regulación del factor inhibidor de la meiosis ya que en cultivos primarios de CGPs la activación de esta vía tiene como consecuencia que no se formen complejos sinaptinémicos (Chuma y Nakatsuji, 2001).

## 5. Meiosis

La meiosis es un proceso de división celular que origina una célula haploide a través de dos divisiones celulares sucesivas. En cada división celular, existen varias etapas en la meiosis conocidas como Profase, Metafase, Anafase y Telofase. En particular, en la primera profase meiótica ocurre el apareamiento entre cromosomas homólogos y la formación de los complejos sinaptinémicos (CS) permitiendo el intercambio entre los genes paternos y maternos. La profase de la primera división meiótica se puede dividir en 4 estadios determinados con base en cambios en la organización cromosómica. El primer estadio, conocido como leptoteno, se caracteriza por el inicio de la condensación cromosómica y la formación de una estructura protéica denominada elemento axial, que se une a las cromátidas hermanas en un arreglo lineal. En el estadio de cigoteno se inicia el apareamiento de los cromosomas, los elementos axiales de cada cromátida (ahora denominados elementos laterales), se unen entre sí a través de un elemento central completando la formación de los CS e iniciando la sinapsis. En paquiteno inicia la recombinación genética y en el diploteno se desintegran los CS y los cromosomas homólogos comienzan a separarse. En hembras, la profase se detiene en un estadio adicional conocido como dictioteno que se caracteriza porque los cromosomas

mantienen la morfología de paquiteno/diploteno donde las CGPs permanecen hasta la pubertad (Cohen y Pollard, 2001) (FIGURA 2).

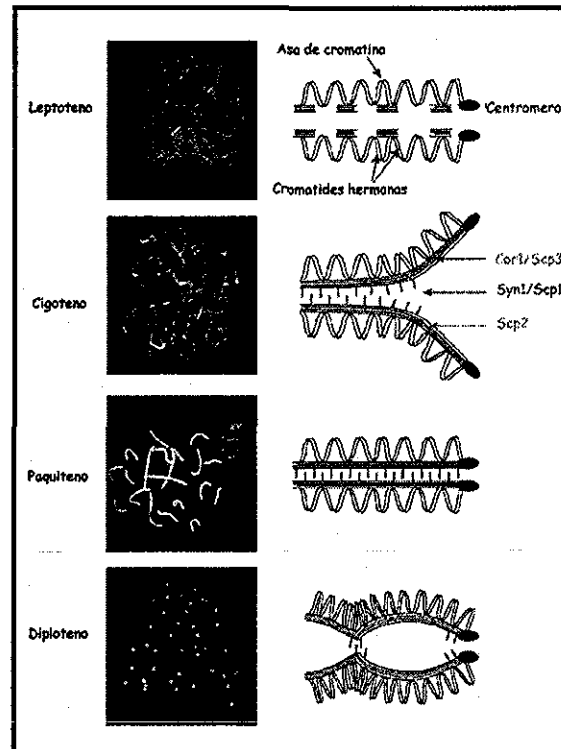


Figura 2. Formación de los complejos sinaptonémicos (CS) en CGPs de macho. A la izquierda se muestran una inmunofluorescencia contra proteínas de los CS y a la derecha se observa un esquema de los CS en cada etapa.

Cohen, 2001

TESIS CON  
FALLA DE OPICEN

## II EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN OCT-4

### 1. Propiedades moleculares y estructura genómica

El gene *Oct-4* codifica para un factor de transcripción perteneciente a la familia POU V. Inicialmente, los dominios POU se identificaron en los genes de mamífero Pit-1, Oct-1, Oct-2 y en *Caenorhabditis elegans* en el gene Unc 86. Estos dominios están constituidos por dos subdominios denominados dominio POU específico (POU<sub>S</sub>) y homeodominio (POU<sub>H</sub>) localizados en la región N y C-terminal respectivamente. Se sabe que los dominios POU forman una estructura bipartita muy flexible, capaz de reconocer una secuencia octamérica presente en el DNA (ATGCAAAT). Existen 6

clases de dominios POU de acuerdo a su secuencia aminoacídica, las proteínas con dominios POU V como *Oct-4* y en *Xenopus* *Oct-25* y *XLPOU 60* se caracterizan por su expresión exclusiva durante el desarrollo embrionario temprano y se les atribuyen importantes funciones en estas etapas (Ryan y Rosenfeld, 1997). *Oct-4* mapea en el cromosoma 17 de ratón cerca del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Scholer et al., 1990; Yeom et al., 1991) y ha sido encontrado en otras especies de mamíferos donde conserva la misma organización genómica, secuencia aminoacídica y localización cromosomal.

*Oct-4* esta organizado en 5 exones que codifican para un mensajero de 1.5 Kb (Okamoto et al., 1990; Rosner et al., 1990) El RNAm de este gene produce dos proteínas generadas por dos sitios de inicio de la traducción alternativos: una proteína de 352 aminoácidos conocida como *Oct-4* y otra de 325 denominada *Oct-3* (Okamoto et al., 1990; Scholer et al., 1990). La región reguladora de *Oct-4* esta compuesta de tres elementos, un "enhancer" proximal (EP), un "enhancer" distal (ED) y un promotor. El EP se localiza 1.2 Kb arriba del sitio de inicio de la transcripción, y es requerido para la expresión en el epiblasto así como en líneas celulares pluripotentes derivadas de teratocarcinomas (EC). El EP es regulado por ácido retinóico (AR) (Yeom et al., 1996).

El ED esta localizado 2Kb arriba del sitio de inicio de la transcripción y es activo específicamente en líneas celulares derivadas de células de la masa celular interna (ES). También es responsable de la expresión específica de *Oct-4* en la línea germinal, así como en líneas celulares derivadas de CGPs (EG) (Yeom et al., 1996).

La región del promotor de *Oct-4* contiene una caja GC a la cual se unen miembros de la familia Sp1 y un elemento de respuesta hormonal (HRE) (Schoorlemmer et al., 1994; Sylvester and Scholer, 1994). Se sabe que el HRE es reconocido por receptores de AR y en estudios *in vitro* se han identificado otras moléculas involucradas en la regulación de *Oct-4* como UCF ("undifferentiated cell factor"), TRIF ("transiently induced factor") (Fuhrmann et al., 1999), SF-1 y GCNF (el factor nuclear de células germinales) que activan o reprimen la expresión de *Oct-4* (Fuhrmann et al., 2001).

La regulación negativa de *Oct-4* por AR ha sido estudiada en sistemas de cultivo de células ES y EC, donde se ha demostrado que el tratamiento de células EC con AR induce la diferenciación reprimiendo la expresión de *Oct-4* (Okamoto et al., 1990; Okazawa et al., 1991).



## 2. Expresión en el embrión

Tanto el RNAm como la proteína Oct-4 están presentes en el ovocito. Después de la fertilización Oct-4 es heredado maternamente al cigoto por lo cual se observa la proteína en el citoplasma de los blastómeros (estadio de 2 a 4 células) en bajos niveles. La expresión cigótica de Oct-4 inicia en el estadio de 4 células, los niveles de la proteína se incrementan en el estadio de 8 células donde está presente en el núcleo de los blastómeros. Durante el estadio de mórula no hay restricción celular en la expresión de Oct-4. Sin embargo, después de la cavitación en el blastocisto, la expresión se restringe a las células de la masa celular interna (MCI), quienes dan origen al embrión. La expresión de Oct-4 se pierde en las células del trofoblasto, tejido de donde se originan las estructuras extraembrionarias. Cuando las células de la MCI se diferencian en epiblasto e hipoblasto los niveles de proteína de Oct-4 se mantienen en el epiblasto (Palmieri et al., 1994; Rosner et al., 1990) (FIGURA 3).

A partir de los 8.5 dpc cuando ocurre la gastrulación y la segregación de las capas embrionarias, la expresión de Oct-4 desaparece de prácticamente todo el embrión quedando restringida su expresión exclusivamente a las CGPs (Scholer et al., 1990).

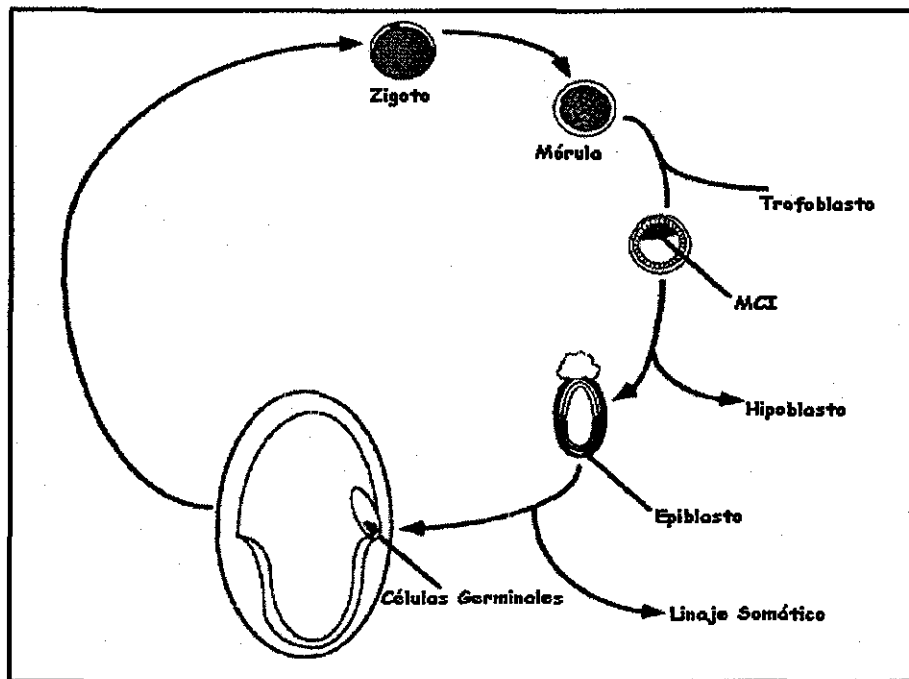


Figura 3. Expresión de Oct-4 durante el ciclo totipotencial del embrión.

Pesce, 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La proteína Oct-4 se encuentra a los 13.5 dpc en las CGPs de ambos sexos. En las hembras a los 14.5 dpc la mayoría de las CGPs han perdido la expresión de Oct-4 y a los 16.5 dpc cuando todas las CGPs se encuentran en cigoteno/paquiteno Oct-4 no se expresa. Oct-4 reaparece en el citoplasma de los ovocitos antes de la fertilización donde se mantiene en niveles bajos. En los machos, Oct-4 se expresa en forma continua en las proespermatogonias. Después del nacimiento está presente en las espermatogonias indiferenciadas tipo A dejando de expresarse en las espermatogonias tipo B poco antes del inicio de la meiosis. (Pesce et al., 1998) (FIGURA 4).

El patrón de expresión de Oct-4 descrito anteriormente, ha llevado a sugerir la relación entre la presencia de Oct-4 y el mantenimiento del estado indiferenciado de las células, ya que la expresión de Oct-4 está restringida a lo que se conoce como ciclo totipotencial (ovocito, cigoto, mórula, MCI, epiblasto y CGPs) y se pierde en aquellas células que inician la diferenciación hacia componentes somáticos.

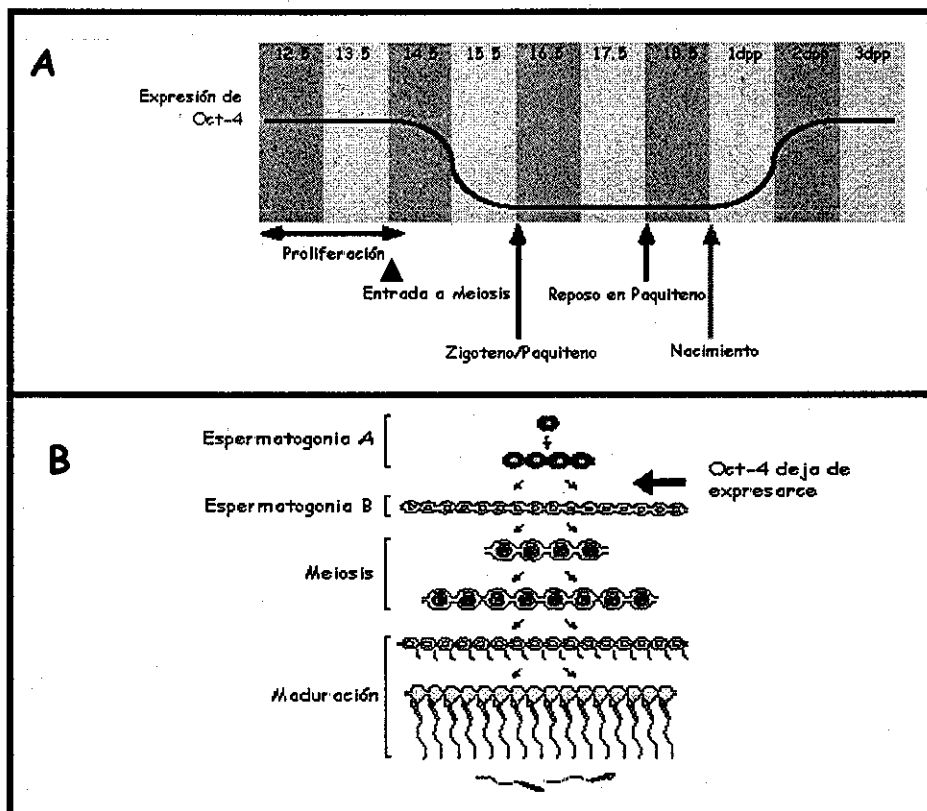


Figura 4. Expresión de Oct-4 en las CGPs de hembras (A) y machos (B).  
Pesce et al. 1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3. Función en el desarrollo temprano

Existen diversos estudios que han demostrado la participación de Oct-4 en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células. En principio, estudios con líneas celulares pluripotentes (ES, EC y EG) demostraron que cuando se induce la diferenciación de dichas células con AR, Oct-4 deja de expresarse (Okamoto et al., 1990; Minucci et al., 1996). Por otra parte, se demostró que la fusión de células EC con fibroblastos inhibe la expresión de Oct-4 y los híbridos obtenidos adquieren un fenotipo neuronal, el cual es revertido si las células híbridas son transfectadas con Oct-4 y E1A (Shimazaki et al., 1993).

La función *in vivo* de Oct-4 ha sido analizada con la mutación nula para este gene en ratón. En este caso la mutación es letal en etapas muy tempranas del desarrollo. En estos embriones, el blastocisto carece de células de la MCI, generándose únicamente células con características correspondientes a trofotodermo (Nichols et al., 1998).

La participación de Oct-4 durante el desarrollo ha sido correlacionada con los niveles de expresión de la proteína. En estudios recientes, donde se modificaron los niveles de expresión de Oct-4 en células ES, se demostró que cuando los niveles de expresión de Oct-4 se incrementan al doble, las células presentan morfología y marcadores moleculares de células del endodermo extraembrionario y mesodermo. Sin embargo, cuando la expresión de Oct-4 se reduce pero no se elimina, las células ES diferencian hacia trofotodermo. Este trabajo sugiere que Oct-4 no sólo funciona como represor de la diferenciación hacia trofotodermo sino que las diferencias en el nivel de proteína podrían estar especificando distintos destinos celulares (Niwa et al., 2000).

### 4. OCT-4 en la línea germinal

#### a) Totipotencialidad vs. entrada a meiosis

Como se mencionó, la proteína Oct-4 está presente en los estadios más tempranos del desarrollo embrionario, los cuales están constituidos en su mayoría por células pluripotenciales. Es interesante que cuando inicia un proceso diferenciativo como la gastrulación, la expresión de Oct-4 se restringe a las células germinales, que por definición son totipotenciales. Esta restricción en la

expresión de Oct-4 ocurre en forma gradual a partir de la región anterior del epiblasto y es acompañada a nivel molecular de un cambio en el mecanismo que regula la transcripción de Oct-4 tal que la transcripción empieza a depender del llamado "*enhancer distal*" dejándose de utilizar el "*enhancer proximal*" (Yeom et al., 1996). De esta forma, Oct-4 se mantiene presente en las células germinales y comienza a perderse cuando las CGPs inician la meiosis, es decir nuevamente al entrar en un proceso diferenciativo. Oct-4 finalmente reaparece en los ovocitos, cuando estos maduran y adquieren identidad de célula totipotencial. Estas observaciones sugieren que Oct-4 podría requerirse para mantener la identidad y propiedades pluripotenciales de las CGPs. De igual manera dichas observaciones son consistentes con la idea de que su desaparición podría constituir una señal necesaria para permitir la meiosis.

Por lo anterior, es importante entender la relación que existe entre la actividad de Oct-4 y las vías transduccionales involucradas tanto en la autoregeneración de las células pluripotenciales como en la inhibición de la meiosis en las células germinales. A este respecto es significativo que en los procesos celulares antes mencionados, la proteína gp130 parece tener un papel importante.

La proteína gp130, es un componente del receptor que media la señal de las citocinas de la familia IL-6 entre los cuales se encuentra LIF ("*leukemia inhibitory factor*"). Estudios *in vitro* hechos con cultivos primarios de CGPs, han demostrado que señales de gp130 podrían prevenir la entrada a meiosis en células germinales de hembra (Chuma y Nakatsuji, 2001). Por otra parte se sabe que la propagación de las células embrionarias totipotenciales de ratón (ES) es dependiente de la presencia de LIF o citocinas que actúan a través del receptor gp130 (Smith et al., 1988). Así mismo la actividad de gp130 en células somáticas promueve la diferenciación, por lo que la activación de gp130 puede interpretarse de distintas maneras dependiendo del tipo celular.

gp130 actúa a través de la activación del factor transcripcional STAT3 además de activar a las MAP cinasas tipo ERK, otras cinasas tipo JAK y la molécula adaptadora Gab1, entre otras proteínas. El grupo de A. Smith quien ha contribuido al entendimiento de las bases moleculares de la pluripotencialidad ha aportando evidencias de que la activación de la vía de STAT3 se asocia con la autoregeneración de células pluripotenciales (Niwa et al., 1998; Matsuda et al., 1999; Raz et al., 1999) mientras que la activación de MAPK/ERK se asocia con la diferenciación preferencialmente en células somáticas.

Aparentemente la activación de STAT3 o ERK ocurre en algunos tipos celulares de manera alternativa. En este contexto Gab1 tiene un papel determinante en la vía de transducción, ya que ésta molécula liga la actividad de gp130 a ERK y/o STAT3 a través de promover la formación de un complejo en el que participan las proteínas Grb2 y SHP2. Existen dos isoformas de Gab1 llamadas Gab1 $\alpha$  y Gab1 $\beta$  y lo que resulta interesante es que Gab1 $\beta$  promueve preferencialmente la activación de STAT3, mientras que Gab1 $\alpha$  se asocia a la activación de MAPK/ERK. Incluso se ha encontrado que la presencia de Gab1 $\beta$  en cultivos celulares de ES es suficiente para impedir la activación de MAPK/ERK (Austin Simith, comunicación personal).

Todo lo anterior, adquiere relevancia, al encontrar evidencias recientes de que el promotor de Gab1 $\beta$  podría ser un blanco de Oct-4, ya que contiene secuencias de unión para este factor transcripcional. Gab1 $\beta$  está presente en tipos pluripotenciales y no en somáticos donde se encuentra Gab1 $\alpha$  (Austin Simith, comunicación personal).

La posibilidad de que Oct-4 sea un regulador de Gab1 $\beta$  sugiere que en las CGPs, su desaparición podría ser determinante para que la vía de gp130 conduzca hacia la diferenciación, es decir a meiosis. Asimismo, la presencia de Oct-4 y Gab1 $\beta$  en las células germinales podría determinar que gp130 se interprete como una señal de autoregeneración y se inhiba la meiosis.

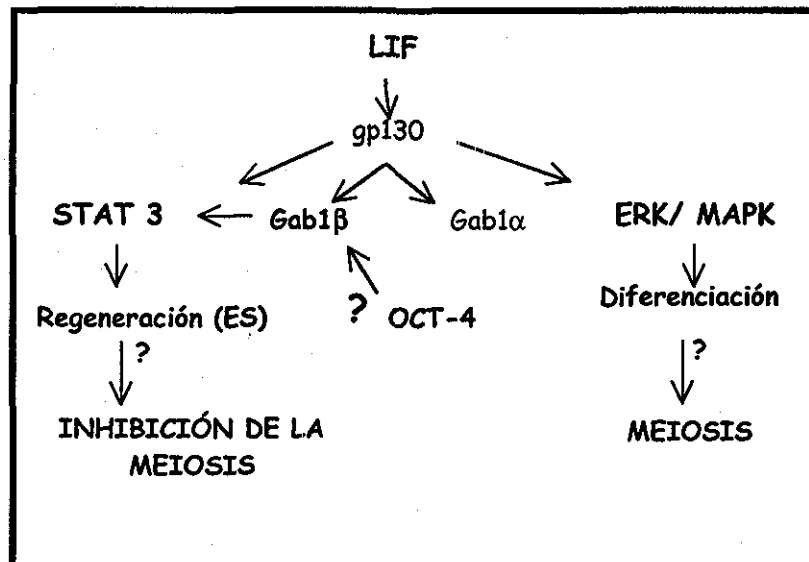


Figura 5. Modelo de la vía de transducción activada por LIF.

## 5. Blancos transcripcionales de Oct-4

Los blancos transcripcionales de Oct-4 que han sido descritos hasta el momento se enlistan en la Tabla 1 (Yuan et al., 1995; Okuda 1998; Niwa, 2000, Ben-Shushan et al., 1998; Liu et al., 1997). El análisis de dichos genes ha demostrado que Oct-4 puede actuar como activador o represor de la transcripción reclutando moléculas que actúan como adaptadores o cofactores y se han propuesto varios modelos de cómo influye la expresión de dichos cofactores en la regulación de la transcripción por Oct-4.

Los cofactores descritos hasta el momento para Oct-4 son la proteína E1A, Sox-2 y el factor no identificado Rox-1. E1A actúa mediando la transactivación a distancia al formar un puente entre Oct-4 y la maquinaria de transcripción, Sox-2 se une cerca de la secuencia de reconocimiento de Oct-4 llevando a la activación transcripcional de genes como *Fgf-4* y *Utf-1*. Por otra parte la interacción entre Oct-4 y Sox-2 también puede regular en forma negativa la transcripción, tal es el caso de la Osteopontina (*Opn*) donde Sox-2 interfiere con la dimerización de Oct-4 evitando con ello la transcripción.

Gene	MCI	CEP	ES
<i>Fgf-4</i>	+	+	+
<i>Utf-1</i>	+	+	+
<i>Tera/226</i>	+	+	+
<i>Lefty-1</i>	+	-	+
<i>Otx-2</i>	+	+	+
<i>Opn</i>	+	-	+
<i>Zfp-42/Rex-1</i>	+	-	+
<i>Upp/383</i>	+	-	+
<i>Slc2a3/Glu-3</i>	+		+
<i>Sox-2</i>	+	+	
<i>ELA</i>	+	-	+

Tabla 1. Patrón de expresión de los genes blancos de Oct-4 en células pluripotentes

CEP= Ectodermo primitivo

MCI= Masa celular Interna

Niwa 2001

### III. OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO Y CULTIVOS DE ÓRGANOS

#### 1. Oligodeoxinucleótidos (ODNs) Antisentido

Los estudios de la biología del desarrollo han empleado diferentes técnicas para conocer el desarrollo e interacción entre los tejidos. En las últimas décadas han sido usadas exitosamente técnicas de biología molecular para realizar manipulaciones genéticas, que incluyen la sobreexpresión, la expresión ectópica o la mutación dirigida de distintos genes. Como una alternativa a estos modelos surgió el uso de oligodeoxinucleótidos antisentido cuya función se basa en el bloqueo específico de la expresión genética. Los ODNs antisentido son secuencias cortas, complementarias al RNAm, las cuales pueden impedir la expresión genética al bloquear los sitios de unión de los ribosomas como el codón AUG en la región 5' no traducida o activar la RNAsa H, enzima que reconoce híbridos de RNA/DNA y los degrada. Además se han diseñado ODNs contra los sitios de "splicing" para impedir la producción del RNAm maduro (Augustine, 1997).

El uso de ODNs antisentido tanto *in vitro* como *in vivo* ha demostrado que los ODNs son poco estables y sensibles a la degradación por nucleasas, por ello se han realizado diferentes modificaciones en la estructura del DNA, principalmente en el enlace fosfodiéster, aunque también se han hecho modificaciones en el azúcar. Estas modificaciones permiten mayor estabilidad y previene la degradación por nucleasas (Augustine, 1997).

De todas las modificaciones químicas desarrolladas, los fosforotioatos han sido los análogos de DNA más estudiados y utilizados en la mayoría de los reportes donde se usan ODNs antisentido. En los ODNs fosforotioatos uno de los oxígeno del enlace fosfodiéster es substituído por un azufre, los ODNs antisentido modificados de esta forma poseen importantes propiedades como mayor afinidad de unión a su blanco, mejor permeabilidad celular, solubilidad en agua y la habilidad para activar la RNAsa H (Agrawal, 1999). En numerosos reportes donde han sido usados los ODNs fosforotiatos se ha demostrado que su uso no es tan simple como se esperaba ya que en algunos casos se ha demostrado que factores como el contenido nucleotídico y la estructura del RNA pueden afectar su especificidad, por lo cual han sido desarrollados métodos para diseñar y evitar resultados confusos (Smith et al., 2000).

## 2. Cultivo de gónadas embrionarias

Diversos reportes han demostrado el éxito del cultivo de órganos del ratón para estudios de biología del desarrollo. En particular, los estudios de sistemas de cultivos de crestas genitales del ratón, (las cuales son de vital importancia en este trabajo) han demostrado que en dichos sistemas las gónadas de hembra tienen un buen desarrollo ya que no presentan masculinización, todas las CGP entran en meiosis en el tiempo esperado y se forman los folículos. En el caso de las gónadas de macho se forman los cordones seminíferos, se diferencian todos los tipos celulares y las CGPs se desarrollan como T-proespermatogonias (McLaren y Buehr, 1990). Otro sistema utilizado para estudiar las interacciones entre las células somáticas de la gónada y las CGPs son los agregados celulares. Estos se obtienen individualizando las células de la gónada para posteriormente reagregarlas *in vitro*. En este sistema, tanto los componentes somáticos como las CGPs se organizan semejando la estructura gónadal. Haciendo este tipo de agregados, con gónadas de macho se observó que existe una estructuración de los cordones seminíferos, aunque la distribución de las CGPs dentro de ellos cambia dependiendo de la edad de los testículos usados (Escalante-Alcalde y Merchant-Larios, 1992). Con este sistema se han hecho estudios de como el ambiente somático de la gónada influye en el inicio de la meiosis, para ello se hicieron agregados de CGPs con células de pulmón (McLaren y Southee, 1997). Utilizando este mismo sistema se determinó el tiempo en que las CGPs se comprometen a iniciar la meiosis (Adams y McLaren, 2002)

## 3. Cultivo de órganos y ODNs antisentido

La combinación de uso de los ODNs antisentido con otras técnicas como los sistemas de cultivo de órganos ha sido de gran ayuda para examinar el papel de algunos genes durante distintos procesos biológicos del desarrollo embrionario. Entre dichos reportes se encuentran el estudio funcional del factor de crecimiento epitelial (EGF) durante el desarrollo embrionario del pulmón (Seth et al., 1993) y del cartílago en la formación de la mandíbula (Shum et al., 1993), el estudio del papel de Hoxb-5 en la formación del pulmón de ratón (Volpe et al., 2000) y la función de FGF-4 en el desarrollo de las extremidades del ratón (Ochiya et al., 1995).



En particular, el uso de ODNs antisentido en los sistemas de cultivos de crestas genitales ha sido reportado recientemente. En dicho reporte se describe el uso de morfolinos (donde la ribosa es substituida por un motivo morfolino) diseñados contra un receptor transmembranal llamado ALK y se demuestra la participación de dicho receptor en la cascada de señales inducida por la substancia anti-Mulleriana. (Visser et al., 2001) Este reporte es de gran importancia para el presente trabajo, ya que es el primer estudio donde se usan ODNs antisentido en cultivos de gónadas embrionarias y valida el uso de ODNs antisentido para el estudio de la función de diversos genes durante el desarrollo embrionario gónadal.

## II. OBJETIVOS

### Objetivo General

Analizar la función del gene *Oct-4* en las células germinales de la gónada de ratón mediante la manipulación de la expresión genética de dicho gene en cultivos de gónadas embrionarias y en ratones transgénicos

### Objetivos específicos

- Inhibir la expresión de *Oct-4* en cultivos de gónadas embrionarias a través del uso de oligodeoxinucleótidos antisentido.
- Observar los efectos de la inhibición de *Oct-4* en distintos aspectos fenotípicos del desarrollo de las CGPs.
- Observar los efectos que tiene la expresión ectópica de *Oct-4* sobre la meiosis, en gónadas embrionarias transgénicas.

### III. JUSTIFICACIÓN

Las investigaciones que pretenden dilucidar la participación de Oct-4 en el desarrollo de la línea germinal se han enfrentado con serias limitaciones. La mutación nula del gene Oct-4 no permite determinar su función durante el desarrollo de las CGPs ya que la represión de Oct-4 induce la pérdida de la pluripotencialidad celular y la diferenciación a células trofoectodérmicas impidiendo el desarrollo embrionario temprano. Por lo anterior, es válida la búsqueda de estrategias que permitan determinar la función de Oct-4 en etapas específicas del desarrollo tales como el origen, diferenciación y determinación sexual de las CGPs.

Oct-4 es un factor de transcripción presente en las CGPs desde su determinación hasta la entrada a meiosis, esta es una razón por la que se sugiere que tiene una participación importante en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las CGPs. Las CGPs durante su desarrollo inician un proceso de diferenciación sexual cuando entran en meiosis, dicho evento coincide con la represión de la expresión de Oct-4. Diversos estudios sugieren que Oct-4 se asocia estrictamente al estado pluripotencial y por lo tanto es incompatible con procesos diferenciativos tales como la meiosis, por lo tanto la represión de Oct-4 podría ser un requisito indispensable para el inicio de la meiosis y con ello de la diferenciación sexual en las CGPs. Sin embargo, esta relación entre Oct-4 y el inicio de la meiosis no se ha determinado hasta el momento.

En un intento por determinar la participación del gene Oct-4 durante el desarrollo de las CGPs y el inicio de la meiosis. El presente trabajo explora varias estrategias que pretenden contribuir al conocimiento del desarrollo de las CGP desde el momento en que colonizan las crestas genitales hasta la entrada a meiosis

## IV. MEDIOS Y SOLUCIONES

### Agua con dietilpirocarbonato (DEPC)

Agregar 1ml de DEPC a un litro de agua destilada estéril agitando toda la noche. Esterilizar y guardar a temperatura ambiente.

### Anticuerpo anti-digoxigenina

A 500µl de TBST 1X se agregaron 3mg de polvo de embrión se dejó disolver durante 30 minutos a 70°C en agitación. Una vez transcurrido este tiempo se enfrió en hielo y se agregaron 5 µl de suero de borrego y 1 µl de anticuerpo anti-digoxigenina (Boheringer)

### DIG 1

Tris 100mM pH 7.5 y NaCl 150 mM

### DIG 2

Se diluyó 1µl de anticuerpo anti-DIG en 2ml de DIG 1

### DIG 3

Tris 100 mM pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl<sub>2</sub> 50 mM

### Karnovsky (Fijador)

Para 50ml de fijador, agregar 6 ml de Glutaraldehido al 25%, 12.5 de Paraformaldehido al 4%, 25ml de Cacodilato de Sodio 0.2 M y 6.5 ml de agua, para una concentración final de 3% de Glutaraldehido, 15 ml de Paraformaldehido, 0.1 M de Cacodilato de Sodio.

### Mg<sub>2</sub>M

1M MgCl<sub>2</sub> y 1M MgSO<sub>4</sub>

**MOPS**

Agregar a 400ml de agua DEPC 20.93g MOPS, 0.05 g Acetato de sodio y 10 ml de EDTA 0.5M. Una vez disuelto ajustar el pH a 7 con hidróxido de sodio 1N y aforar a 500ml para una concentración final de 200 mM de MOPS, 1 mM de Acetato de sodio y 10 mM de EDTA.

**NTMT**

NaCl 100mM, Tris-HCL 100 mM pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 50mM, Tween-20 0.1% y levamisol 2mM

**Nucleótidos para preparar la sonda de RNA**

GTP 10mM, ATP 10mM, CTP 10mM, UTP 6.5 mM y UTP-digoxigenina 3.5 mM

**Paraformaldehído 4%**

Para 100ml se disuelven 4g de paraformaldehído en 86 ml de agua DEPC calentando hasta llegar a 70°C. Se agregaron 2 a 3 gotas de NaOH 5M hasta obtener una solución transparente ajustando el pH a 7.0. Una vez fría la solución se le agregaron 10ml de PBS-DEPC 10X y se aforó con agua DEPC a 100ml finales los cuales se alicuotaron y se guardaron a -20°C

**PBS**

Disolver 8g de en 800ml y ajustar el pH a 7.5 con HCl después aforar a 1 litro con agua tratada con DEPC para una concentración final de 100mM de NaCl, 100mM de KCl, 5mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PBT**

PBS y Tween-20 al 0.1%

**Proteinasa K**

La proteinasa K se disolvió a una concentración final de 10 µg/ml en PBT

TEJIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Solución 1**

Para 100 ml agregar 50ml de Formamida, 25ml de SSC 20X pH 4.5 y 10ml de SDS 10%, aforar a 100ml con agua tratada con DEPC, para una concentración final de formamida al 50%, SSC 5X pH 4.5 y SDS 1%

**Solución 2**

NaCl 0.5M, Tris-HCl 10mM pH 7.5, Tween-20 10%

**Solución 3**

Para 100ml agregar 50ml de Formamida, 10ml de SSC 20X, aforar a 100ml con agua tratada con DEPC, para una concentración final de formamida al 50% y SSC 2X pH 4.5.

**Solución Coloreadora**

Por cada ml de DIG 3 se agregaron 30mg  $\mu$ l de NBT y 150  $\mu$ g de BCIP

**Solución de cargado para RNA**

600  $\mu$ l de Formamida, 179  $\mu$ l de Formaldehido, 100 $\mu$ l de MOPS 10X, 8.3  $\mu$ l de Bromuro de etidio (10mg/ml) y 113  $\mu$ l de agua con DEPC

**Solución de Prehibridación**

Para 1ml se solución, 500  $\mu$ l de formamida, 250  $\mu$ l de SSC 20X pH 5.0, 5 $\mu$ l de 10mg/ml de RNA de levadura, 100  $\mu$ l de SDS al 10% y 140  $\mu$ l de agua DEPC, para una concentración final de Formamida 50%, SSC 5X pH 5, RNA de levadura 50 $\mu$ l/ml, SDS 1% y heparina 50 $\mu$ l/ml

**Solución de Rinaldini**

NaCl 8g, KCl 0.20g, Citrato de Sodio 1g, Fosfato Monobásico 0.5 g, Carbonato de Sodio 1g, Glucosa 1g. Aforar a 1 litro con agua desionizada, para una concentración final de 1mM de NaCl, 1mM de KCl, 3.4 mM de Citrato de Sodio, 3.6mM de Fosfato Monobásico, 9.4 mM de Carbonato de Sodio, 5.5 mM de Glucosa, esterilizar por filtración con un filtro de poro 0.45  $\mu$ m. guardar a 4°C.

**SSC 20X**

NaCl 175.3g y Citrato de Sodio 88.2g, se ajustó el pH a 7.0 con NaOH (10N) y se aforó a 1 litro con agua, para una concentración final de 3M de NaCl y 0.3M de Citrato de Sodio.

**TBST 10X**

NaCl 8g . KCl 0.2 g , 25 ml de Tris-HCl 1M pH 7.5, 10ml de Tween-20 en 100ml de agua bidestilada estéril, para una concentración final de 136mM de NaCl, 100mM de KCl, 0.25M de Tris-HCl pH 7.5 y 10% de Tween-20. Para utilizar se diluyó a 1X y se agregó levamisol a una concentración final de 2mM

**Zatterqvist**

Preparar las siguientes soluciones

Solución A. Disolver 2.94 g de Veronal Sodico (Barbital) y 1.94 g de Acetato de Sodio en 100 ml de agua bidestilada.

Solución B. Disolver 8 g de Cloruro de Sodio, 0.4 g de Cloruro de Potasio y 0.2 g de Cloruro de Calcio en 100ml de agua bidestilada.

Tetroxido de Osmio. Disolver 1g de  $OsO_4$  en 52,2 ml de agua bidestilada por 24 horas.

Para preparar el fijador, agregar 20ml de la solución A, 6.8ml de la solución B, 21 ml de HCl 0.1N y 52.2 ml de  $OsO_4$ . Ajustar el pH a 7.2-7.4 y refrigerar, en caso de reducirse, agregar poco a poco peroxido de  $H_2O_2$  al 3% en cantidad de 1ml por cada 10ml  $OsO_4$ .

## V. MÉTODOS

### 1. Animales

En este estudio se usaron ratones de la cepa CD-1 que se mantuvieron en un cuarto con fotoperíodo de 10 horas de luz y 14 horas de obscuridad. Para las cruces se usó una hembra y un macho por caja durante toda la noche, revisando al siguiente día la presencia del tapón vaginal indicativo de la cópula. Este día se consideró como el 0.5 dpc.

### 2. Obtención de Gónadas Embrionarias

Las hembras gestantes fueron sacrificadas por dislocación cervical. Los úteros fueron disectados y los embriones sumergidos en medio L15 (Microlab, México) con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Las crestas genitales fueron removidas de los embriones bajo un microscopio estereoscópico y separadas de acuerdo al sexo para su posterior cultivo (Moreno, 1999)

### 3. Cultivo de Gónadas

Las crestas genitales de los embriones fueron cultivadas sobre filtros de policarbonato (Nucleopore) flotando sobre medio de cultivo McCoy suplementado con L-glutamina (Microlab) y con 10% de SFB. Dependiendo del procedimiento experimental, fueron colocados en el medio de cultivo los ODNs antisentido o ácido retinóico. Los cultivos se hicieron en incubadoras a 37° C con humedad a saturación y atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire (Moreno, 1999).

### 4. Agregados de Crestas Genitales.

Se obtuvieron las crestas genitales de los embriones algunas de las cuales se separaron del mesonefros con la ayuda de jeringas de insulina. Posteriormente se hicieron agregados, colocando tres crestas urogenitales sin mesonefros y una con mesonefros en tripsina al 0.25% en solución de Rinaldini por 15 minutos a 37°C, la tripsina se inactivó con SFB y las gónadas se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, resuspendiéndose en Medio McCoy con suero fetal de ratón al 10%. Las gónadas tripsinizadas se disociaron con una pipeta pasteur, se centrifugaron y resuspendieron en 500 µl de medio con el ODN antisentido a la concentración deseada. Las células gonadales ya reagregadas se incubaron 20 minutos a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. La pastilla de células



gonadales fue cultivada en medio McCoy con 10% de suero de ratón y sobre filtros de policarbonato (Nucleopore.) (Moreno, 1999). Los ODNs antisentido se colocaron en el medio de cultivo a una concentración de  $40\mu\text{M}$

## 5. Hibridación *in situ* en Órganos Completos

### A) Fijación y almacenamiento.

Después del cultivo, las crestas genitales o agregados se fijaron inmediatamente con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante una hora. Se lavaron dos veces durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  con PBT, después se deshidrataron con metanol al 25, 50, 75 y 100% en PBT durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en metanol al 100% hasta que se realizó la hibridación.

### B) Preparación de la sonda

A temperatura ambiente se realizó la siguiente mezcla:

10  $\mu\text{l}$  de agua destilada

4  $\mu\text{l}$  de solución de transcripción 5X (Boheringer)

2  $\mu\text{l}$  de DTT 0.1 M (Boheringer)

2  $\mu\text{l}$  de mezcla de ribonucleótidos 10X (BioLabs)

1  $\mu\text{g}$  de plásmido lineal pBIKSOct-3cDNA

5  $\mu\text{l}$  de RNasin (100u/ $\mu\text{l}$ )

T3 RNA polimerasa (10u/ $\mu\text{l}$ ) para el sentido

T7 RNA polimerasa (10u/ $\mu\text{l}$ ) para el antisentido

La mezcla se incubó por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , se precipitó agregando 100 $\mu\text{l}$  de agua, 10 $\mu\text{l}$  de Cloruro de Litio 4M y 300  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto, se dejó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Se centrifugó por 10 minutos y la pastilla se lavó con etanol al 70% y se dejó secar. Una vez seca se resuspendió en agua libre de RNAsas para obtener una concentración final de 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . La concentración se midió

### C) Gel para RNA

Se preparó un gel de agarosa al 1% en solución de MOPS 1X, una vez fría la agarosa se agregó formaldehído para una concentración final de 5%. Se tomaron 4 $\mu\text{l}$  del RNA de la sonda y se agregaron

12  $\mu$ l de la solución de cargado incubando a 65° C por 5 minutos, inmediatamente después las muestras se enfriaron en hielo y se adicionaron 2  $\mu$ l de azul de bromofenol y xilencianol. Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron a 100 volts, posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

#### D) Transferencia

La membrana se lavó con SSC 2X y se fijó mediante entrecruzamiento con luz UV, se lavó nuevamente en la solución DIG 1 por 15 minutos. Después se bloqueó durante 30 minutos en agitación con la solución de bloqueo (Boehringer) al 0.5% y posteriormente se incubó por 30 minutos en una solución con el anticuerpo anti-digoxigenina (Boehringer) (DIG-2). Se lavó dos veces el anticuerpo con DIG1 y se coloreó con DIG 3 más NBT y BCIP.

#### E) Hibridación.

Las crestas genitales se hidrataron al pasarlas por metanol en PBT al 75, 50 y 25% durante 5 minutos cada uno, después se lavaron dos veces con PBT por 5 minutos y se trataron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% en PBT durante una hora. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBT durante 5 minutos y se trataron con proteinasa K durante 5 minutos, luego se lavaron con glicina (2mg/ml) en PBT y con PBT durante 5 minutos. Se volvió a fijar con glutaraldehído/paraformaldehído (2%/4%) con tween-20 al 0.01% durante 20 minutos. Se incubaron a 70° C durante una hora en la solución de prehibridación y se dejaron 12 horas a 70° C en la solución de prehibridación mas 1  $\mu$ g/ml de sonda.

Se lavaron dos veces durante 30 minutos a 70° C con la solución 1. Después se lavaron con una solución 1:1 de la solución 1 y 2 por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 4 veces con la solución 2 por 5 minutos a temperatura ambiente y un lavado de 5 minutos con la solución 3 y dos lavados más con la solución 3 a 65° C por 30 minutos. Luego se hicieron tres lavados de 5 minutos con TBST.

Se bloqueó con suero de borrego al 10% en TBST, después de 2 ó 3 horas se cambió la solución, se agregó el anticuerpo y se dejó durante la noche a 4° C. Al día siguiente se lavaron con TBST 3 veces durante 5 minutos y 4 veces mas durante una hora, finalmente se dejó toda la noche en TBST.

Para revelar, el anticuerpo anti-digoxigenina se lavó 3 veces con NTMT durante 10 minutos y posteriormente se incubó en la obscuridad con 175  $\mu$ g/ml y 300  $\mu$ g/ml, al observar la señal, se lavó

dos veces con PBT por 15 minutos, una vez con glicerol al 50% y se guarda en glicerol al 80% en PBT (Hogan et al., 1994).

## **6. Procesamiento Histológico**

### **A) Inclusión en parafina**

Una vez terminados los cultivos, las crestas genitales o los agregados fueron fijados con PFA al 4% en PBS toda la noche, después de la fijación se lavaron 5 minutos en PBS seguido de NaCl 0.150mM. Posteriormente se deshidrataron gradualmente con etanol al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%, xilol:etanol (1:1) y xilol por 30 minutos cada uno, luego se impregnaron a 60° C con xilol:parafina (1:1) 30 minutos y se hicieron dos cambios de parafina por 45 minutos cada uno antes de su inclusión. Se hicieron cortes de 8 micras y se montaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina.

### **B) Inclusión en EPON**

Las muestras para su procesamiento por microscopía electrónica o de luz fueron colocados en fijador Karnovsky (Karnovsky, 1965), sin calcio durante 1h y posteriormente se pasaron a buffer de cacodilato de sodio (0.1M pH 7.3). Se fijaron con tetróxido de Osmio al 1% en buffer Zatterqvist, posteriormente se deshidrataron gradualmente con etanol 30, 50, 70, 80, 90 y 100% y se incluyeron en EPON 812. Para microscopía de luz se hicieron cortes semifinos de una micra teñidos con azul de toluidina. Cortes ultrafinos 90-100 nm se analizaron por microscopía electrónica.

### **C) Inclusión en LRW**

Las muestras se fijaron en PFA al 4% en glutaraldehido por 1 hora, posteriormente se deshidrataron gradualmente con etanol al 10, 20, 30, 50 y 60% durante 1 hora a 4°C y con etanol al 70, 90 y 100% por 1 hora a -20 °C. Posteriormente se pasaron por una mezcla de etanol-LRW 2:1 durante 3 horas y etanol:LRW 1:1 durante toda la noche, por último se dejaron en LRW por 12 horas y se incluyeron a 56 °C.

## 7. Diseño de ODNs

Los primeros ODNs (1S y 2S) fueron diseñados contra el sitio de inicio de la traducción, conteniendo 15 nucleótidos y modificados como fosforotioatos. Estos ODNs antisentido se basaron en diseños anteriores hechos para otros genes usados en cultivos de órganos. (Volpe, 2000; Seth, 1993; Ochiya, 1995.) Los siguientes ODNs antisentido AA, AB, AC y AD se diseñaron con un programa de computación que analiza la estructura del RNAm (TABLA 2) (Patzel et al., 1999), el cual se describe en los resultados. Todos los ODNs antisentido fueron elaborados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

### A) Purificación de los ODNs antisentido

Los ODNs antisentido fueron desalificados por columnas de Sep-Pak (C18) antes de colocarlos en el cultivo. La columna se lavó con 5 ml de acetonitrilo y posteriormente con 5 ml de agua, después, el ODNs disuelto en 1.5 ml de se pasó muy lentamente por la columna y se colectó el efluente pasando dos veces más el efluente colectado en el paso anterior. La columna se lavó con 3 ml de agua desechando el efluente y se eluyó con 3 ml de una solución de acetonitrilo:agua (50:50 v/v) colectando en 3 tubos eppendorff (1 ml en c/u). Posteriormente se sacaron en el Savant y se resuspendieron en 20  $\mu$ l de agua mQ y finalmente se midió la absorbancia a 260nm.

## 8. Inmunofluorescencia

Para la inmunofluorescencia de la proteína Scp-3 los disgregados-agregados fueron embebidos en OTC (Tissue-Tek) y cortados en rebanadas de 10  $\mu$ m que se montaron en laminillas cubiertas con poli-L-lisina. Posteriormente fueron fijados con PFA al 2% en PBS por 20 minutos, luego se lavaron dos veces con PBS 1X en frío durante 5 minutos y se permeabilizaron con acetona durante 20 minutos, nuevamente se lavaron en frío dos veces con PBS 1X y se bloquearon una hora con 3% de albúmina de suero bovino (BSA) y 10% de suero de cabra en PBS. El anticuerpo contra la proteína Scp-3 fue diluido 1:500 con BSA al 1% en PBS e incubado toda la noche a 4°C. Al día siguiente el anticuerpo primario se lavó dos veces con PBS 1X en frío y se colocó el anticuerpo secundario ALEXA 421 en una dilución 1:1000 con 1% de BSA, después de dos horas, se hicieron dos lavados con PBS 1X y se realizó el análisis por microscopía de fluorescencia (Chuma y Nakatsuji, 2001).

## VI. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo, se utilizaron las siguientes estrategias experimentales:

### 1) Análisis del efecto de la supresión del gene Oct-4 sobre las CGPs en cultivos de gónadas embrionarias o en agregados

La lógica de esta estrategia fué utilizar ODNs antisentido u otros recursos para inhibir la transcripción de Oct-4 en las CGPs. Esto se haría en gónadas de machos en donde, como ya se ha explicado, Oct-4 se mantiene presente y los componentes gonadales del tipo somático impiden la entrada a meiosis.

De acuerdo a los argumentos planteados en la introducción e hipótesis esperábamos que la inhibición de Oct-4 conduciría a que las CGPs de macho entraran en meiosis o bien sufrieran apoptosis si alguna condición les impidiera entrar en meiosis. Con estas premisas, se proyectó utilizar gónadas de macho de 11.5dpc, que según determinaciones experimentales descritas en la introducción, aun son capaces de responder a factores inhibidores de meiosis. Estas gónadas se cultivarían en presencia de ODNs y posteriormente se determinaría en ellas la presencia o ausencia de Oct-4. Lo mas deseable, era detectar la proteína Oct-4 ya que algunas veces los ODNs interfieren la síntesis de proteínas. Lamentablemente no tuvimos éxito en intentos de detección inmunohistoquímica, por lo cual, se planeó hacer hibridaciones *in situ* y observar la desaparición del transcrito.

Antes de empezar los cultivos tempranos, para el propósito exclusivo de medir el bloqueo de Oct-4 decidimos usar cultivos de gónadas de 12.5 dpc ya que en este tiempo la gónada es más grande y fácil de manipular, además el sexo se puede reconocer a simple vista por la presencia o ausencia de cordones seminíferos.

Una vez comprobado el bloqueo de la transcripción, se evaluaría el proceso de meiosis a través de la detección de la expresión de la proteína del complejo sinaptinémico Scp-3 mediante ensayos inmunohistoquímicos. Los resultados de este análisis podrían corroborarse por microscopía electrónica y según lo explicado anteriormente, podríamos evaluar la apoptosis por métodos convencionales.

En caso de no tener éxito para inhibir la expresión de Oct-4 en cultivos de gónadas se consideró realizar los experimentos antes descritos, en agregados gonadales. Estos se obtienen disgregando la gónada con tripsina para obtener células individuales las cuales por centrifugación vuelven a agregarse. Con este sistema las CGPs estarían expuestas en forma directa a los ODNs.

Algunas de las evaluaciones previas que se llevarían a cabo antes de probar los ODNs se enuncian a continuación:

- A) Se confirmaría la presencia de marcadores de la línea germinal como la FA y Oct-4 en gónadas a diferentes tiempos de incubación
- B) En agregados de hembra, se evaluaría la viabilidad de las CGPs y la entrada a meiosis
- C) En agregados de machos se analizaría la viabilidad de CGPs la expresión de Oct-4 y la toxicidad de los ODNs.

## 2. Análisis del efecto de la expresión ectópica de Oct-4 durante la entrada a meiosis

Otra estrategia para analizar la participación de Oct-4 en el inicio de la meiosis era analizar el proceso de entrada a meiosis en gónadas de hembras transgénicas. Las hembras transgénicas que estudiaríamos expresan continuamente Oct-4 a través del sistema Cre/LoxP el cual se detalla mas adelante. Si de acuerdo con nuestra hipótesis, la presencia de Oct-4 en las gónadas impide la entrada a meiosis; las CGPs de las gónadas transgénicas descritas debían presentar alteraciones en este proceso. La determinación de células en meiosis se haría analizando la presencia de la proteína Scp-3. La proteína Scp-3 es un marcador de la transición meiótica ya que su expresión es específica de las primeras etapas de células de la meiosis por ser un componente de los elementos axiales en los complejos sinaptinémicos.

## VII. RESULTADOS

### I. BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE OCT-4.

#### 1. Cultivos de Gónadas

##### A) Análisis de la expresión de marcadores en gónadas cultivadas.

El cultivo de gónadas embrionarias ha sido de gran ayuda para analizar el desarrollo gonadal *in vitro*, en este sistema la gónada tiene un desarrollo normal conservando sus estructuras características así como las CGPs. Como se mencionó con anterioridad, los reportes donde se describe el desarrollo de las gónadas en cultivo se han basado en el análisis morfológico de la gónada a través de cortes histológicos, sin considerar la expresión de marcadores importantes en el desarrollo de las células germinales. Por tal motivo, antes de iniciar nuestro estudio fue necesario determinar el comportamiento *in vitro* de dos marcadores de la línea germinal como son el factor de transcripción Oct-4 y la fosfatasa alcalina.

Inicialmente se realizó un ensayo para determinar la actividad a FA en los cultivos, para ello fueron cultivadas gónadas de 12.5 dpc durante 24, 48 y 72 horas. Una vez terminado el cultivo, las gónadas fueron fijadas y procesadas haciendo cortes histológicos en parafina. En dichos cortes se realizó la reacción a FA. El resultado de este experimento demostró que las CGPs en cultivo conservan su actividad a FA y que dicha actividad tanto en machos como en hembras es comparable con la actividad observada en gónadas no cultivadas para todos los tiempos de cultivo. La FA es uno de los marcadores más frecuentemente usados de la línea germinal por lo cual estos resultados nos indican que las CGPs se conservan en los cultivos de gónadas hasta por 72 horas y además la cantidad CGPs positivas a FA durante diferentes tiempos de cultivo, es cualitativamente comparable con las CGPs presentes en las gónadas que no fueron cultivadas (FIGURA 6 y 7).

Otro de los marcadores de la línea germinal que analizamos en los cultivos es el gene Oct-4. En la introducción, se describió que Oct-4 se expresa en las células germinales de ambos sexos hasta antes del inicio de la meiosis. Esto significa que Oct-4 se expresa continuamente en los machos durante el desarrollo embrionario, ya que la meiosis inicia hasta después del nacimiento. A su vez en las hembras Oct-4 se expresa hasta los 16.5 dpc cuando todas las CGPs se encuentran en meiosis. El análisis de la expresión de Oct-4 en los cultivos de gónadas embrionarias se realizó con gónadas de

13.5 dpc que fueron cultivadas durante 24, 48 y 72 horas. Después del cultivo, se determinó la expresión de Oct-4 por hibridación *in situ* comparando la señal obtenida con la de gónadas no cultivadas.

La hibridación *in situ* demostró que la expresión de Oct-4 en cultivos de gónadas de macho coincide en su cinética con la expresión observada en las gónadas no cultivadas (FIGURA 8). Aunque el transcrito está presente durante todo el período analizado, observamos una disminución de la expresión de Oct-4 conforme aumenta el tiempo de cultivo o los días de desarrollo en concordancia con el reporte de Pesce (Pesce et al., 1998).

En el caso de los cultivos de gónadas de hembra se observó la pérdida casi total del transcrito a los 14.5 dpc coincidiendo con el reporte de Pesce (datos no mostrados).

Con los resultados antes descritos determinamos que la expresión de Oct-4 y la actividad de FA son similares tanto *in vitro* como *in vivo*, así que consideramos los cultivos de gónadas embrionarias como un buen modelo de estudio *in vitro* que nos permitiría entender los eventos moleculares que ocurren *in vivo* durante la diferenciación sexual de las CGPs.

#### B) Cultivos en presencia de ODNs antisentido.

Inicialmente se probaron los ODNs antisentido 1S y 2S que fueron diseñados contra los dos sitios de inicio de la traducción descritos para Oct-4 (Tabla 2) y la concentración de los ODNs antisentido que se usó en estos ensayos (40 y 60  $\mu\text{M}$ ) fue seleccionada con base en trabajos anteriores (Ochiya et al., 1995; Seth et al., 1993; Volpe et al., 2000). Los resultados de la hibridación *in situ* contra Oct-4 mostraron que los ODNs antisentido no alteraban visiblemente la presencia del transcrito de Oct-4 en dichos cultivos. (FIGURA 9).

Como se mencionó en la estrategia experimental, era probable que la estructura gonadal dificultara el acceso de los ODNs antisentido. Sin embargo, debido a la existencia de varios reportes donde ODNs antisentido fosforotioatos han podido penetrar con facilidad otros tejidos decidimos hacer algunos ensayos.

Para facilitar la penetración de los ODNs antisentido en la gónada en cultivo, utilizamos lipofectamina que es un reactivo usado para la transfección celular. La lipofectamina sirve para que el DNA sea atrapado en liposomas artificiales y se fusionen con la membrana celular. Esta se usó en la



misma forma y concentración que anteriormente se reportó para el cultivo de extremidades de ratón (Ochiya et al., 1995). Se hicieron cultivos de gónadas de 12.5 dpc que se incubaron durante 48 horas. La mezcla de lipofectamina y el ODNs antisentido (1:1) se colocó sobre la gónada por un periodo de 20 minutos, posteriormente se lavó y al término del cultivo se realizó la hibridación *in situ* contra Oct-4 para observar si hubo algún efecto en la transcripción. Los resultados de la hibridación muestran la expresión de Oct-4, por la cual se concluye que bajo estas condiciones no hubo una disminución aparente del transcrito (FIGURA 10).

Después de realizar experimentos cultivando gónadas embrionarias, no sabíamos con claridad por qué no logramos inhibir la transcripción de Oct-4, no obstante existían varias explicaciones posibles. Una de ellas se mencionó con anterioridad y se refiere a la inaccesibilidad de los ODNs antisentido a las CGPs en los cultivos de gónadas, ya sea por razones de permeabilidad o por la rápida degradación de los ODNs. Otra posibilidad era que la secuencia utilizada para el diseño del oligonucleótido, no fuera capaz de inhibir la transcripción.

Una alternativa que se había considerado ante la inaccesibilidad del ODN era utilizar agregados gonadales. En este sistema al disgregar las gónadas para obtener células individuales o en grupos pequeños, haríamos posible la interacción directa entre el ODN y las células germinales, superando el requerimiento de que el ODN atravesara la túnica albugínea que recubre el testículo. Por otra parte, en relación a la posibilidad de que las secuencias consideradas para el diseño de los ODNs antisentido, no fueran adecuadas como blanco para inhibir la transcripción, se diseñaron nuevas secuencias de ODNs antisentido basadas en un análisis cuya descripción se menciona a continuación.

## 2. Diseño de otros ODNs antisentido

Se diseñaron nuevos ODNs antisentido a través de un programa de computación que se basa en la predicción de la estructura secundaria del RNAm y reglas semiempíricas para identificar las secuencias blanco de más fácil acceso incrementando así la probabilidad de seleccionar los ODNs más efectivos (Patzel et al., 1999). El análisis del RNAm a través del sistema anteriormente descrito utilizó los siguientes criterios:

- a) Presencia o ausencia de una región para la degradación del RNA (ggugga)
- b) Contenido nucleotídico de C y G lo que permite la formación de híbridos estables

c) Determinación de sitios con mayor probabilidad de hibridar con el ODNs a través de un programa de doblamiento que determinó los sitios del RNAm más expuestos.

A través de este análisis se obtuvieron 14 secuencias óptimas que reunían la mayoría de los criterios. De estas secuencias se seleccionaron 4 de ellas, las cuales se indican en la tabla 2.

El diseño de las secuencias así como la consulta de los programas de computación empleados en este análisis fueron realizados por el Dr. Alejandro Garcíarrubio.

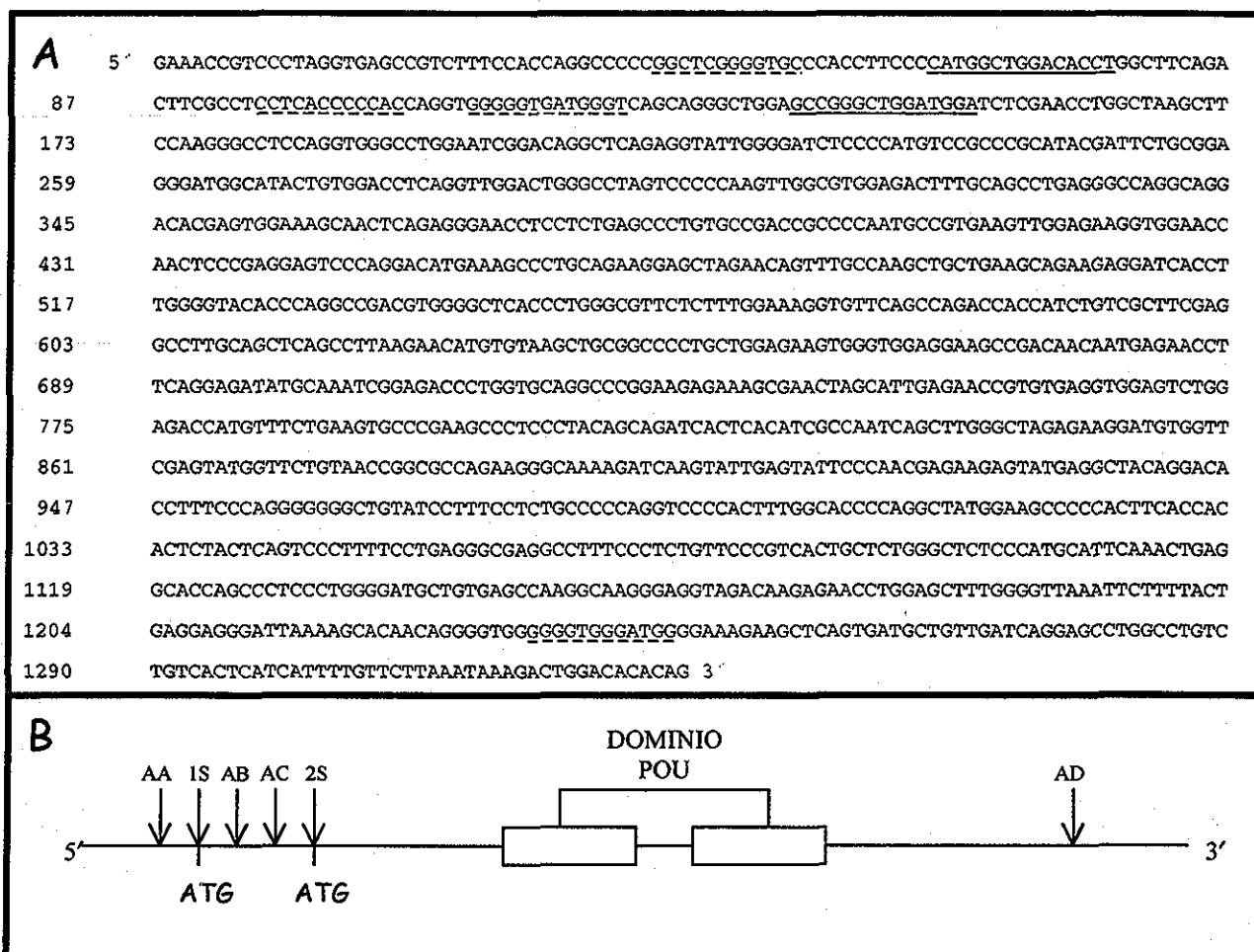


Figura 6. Secuencia del RNAm de Oct-4, donde se señalan con una línea los sitios blanco de los ODNs antisentido (A). Esquema que representa los sitios en el RNAm de Oct-4 contra los cuales se diseñaron los ODNs antisentido (B)

ODNs ANTISENTIDO	SECUENCIA	POSICIÓN	
<u>1S</u>	CATGGCTGGACACCT	63	— Primeros ODNs diseñados contra el ATG.
<u>2S</u>	GCCGGGCTGGATGGA	141	— ODNs diseñados con el programa de computación.
<u>AA</u>	GGCTCGGGGTGC	41	
<u>AB</u>	CCTCACCCCCAC	95	
<u>AC</u>	GGGGGTGATGGG	112	
<u>AD</u>	GGGGTGGGATGG	1235	

Tabla 2. Oligodeoxinucleótidos antisentido diseñados contra RNAm de Oct-4

### 3. Cultivos de Agregados de Gónadas Embrionarias

#### A) Viabilidad y entrada a meiosis en cultivos de agregados.

Como se mencionó con anterioridad los cultivos con agregados se realizaron como una forma alternativa para aumentar la disponibilidad de los ODNs antisentido, así que fue necesario hacer varios ensayos para determinar si el cultivo de agregados era útil a nuestro objetivo. En esta sección se abordan los experimentos realizados para determinar si los agregados recapitulaban los eventos que ocurren *in vivo* como el inicio de la meiosis, por esta razón inicialmente se hicieron agregados de gónadas de hembra y posteriormente se hicieron ensayos con gónadas de macho.

En agregados de gónadas de hembra de 12.5 dpc cultivados por 72 horas se examinó la presencia de células meióticas por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra la proteína Scp-3 presente en los complejos sinapteinémicos (Yuan et al., 2000). Los resultados obtenidos en este ensayo muestran la presencia de células positivas para la expresión de la proteína Scp-3, lo cual indica que las CGPs de 12.5 dpc en cultivo de agregados ya han iniciado la entrada a meiosis a las 72 horas de cultivo (FIGURA 11).

Por otra parte los agregados de macho se cultivaron por 48 y 72 horas y se analizó por microscopía de luz en cortes semifinos la presencia de CGPs. Los resultados muestran que la viabilidad de las CGPs en los machos es menor que en el caso de las hembras ya que aunque todavía son viables a las 48 horas, después de 72 horas de cultivo la mayoría de las CGPs han muerto (FIGURA 12).

### **B) Selección de los ODNs antisentido**

Con base en los resultados anteriores, decidimos probar los ODNs antisentido en agregados de macho cultivados durante 48 horas. En este experimento, nuestro propósito fue determinar si su presencia no alteraba el desarrollo del cultivo ni la morfología normal de las estructuras gonadales de manera inespecífica. Para ello primero se purificaron los ODNs antisentido por columnas sePak (ver Métodos) y posteriormente se colocaron en el cultivo (Los ODNs utilizados se muestran en la TABLA 2). Al término del cultivo los agregados fueron procesados para realizar cortes semifinos y analizar por microscopía de luz su morfología. Los resultados mostraron que algunos ODNs afectan la morfología del agregado encontrándose una mala organización de las estructuras gonadales, la falta de cordones seminíferos, la presencia de abundantes células muertas y la ausencia de CGPs (FIGURA 13C). En otros casos, los agregados no se vieron afectados por los ODNs pues su morfología fue similar a la de los controles donde se encontraron abundantes CGPs dentro de los cordones seminíferos (FIGURA 13 A,B). Ignoramos si la causa de los efectos en el desarrollo por algunos de los ODNs se asocia a su secuencia nucleotídica o es un efecto tóxico debido a que estos ODNs no se lograron purificar optimamente. Por lo anterior para nuestros experimentos decidimos utilizar los ODNs antisentido AA, AB y AD ya que en su presencia se conservan estructuras como los cordones seminíferos y en especial las CGPs. (FIGURA 13).

Una vez que seleccionados los ODNs antisentido, decidimos probar si había algún efecto de estos sobre el RNAm de Oct-4. Para ello decidimos usar agregados de gónadas de macho de 13.5 dpc cultivados por 48 horas. Este tiempo de cultivo nos permitiría ver células meióticas en caso de que alguno de los ODNs fuera funcional.

### **C) Expresión de marcadores de CGPs en cultivos de agregados**

Inicialmente, se analizó la expresión de marcadores de la línea germinal en agregados de macho de 13.5 dpc cultivados por 48 horas. Era de esperar que si dichos agregados podían recapitular la organización gonadal entonces también conservarían la expresión de marcadores moleculares de la línea germinal. Utilizando la actividad de la fosfatasa alcalina, así como la hibridación *in situ* contra Oct-4, se determinó que en agregados de gónadas de macho, las CGPs mantienen la expresión de ambos marcadores hasta por 48 horas (FIGURA 14) por lo cual, en ellos se procedió al análisis del efecto de los ODNs antisentido sobre el transcrito de Oct-4.

#### D) Cultivos de agregados con los ODNs antisentido

Finalmente los ODNs antisentido anteriormente seleccionados, se probaron en agregados de 13.5 dpc cultivados durante 48 horas. Los resultados de las hibridaciones *in situ* para cada ODNs antisentido se muestran en la FIGURA 15. En la figura se puede observar que las CGPs se distribuyen en el centro del agregado o en la periferia. Lamentablemente, ninguno de los ODNs antisentido inhibió completamente la expresión de Oct-4 al comparar con los controles, si bien el oligo AB causó una disminución parcial de la expresión. Sin embargo al realizar varias repeticiones con este ODNs antisentido concluimos que no había bloqueo suficiente ya que para nuestros fines era necesario una inhibición total de la síntesis del transcrito.

## II. USO DE ÁCIDO RETINÓICO (AR)

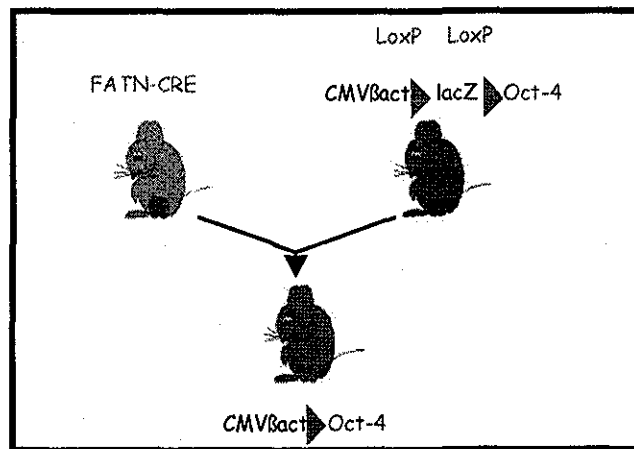
En cultivos de células pluripotenciales como ES y EC se sabe que al inducir la diferenciación con AR Oct-4 deja de expresarse ya que es regulado negativamente por AR. Otra estrategia que utilizamos para inhibir la expresión de Oct-4 en cultivos de gónadas fue tratar dichos cultivos con AR. Para ello cultivamos gónadas de 12.5 dpc por 24 y 48 horas y posteriormente hicimos hibridaciones *in situ* para observar si había algún efecto en la expresión de Oct-4. En un principio usamos concentraciones de 0.25-1  $\mu\text{M}$  sin observar efecto, posteriormente decidimos aumentar las concentraciones y encontramos que tratando las gónadas con 5 y 10  $\mu\text{M}$  de AR durante 48 horas había una reducción considerable de la expresión de Oct-4. (FIGURA 16) Sin embargo, al realizar el análisis por microscopía de luz en cortes finos de dichos cultivos, observamos que con estas mismas concentraciones la morfología de la gónada estaba alterada. A concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  de AR encontramos abundantes células muertas, posiblemente apoptóticas (FIGURA 17), mientras a las concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  de AR el efecto fue mas drástico encontrándose grandes espacios extracelulares además de no observar la formación de cordones seminíferos.

Con base en nuestros resultados el ácido retinóico en concentraciones superiores a los 5  $\mu\text{M}$  afecta considerablemente los cultivos de gónadas embrionarias. Por lo cual con estos experimentos concluimos que en los cultivos de gónadas donde la concentración de AR tiene efecto sobre la expresión de Oct-4 hay un daño severo en la morfología de la gónada en consecuencia el uso del AR para estudiar el efecto de la supresión de Oct-4 no es recomendable.

### III. SOBREENPRESIÓN Y EXPRESIÓN ECTÓPICA DE OCT-4 EN LA GÓNADA

Otra de las estrategias que se plantearon para tratar de entender la relación entre Oct-4 y el inicio de la meiosis fue analizar gónadas de hembra de un ratón doble transgénico que expresara Oct-4 en forma continua en las CGPs, es decir, a partir de su establecimiento y durante todo su ciclo de desarrollo. En este caso, esperabamos que al incrementar la expresión de Oct-4 y mantenerla activa en el momento en que las CGPs inician la meiosis esta podría ser afectada de tal forma que las CGPs no entraran en meiosis.

El ratón transgénico se produjo en el laboratorio a través de un sistema conocido como CRE-loxP, dicho sistema se basa en la capacidad de la recombinasa CRE (del fago P1 de *E. coli*) para escindir el DNA flanqueado por secuencias conocidas como sitios loxP. En el laboratorio se cuenta con una línea de animales transgénicos que expresan la recombinasa CRE bajo la región regulatoria de la fosfatasa alcalina tejido no específica (FATN), la cual esta presente en la línea germinal. Además existen otras líneas de ratones transgénicos (Oct-4) donde bajo un promotor ubicuo se expresa lacZ, flanqueado por sitios loxP y después la secuencia de Oct-4. Entonces con dichas líneas, es posible generar ratones dobles transgénicos al cruzar un ratón de la línea FATN-CRE con otro de la línea de Oct-4. Como resultado de esta cruce en los tejidos donde se expresa CRE se escinde la secuencia de lacZ flanqueada por los sitios loxP y entonces puede expresarse Oct-4.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 18. Sistema Cre/LoxP para la sobreexpresión de Oct-4

En el laboratorio se ha demostrado que durante la ovogénesis los ratones dobles transgénicos TNAP CRE/Oct4 expresan Oct-4 en forma continua, encontrando el transcrito en etapas donde normalmente no se expresa Oct-4 en las CGPs.

Usando el ratón doble transgénico anteriormente descrito, decidimos hacer un ensayo preliminar para determinar si el número de células meióticas disminuía con la expresión continua de Oct-4. Para ello, se hicieron cortes seriados al criostato de gónadas de hembras de 15.5 dpc normales y transgénicas donde se identificaron las células meióticas por inmunofluorescencia contra la proteína Scp3. En la FIGURA 19 se muestran los resultados obtenidos en 12 cortes de dos gónadas normales y dos gonadas transgénicas pertenecientes a embriones diferentes. A simple vista se percibe que en las imágenes provenientes de los animales transgénicos, la señal fluorescente en general, es menos intensa, lo que podría estar indicando que menos células han iniciado la meiosis, esta apreciación es mas clara si se observa que en la mayoría de las imágenes correspondientes a la gónada transgénica la señal fluorescente se encuentra en la periferia y en el centro es muy débil, mientras que en las gónadas normales mas de la mitad de las imágenes tienen fluorescencia en toda la gónada. Sin embargo estos resultados son preliminares. Para tener una conclusión definitiva, es indispensable hacer este análisis en forma cuantitativa y estadística. En nuestro caso, este análisis no era posible a partir de este ensayo porque la fluorescencia no nos permitió una resolución suficiente para hacer el conteo de células. Por otra parte seria deseable detectar la expresión de Scp-3 y al mismo tiempo la de Oct-4 para determinar cuantas células que expresan Oct-4 se encuentran en meiosis. En relación a esto último, algunas posibles estrategias, se proponen en la discusión.

## VIII. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado, el objetivo de este proyecto fue determinar la participación del gene Oct-4, durante el desarrollo de la línea germinal y principalmente en la entrada a meiosis. Para ello en el presente trabajo, se validaron varias estrategias experimentales con la intención de acercarnos a la función de Oct-4 en la línea germinal tanto *in vitro* como *in vivo*.

En principio pensamos que un buen sistema para estudiar las CGPs y el inicio de la meiosis, era el cultivo de crestas genitales enteras. En este sistema, se habían desarrollado con anterioridad varios trabajos donde por ejemplo: se describió la morfología gonadal (McLaren y Buehr, 1990), el papel del mesonéfros en la morfogénesis gonadal (Merchant-Larios et al., 1993), el origen de las células de Sertoli (Karl y Capel, 1998) y también se hicieron estudios sobre la meiosis en las CGPs (McLaren y Buehr, 1990). Además, bajo nuestras condiciones probamos al medir la actividad de fosfatasa alcalina y la presencia de Oct-4, que en estos cultivos las CGPs se desarrollaban normalmente, conservando sus marcadores moleculares. En el caso de Oct-4, la expresión en el cultivo coincidió con la reportada anteriormente *in vivo* por Pesce en 1998. Estos resultados nos sugirieron que los cultivos de gónadas completas eran un buen sistema para probar la inhibición de Oct-4 con ODNs antisentido. Cabe mencionar que existían reportes anteriores donde en otros sistemas de cultivo de órganos los ODNs antisentido habían funcionado exitosamente.

Cuando probamos los ODNs antisentido en los cultivos de gónadas no observamos por hibridación *in situ* que hubiera una reducción en el transcrito de Oct-4 aun tratando de facilitar la entrada de los ODNs con la lipofectamina. Desde un principio sabíamos que la túnica albugínea podría ser una barrera muy impermeable que evitara que los ODNs entraran a la gónada, por lo que se había considerado utilizar cultivos de agregados gonadales donde las CGPs quedarán expuestas directamente al ODNs antisentido. Además, diseñamos nuevas secuencias que tomaran en cuenta más parámetros que solo el ATG. De esta forma los cultivos de agregados gonadales representaban una opción interesante, pues este tipo de metodología, al igual que el cultivo de crestas genitales habían sido realizados con anterioridad por varios investigadores. En este sistema se sabía que en los agregados de macho tanto los componentes somáticos como las CGPs reconstituían las estructuras gonadales (Escalante-Alcalde y Merchant-Larios, 1992) y se habían realizado varios estudios en estos disgregados para analizar la entrada a meiosis; por ejemplo los ensayos de Dolci en 1990, donde se hicieron agregados quiméricos combinando ovarios y testículos apoyaron la idea de la



existencia de un factor inhibidor de la meiosis. Posteriormente McLaren en 1997 hizo agregados de CGPs con células de pulmón y propuso que el FIM tenía influencia sobre las CGPs de macho entre los 11.5 y 12.5dpc. En un trabajo reciente se usaron los agregados para determinar el tiempo en que las CGPs son destinadas a iniciar la meiosis irreversiblemente. Con el fin de evaluar la utilidad de este sistema específicamente para nuestros objetivos, probamos varios tiempos de cultivo así como etapas para su inicio ya que en algunos casos se observan diferencias entre las células de macho y de hembra. En los cultivos de agregados de 12.5 dpc cultivados durante 72 horas las células germinales de hembra se desarrollan normalmente e inician la meiosis pero las CGPs de macho no sobreviven. Debemos aclarar que nuestro interés en ese momento era probar si alguno de los ODNs antisentido tenía efecto, si así hubiera sido nosotros podríamos analizar agregados en etapas más tempranas cuando las CGPs aun no están comprometidas al inicio de la meiosis.

En los agregados seleccionamos los ODNs cuya presencia permitía la reestructuración de las estructuras gonadales. El resto de los ODNs fueron eliminados del estudio ya que el efecto tóxico generalizado que presentaron nos dificultaba el análisis por la ausencia de las CGPs. En este caso, no sabemos porque causas estos ODNs presentaron un efecto tóxico, pero creemos que dicho efecto es independiente de la secuencia, ya que se manifestó un daño general, en todos los tipos celulares incluyendo las CGPs y además, no hubo reorganización de la estructura gonadal, como la formación de cordones. Por otra parte, este efecto puede deberse a la presencia de residuos después de la purificación de los ODNs que bajo nuestro método de purificación no fue posible eliminar.

Los ODNs que no fueron eliminados del estudio se probaron en agregados de 13.5 dpc, donde probamos que tanto Oct-4 como la FA estaban presentes, indicando que las CGPs se conservan. En ninguno de los casos observamos la supresión total de la transcripción por los ODNs antisentido sobre el transcrito de Oct-4. Cabe mencionar que la interpretación de los resultados se dificultó inesperadamente debido a que observamos gran variabilidad en la distribución y cantidad de CGPs presentes en cada agregado, dicha variación se presentó en agregados hechos bajo las mismas condiciones en el mismo experimento y no fue posible superarlas aun después de varios intentos.

La distribución diferencial de las CGPs ha sido analizada con detalle a través de cortes histológicos en diferentes etapas del desarrollo (Escalante-Alcalde y Merchant-Larios, 1992) y se ha encontrado que cuando el cultivo inicia en etapas del desarrollo avanzadas, las CGPs en testículos no entran a los cordones, conformando pequeños grupos de células fuera de ellos. Estos resultados, se atribuyen a

un cambio en la adhesividad de las células de Sertoli por las CGPs. (Escalante-Alcalde y Merchant-Larios, 1992) Esto también podría estar influyendo en las variaciones encontradas en los agregados que hicimos de la misma edad por lo cual en ocasiones observamos gran cantidad de células en la periferia del agregado o bien conjuntos de CGPs en el centro, sin una aparente distribución en cordones. Por lo anterior, en nuestro caso concluimos que es preferible utilizar otro sistema con menos variaciones.

El porqué no funcionaron los antisentido en estos cultivos podemos atribuirlo a diferentes causas. La primera es que posiblemente los ODNs fosforotiatos son degradados dentro del medio de cultivo. Como se mencionó, se pensó que estos ODNs fosforotiatos serían mas estables ya que ha sido demostrada su mayor resistencia a nucleasas. Sin embargo, existen reportes donde los ODNs fosforotioatos son degradados dependiendo del medio en que se encuentran entre 7 y 24 horas, (Campbell 1990) razón por la cual se recomienda el uso de dosis múltiples. En nuestro caso tuvimos una limitación en cuanto a la cantidad de ODNs que podíamos obtener después de la purificación. Cabe mencionar que esta purificación era necesaria ya que en los casos donde no se hizo, se observaron efectos en la forma del agregado donde, en algunos casos ni siquiera fue posible fijarlos. La limitación en la cantidad disponible de ODNs nos impidió llevar a cabo múltiples dosis por lo cual los ODNs se colocaron una vez durante 48 horas.

Otra causa, podría ser que las secuencias utilizadas no fueron efectivas. Aunque se ha demostrado que el sistema de diseño utilizado para los ODNs tienen altas probabilidades de ser eficiente, también es cierto que en muchos casos se requiere probar numerosas secuencias para obtener una que sea capaz de inhibir considerablemente la expresión genética. En este caso nosotros consideramos que el diseño de las secuencias se llevó a cabo racionalmente pero desafortunadamente ninguna de las secuencias que utilizamos baja considerablemente la expresión de Oct-4. En el caso de la secuencia AB determinamos que aunque causa una reducción apreciable de la expresión, ésta no es suficiente para nuestros fines. Actualmente han surgido nuevos métodos para la selección de ODNs como el mapeo con RNasa H (Smith, et al. 2000), los cuales en combinación con métodos de selección por sistemas computacionales pueden hacer más eficiente la selección de ODNs. Con lo anterior no queremos decir que nuestro sistema no sea funcional ya que solo probamos 4 secuencias de 14 totales y nos faltaría analizar el resto. Otras formas de resolver este problema se detallan más adelante.

Se debe señalar que consideramos que no era recomendable continuar con los agregados ya que como se mencionó la distribución de las CGPs complican el análisis de resultados por lo cual no son un buen sistema para los objetivos que persigue este trabajo.

Como se menciona en la introducción, se han desarrollado nuevos análogos de DNA con la idea de hacer más eficiente el uso de los ODNs, entre estos se encuentran los PNAs (donde el enlace fosfodiéster es substituido por un enlace peptídico) (Nielsen, 1997) y los morfolinos. (Summerton y Weller, 1997). En particular, durante el curso del presente proyecto, los morfolinos han surgido como un buen método para inhibir la transcripción, de tal forma que actualmente han sido probados con éxito en cultivos de gónadas embrionarias (Visser et al., 2001). Además con el uso de morfolinos se ha logrado inhibir la expresión de *spiel-ohne-grezen* (*spg*) el ortólogo de Oct-4 en el pez cebra (Burgess et al., 2002; Reim y Brand, 2002). Aunque las secuencias de estos morfolinos no se encuentran en el RNAm de Oct-4 de ratón, los reportes abren la posibilidad de encontrar secuencias de morfolinos que pudieran ser funcionales en cultivos de gónadas de ratón para la supresión de Oct-4. Esta alternativa podría explorarse en trabajos futuros dentro del laboratorio. Por otra parte se puede desarrollar la mutación nula de Oct-4 específicamente en la línea germinal a través del sistema Cre/LoxP que describimos anteriormente para la sobreexpresión de Oct-4.

En un intento por hacer una contribución en el sentido de nuestra pregunta original, utilizamos ratones Oct-4 que como ya se mencionó, mantienen la expresión de Oct-4 durante etapas donde normalmente no está presente. En forma preliminar en los ensayos que realizamos percibimos una disminución de la intensidad de la señal de *scp-3* que es indicativa del inicio de la meiosis, lo anterior debe confirmarse ya que en el sistema Cre-LoxP no todos los gametos mantienen la expresión de Oct-4 y por lo tanto no esperaríamos un efecto del 100%. Por lo anterior es necesaria la cuantificación de las células meioticas. En el ensayo que realizamos, nuestra idea era cuantificar todas las CGPs presentes tanto en el ratón silvestre como en el transgénico pero no fue posible distinguir células individuales ya que las CGPs se encuentran en conjuntos. Sin embargo este análisis se puede llevar a cabo en ensayos posteriores utilizando citometría de flujo (FACS) en gónadas disgregadas. Además sería muy interesante determinar si existen o no células en meiosis que expresen Oct-4, cosa que hasta el momento nadie ha demostrado. Una alternativa que planeamos para lograr esto es hacer una doble inmunohistoquímica contra la proteína Scp-3 y contra una cola de myc que está unida a Oct-4 en algunas líneas de los ratones Cre/Oct-4.

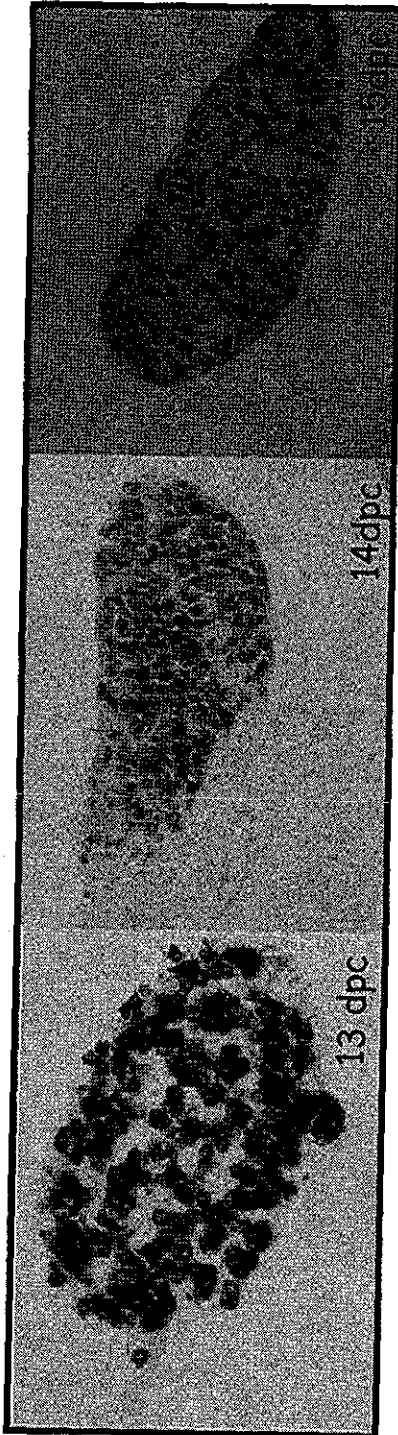
El realizar estos ensayos será importante para determinar los mecanismos que dirigen la entrada a meiosis en las CGPs. Sabemos que señales de gp130 están relacionada con la inhibición de la meiosis y se ha sugerido que pudieran estarlo con el hipotético factor inhibidor de la meiosis (FIM) (Chuma y Nakatsuji, 2001). Creemos que Oct-4 no tiene relación con el FIM. Los estudios que se han hecho de la determinación sexual de las CGPs demuestran que las CGPs se comprometen al inicio de la meiosis antes de la pérdida de la expresión de Oct-4. Sin embargo con base en los comentarios de Austin Smith quien sugiere la participación de Oct-4 como un "switch" entre la vía de STAT3 y la vía de ERK, es posible que la presencia de Oct-4 estimule la vía de las STAT-3 previniendo con ello el inicio de la meiosis lo cual coincidiría con la prevención de la meiosis por la vía de gp130.

## IX. CONCLUSIONES

- Los cultivos de gónadas embrionarias presentan actividad de FA y expresan Oct-4 semejando lo que ocurre *in vivo*.
- Bajo nuestras condiciones, el cultivo de agregados resultó ser muy variable por lo cual este sistema de agregación no es recomendable para este estudio.
- Las secuencias de ODNs antisentido usadas no disminuyen el RNAm de Oct-4. Sin embargo, reportes recientes abren la posibilidad de inhibir la expresión de Oct-4 a través del uso de ODNs morfolidos.
- El ensayo preliminar realizado con el ratón *Cre/Oct-4* parece haber una disminución en el número de células en meiosis. Esto se evaluará en forma detallada en estudios futuros.

**IX. FIGURAS**

Gónadas de hembra sin cultivar



Gónadas de hembra cultivadas

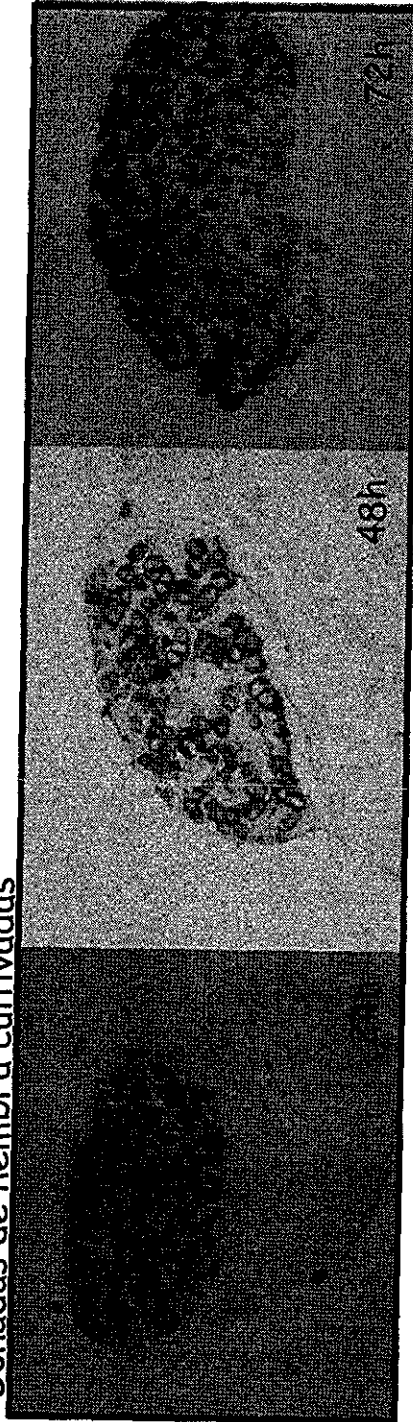


Figura 6. Actividad de fosfatasa alcalina en cultivos de gónadas embrionarias de hembra. Cortes en parafina donde se muestra que la actividad de FA en los cultivos de gónadas se mantiene hasta las de 72 horas de cultivo y dicha actividad es comparable con la actividad de FA presente en las gónadas no cultivadas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

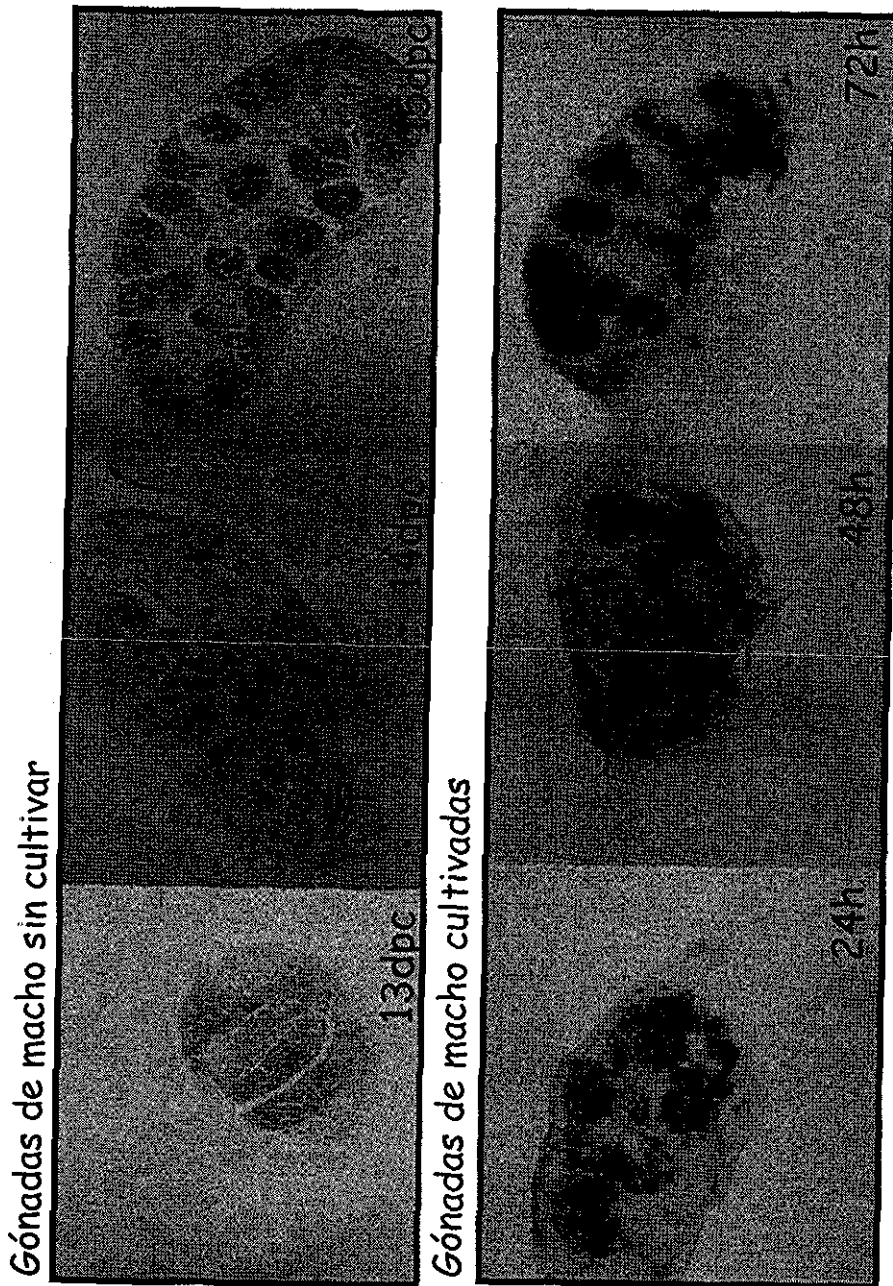
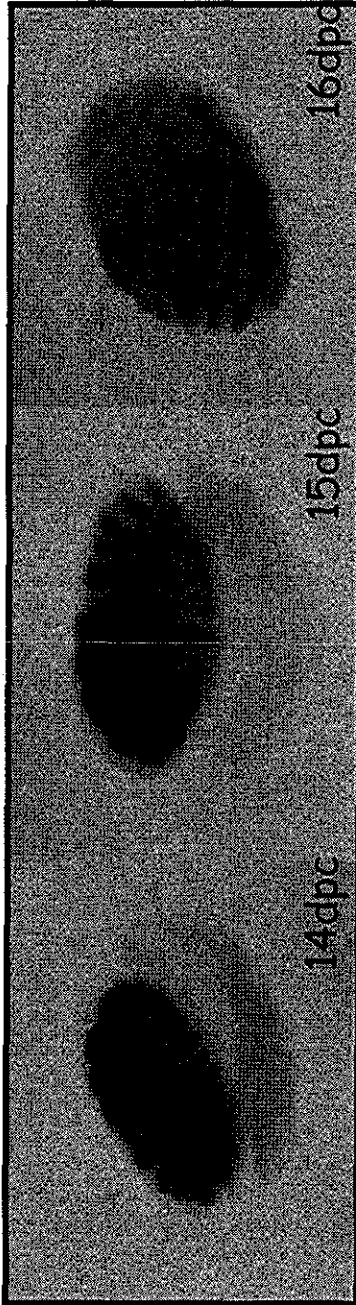


Figura 7. Actividad de fosfatasa alcalina en cultivos de gónadas embrionarias de macho. Cortes en parafina donde se muestra que la actividad de FA en los cultivos de gónadas se mantiene hasta las de 72 horas de cultivo y dicha actividad es comparable con la actividad de FA presente en las gónadas no cultivadas.

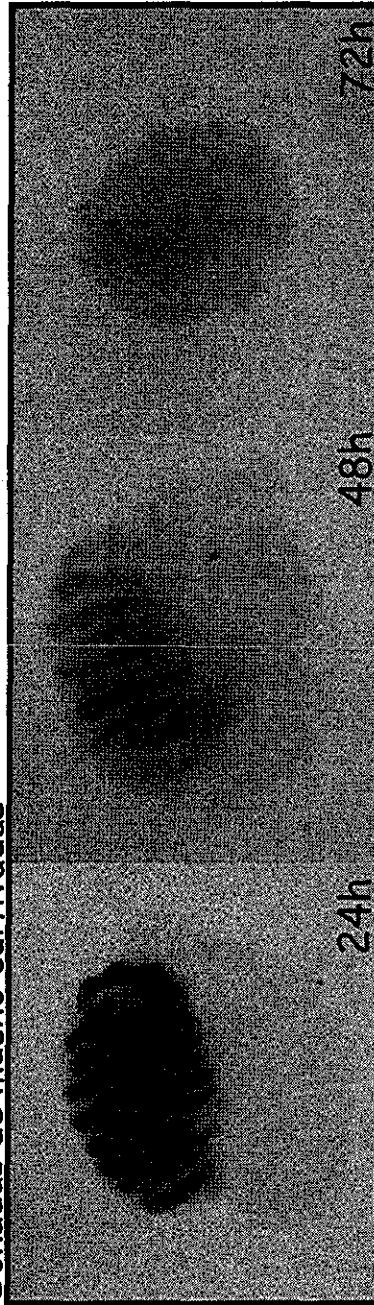
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Gónadas de macho sin cultivar



Gónadas de macho cultivadas



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 8. Expresión de Oct-4 en cultivos de gónadas embrionarias. La figura muestra la hibridación *in situ* contra Oct-4 en gónadas embrionarias de macho cultivadas y sin cultivar, demostrando que el comportamiento de la expresión de Oct-4 es similar tanto *in vitro* como *in vivo*.

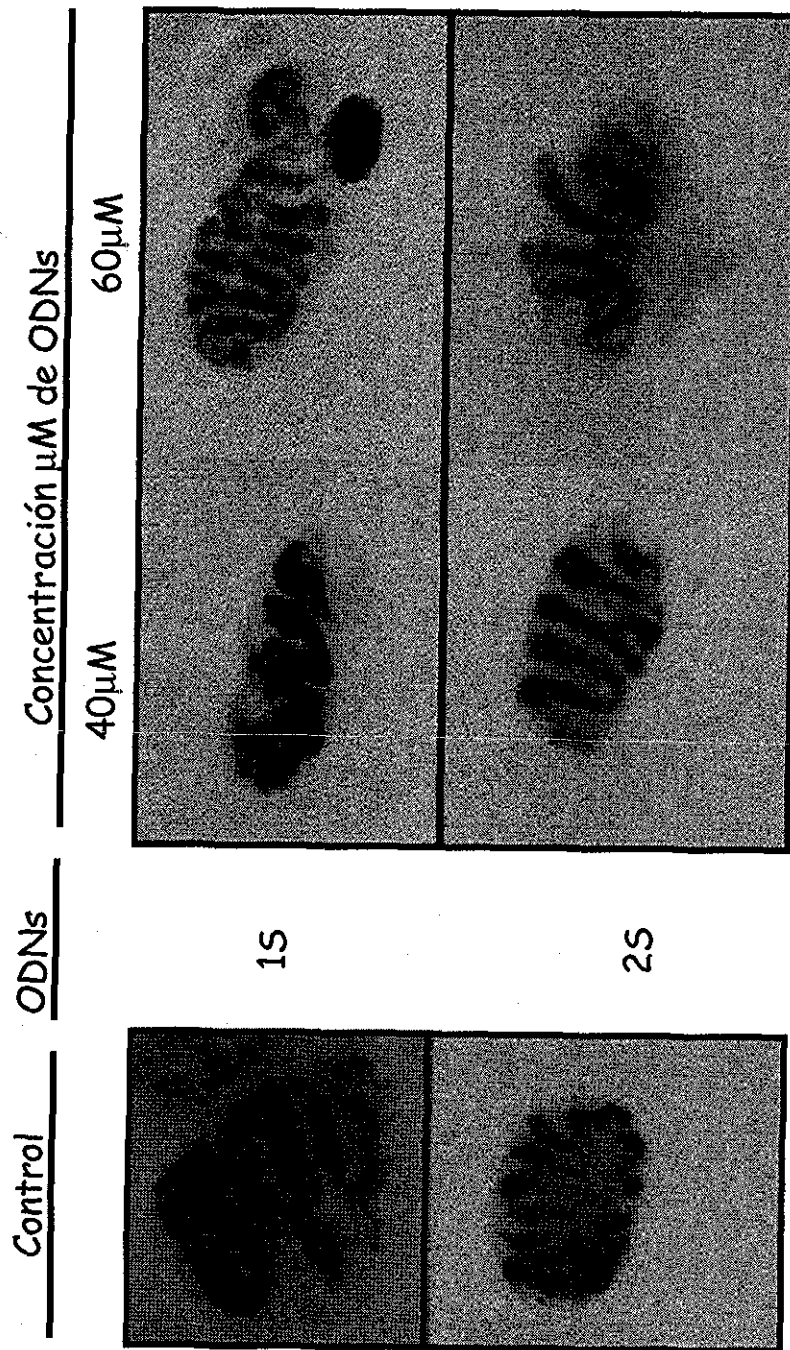


Figura 9. Expresión de Oct-4 en cultivos de gónadas embrionarias tratadas con ODNs. Se diseñaron ODNs fosforotioatos contra el ATG de Oct-4 (1S, 2S) dichos ODNs se usaron en los cultivos de gónadas de 12.5 dpc que se cultivaron por 48 horas a diferentes concentraciones. Posteriormente se realizó la hibridación *in situ* encontrando que bajo estas condiciones no disminuye la expresión de Oct-4.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

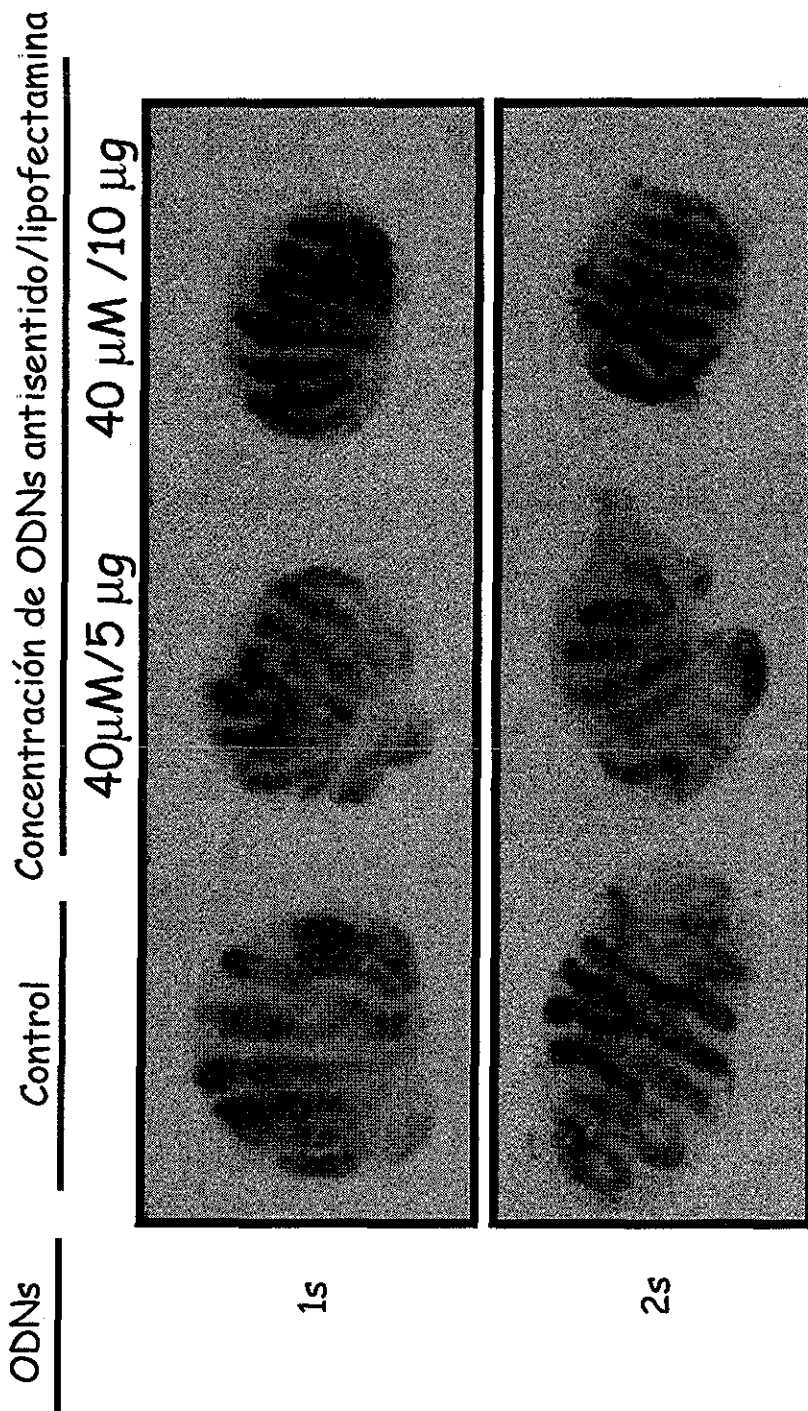


Figura 10. Expresión de Oct-4 en gónadas cultivadas con ODNs antisentido y lipofectamina. Los ODNs antisentido (1S Y 2S) fueron mezclados con lipofectamina y colocados sobre gónadas de 12.5 dpc las cuales se cultivaron durante 48 horas. La hibridación *in situ* contra Oct-4 muestra que no se inhibe la expresión de Oct-4 con ninguno de los ODNs usados 1S y 2S.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

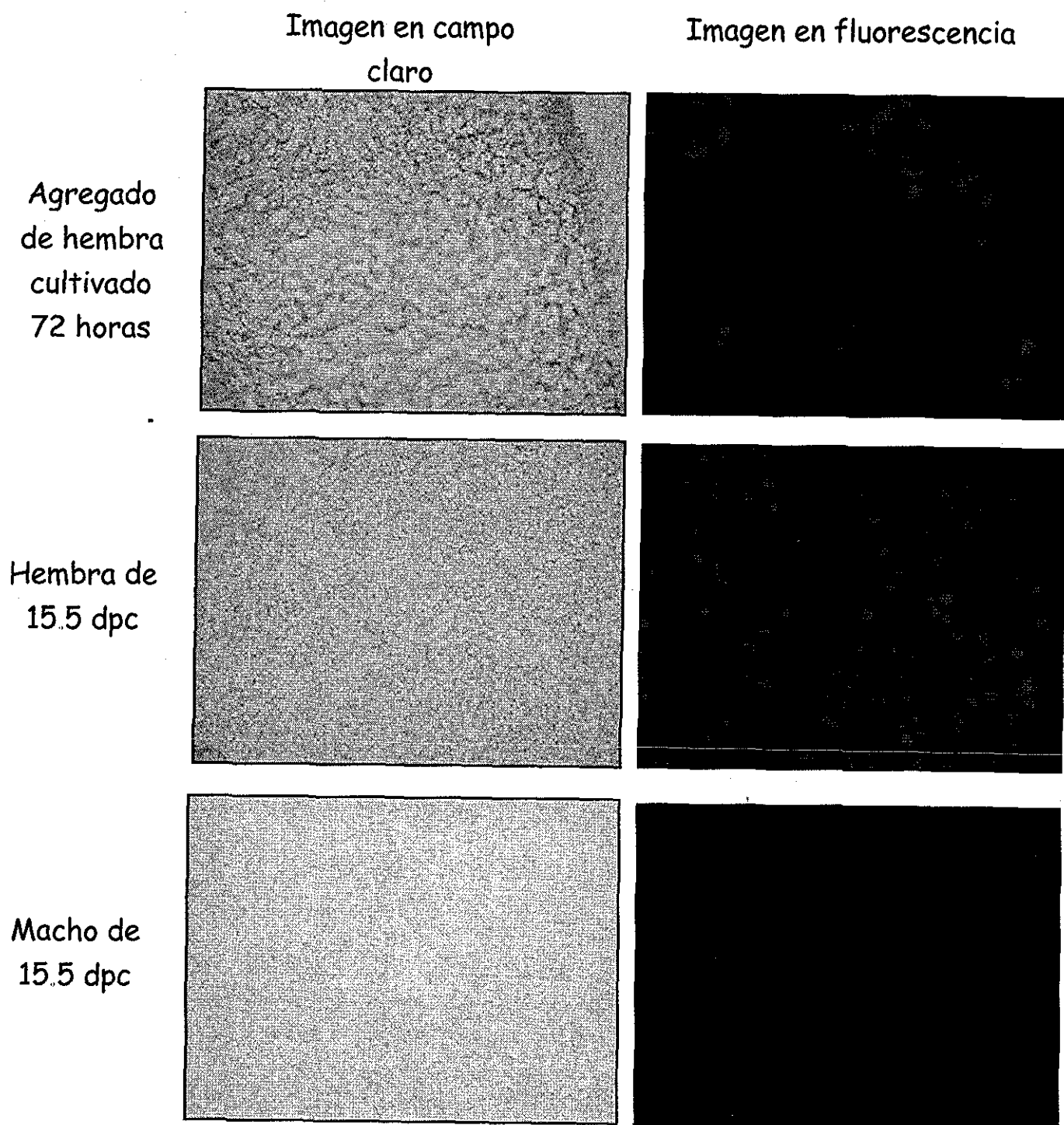
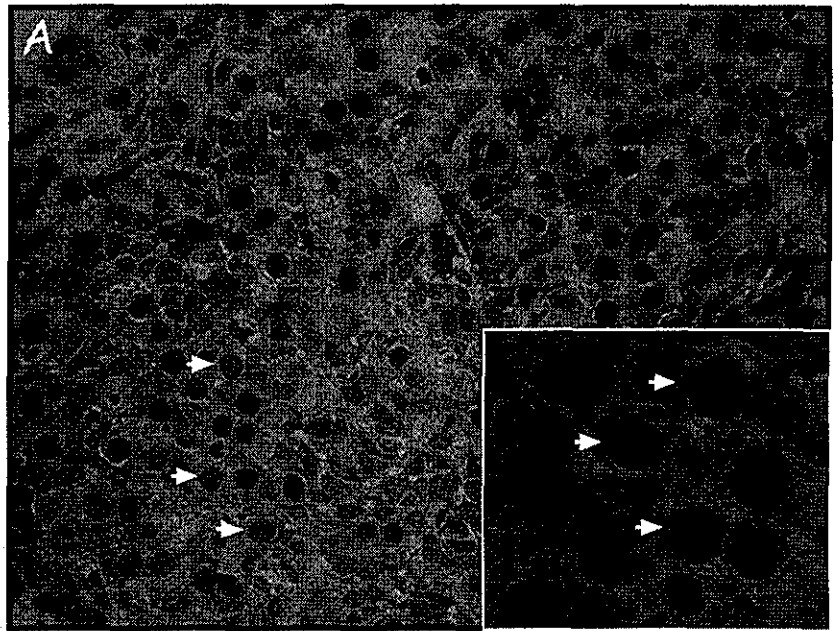


Figura 11. Presencia de células meióticas en agregados. Inmunofluorescencia contra la proteína Scp 3 de los complejos sinaptinémicos. Se muestra la presencia de células meióticas en agregados hechos a partir de hembras de 12.5dpc que fueron cultivados durante 72 horas y se comparan con gónadas sin cultivar de hembra de 15.5 dpc, como control negativo se usaron gónadas de macho de la misma etapa

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Agregado de hembra  
de 12.5 dpc cultivado  
72 horas



Agregado de macho  
de 12.5 dpc cultivado  
72 horas

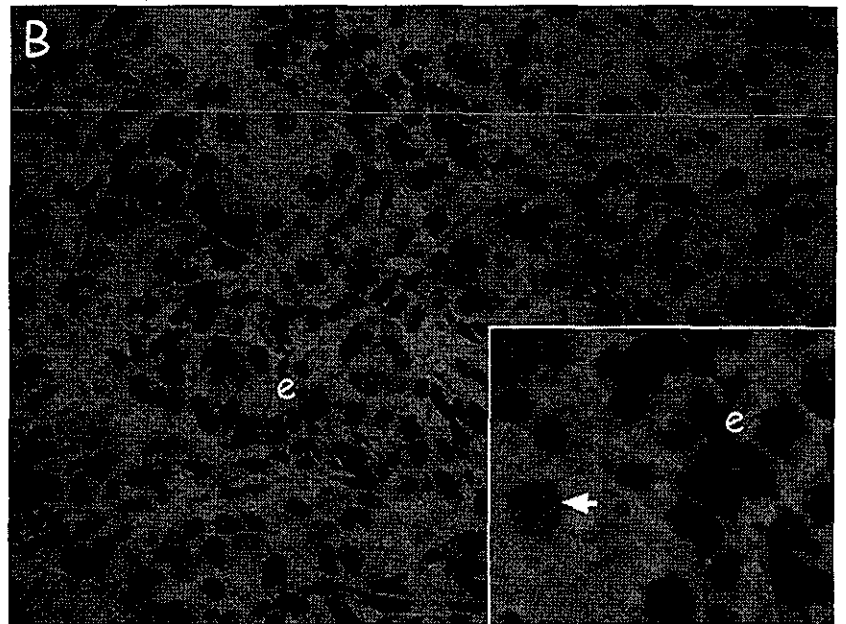


Figura 12. Agregados de gónadas de 12.5 dpc cultivados durante 72 horas. Cortes semifinos que muestran la morfología de agregados cultivados durante 72 horas. En los agregados de hembra después de 72 horas de cultivo se observan abundantes CGPs (→), las cuales se distinguen por su forma redonda y su gran núcleo. Sin embargo en los agregados de macho solo muy pocas CGPs sobreviven 72 horas de cultivo por lo cual este tipo de células no se observan. Estroma (e)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



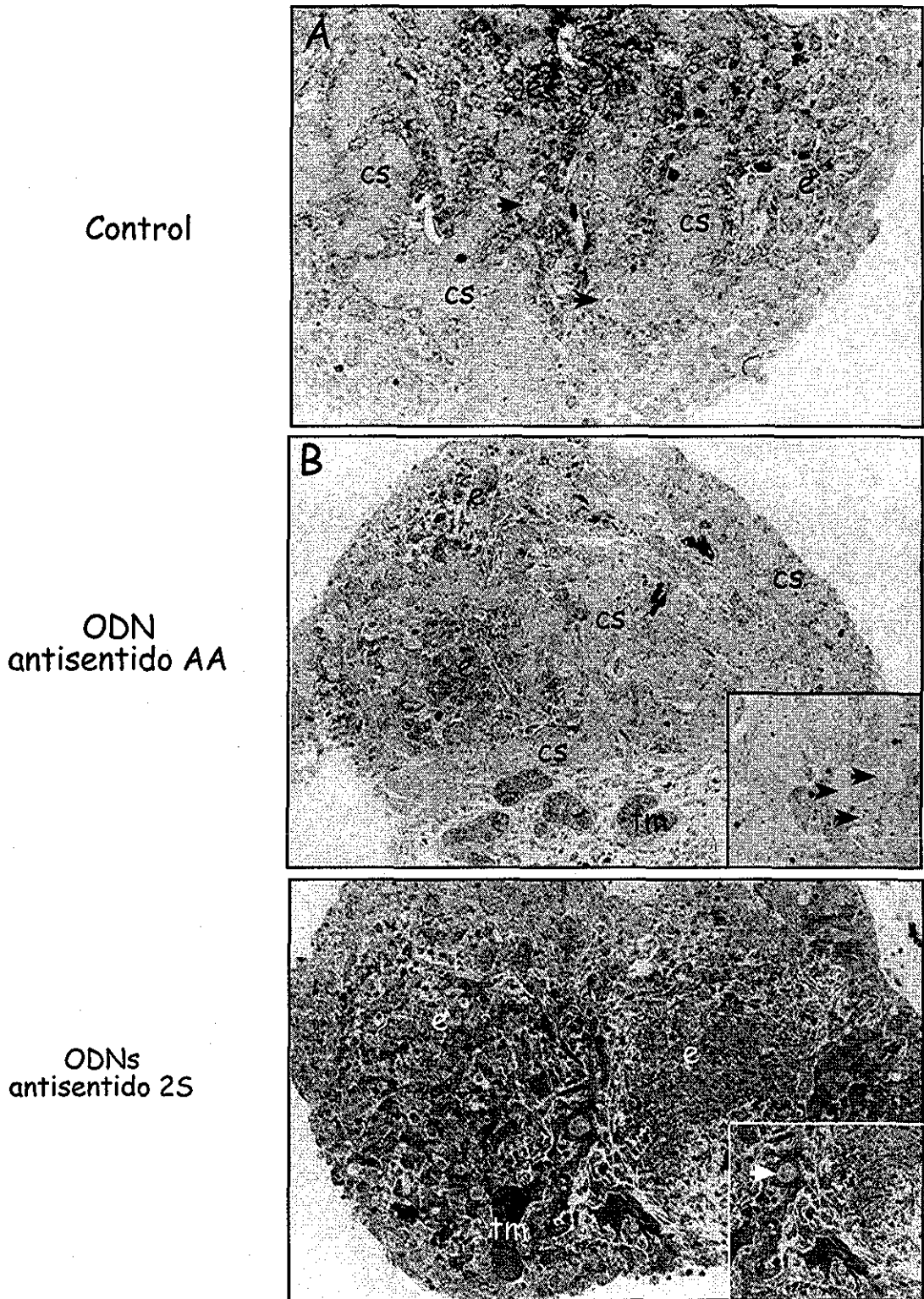
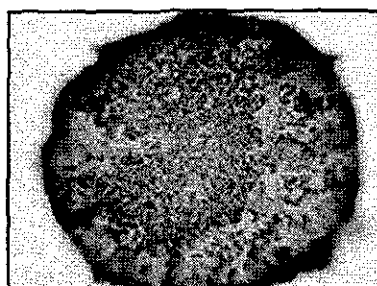


Figura 13. Efecto de los ODNs antisentido en la morfología de los agregados. Cortes finos donde se muestra la morfología de agregados hechos a partir de gónadas de 12.5 dpc cultivadas por 48 horas con los ODNs antisentido. El control muestra una buena morfología con la formación de cordones seminíferos (CS) y la presencia de abundantes CGPs (▶), lo mismo se observó para algunos ODNs antisentido como el AA, mientras que otros presentaron un efecto tóxico generalizado en la morfología de la gónada (2S), no observando la formación de cordones seminíferos y la presencia de CGPs. Estroma (e), tubulos mesonéfricos (tm)

Agregados de macho  
cultivados durante  
48 horas

Actividad de FA



Expresión de Oct-4

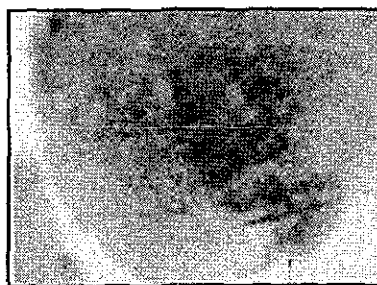


Figura 14. Expresión de marcadores de la línea germinal en agregados de 13.5 dpc cultivados durante 48 horas. En la figura se muestra la actividad de la fosfatasa alcalina y la hibridación in situ contra Oct-4 en agregados hechos con gónadas de 13.5 dpc cultivados durante 48 horas, comprobando la presencia de células germinales en dichos agregados.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

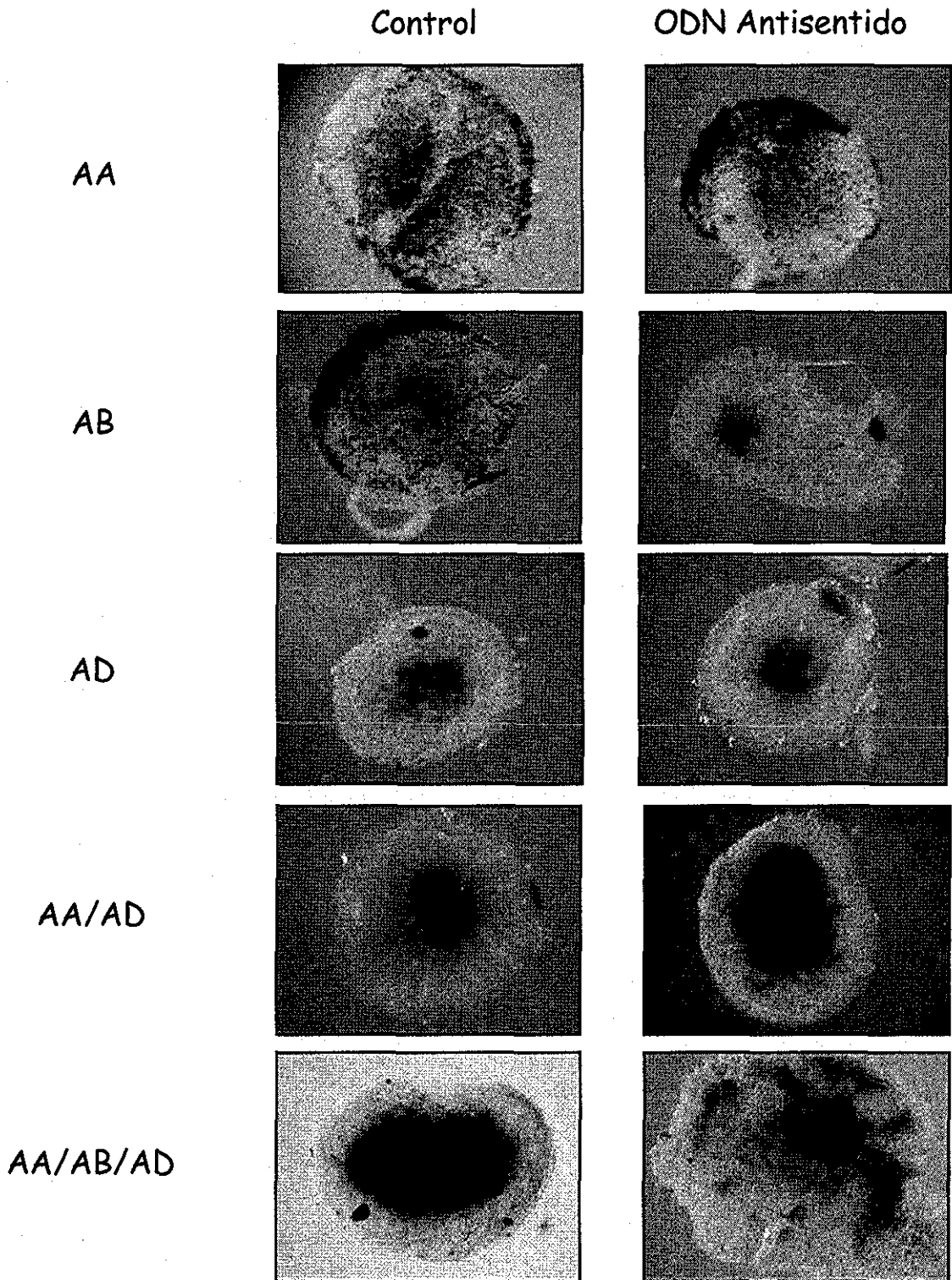


Figura 15. Expresión de Oct-4 en agregados cultivados con ODNs antisentido. Hibridación in situ contra Oct-4 en agregados hechos a partir de gónadas de macho de 13.5 dpc cultivadas durante 48 horas con diferentes ODNs antisentido. Ninguno de los ODNs antisentido reduce totalmente la presencia del transcrito. En el caso de los agregados cultivados con el ODNs antisentido AB parece haber una reducción parcial en la expresión de Oct-4.



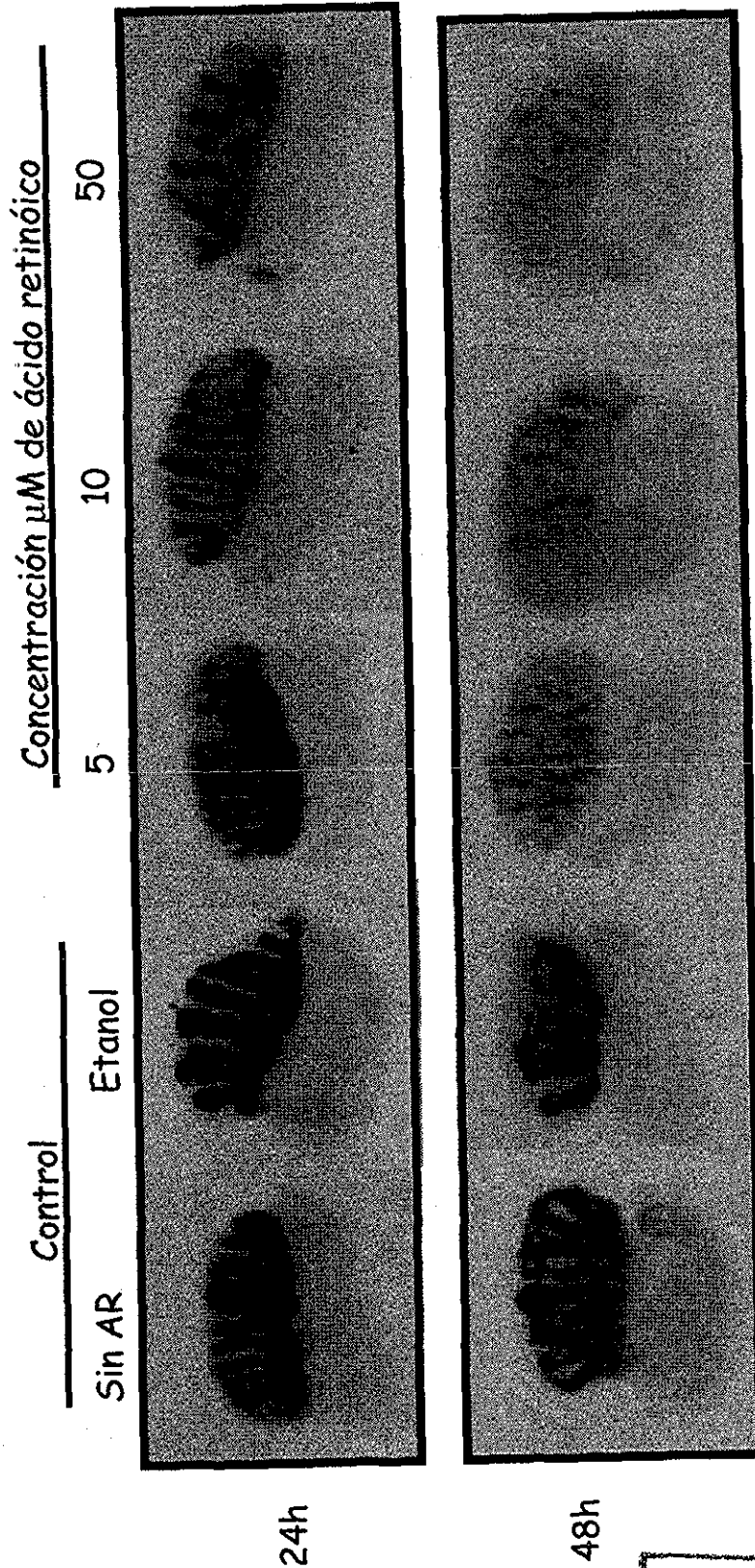


Figura 16. Expresión de Oct-4 en cultivos de gónadas tratadas con ácido retinóico. Hibridación *in situ* donde se muestra la expresión de Oct-4 en gónadas que fueron cultivadas con AR y donde se observa que la expresión de Oct-4 disminuye considerablemente al cultivar las gónadas durante 48h en concentraciones mayores de  $5\mu\text{M}$  de AR.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

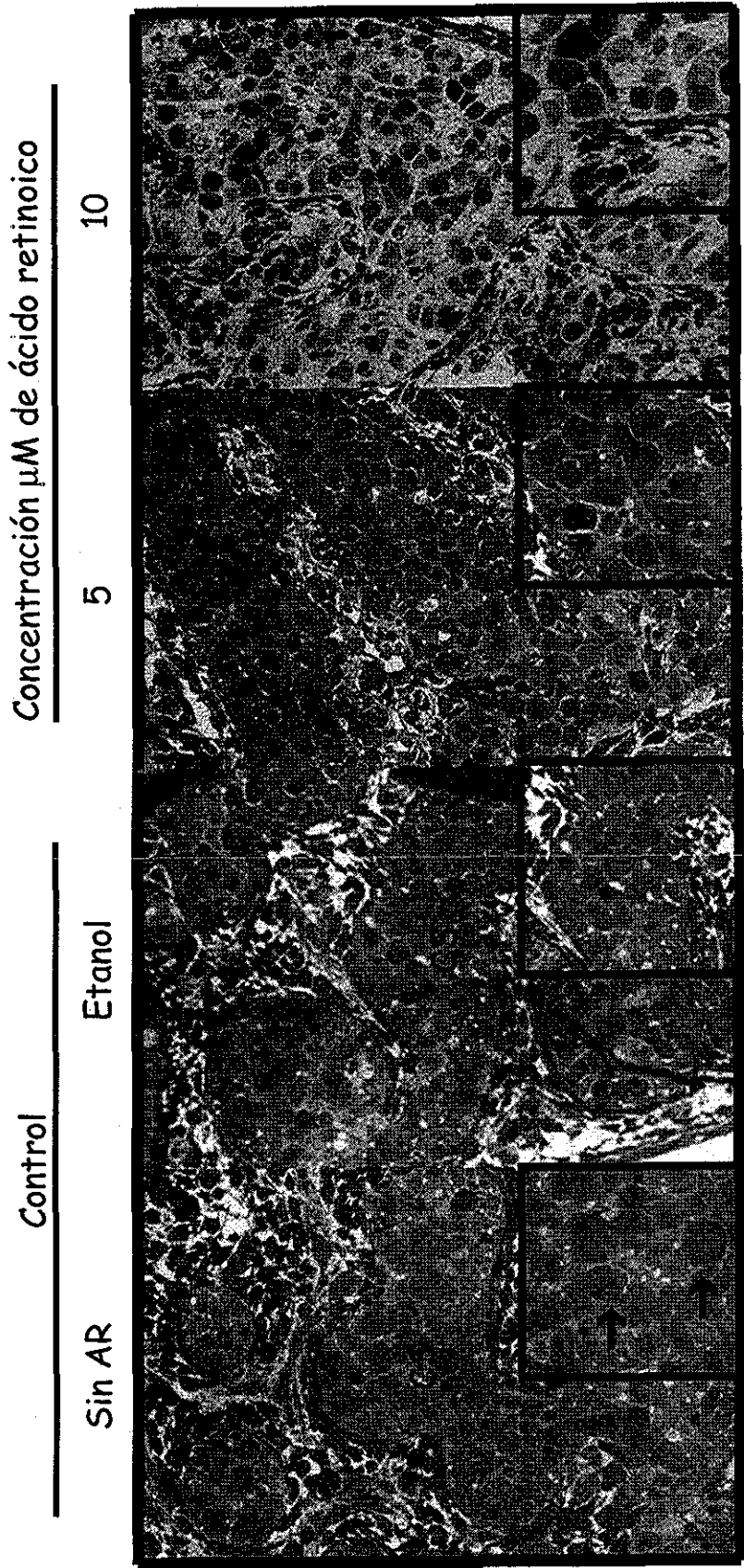


Figura 17. Cortes seminíferos de gónadas embrionarias cultivadas con AR. En los controles se observan las CGPs (→) dentro de los cordones seminíferos (cs). Las gónadas cultivadas por 48 horas con 5 $\mu$ M de AR presentan una morfología alterada con células posiblemente apoptóticas (⊃), en los cultivos con 10 $\mu$ M el efecto es mayor. Por lo cual las concentraciones que logran inhibir la expresión de Oct-4 también tienen efectos tóxicos en los cultivos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cre(-)/Oct-4(+)

Cre(+)/Oct-4(+)

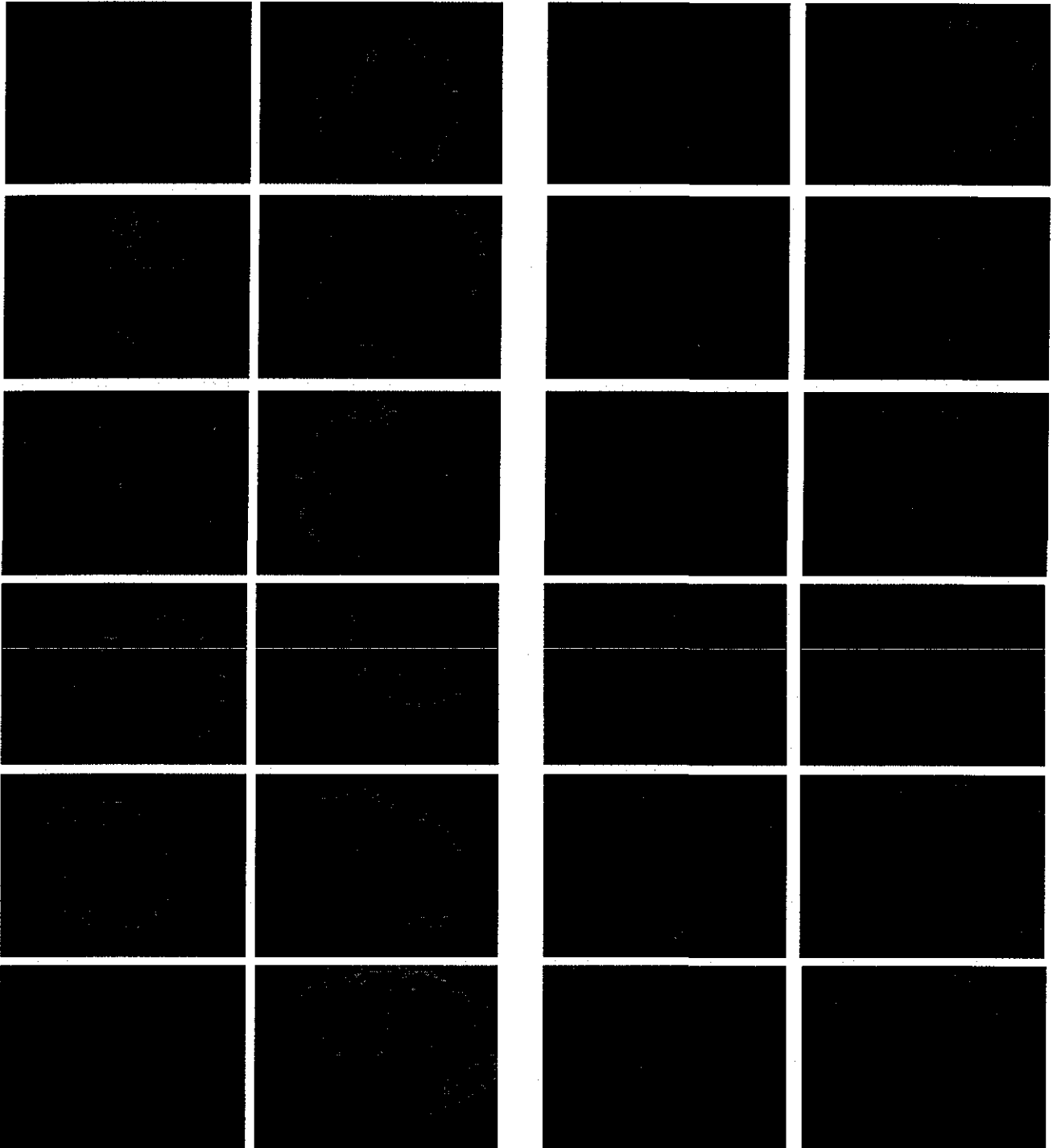


Figura 19. Presencia de células meioticas en gónadas de hembra de ratones CRE (+)/OCT-4(+).  
Inmunohistoquímica contra la proteína Scp-3 en cortes al criostato de gonadas de hembras dobles transgénicas de  
5 dpc y hembras normales en la misma etapa. En las hembras transgénicas se observa la señal mas intensa en la periferia,  
entras en el centro es menor comparada con las hembras normales. Lo anterior sugiere que las CGPs que continuan  
presando Oct-4 pudieran tener menos células meioticas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## X. BIBLIOGRAFIA

- Adams, I. R., & McLaren, A. (2002). Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129, 1155-64.
- Agrawal, S. (1999). Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1489, 53-68.
- Alvarez-Buylla, A., & Merchant-Larios, H. (1986). Mouse primordial germ cells use fibronectin as a substrate for migration. *Exp Cell Res* 165, 362-8.
- Anderson, R., Fassler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R. O., Bader, B. L., Kreidberg, J. A., Schaible, K., Heasman, J., & Wylie, C. (1999). Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126, 1655-64.
- Augustine, K. (1997). Antisense approaches for investigating mechanisms of abnormal development. *Mutat Res* 396, 175-93.
- Belvé, A. R. (1998). Introduction: The male germ cell; origin, migration, proliferation and differentiation. *Cell and Dev Biol* 9, 379-391.
- Ben-Shushan, E., Thompson, J. R., Gudas, L. J., & Bergman, Y. (1998). Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol* 18, 1866-78.
- Bendel-Stenzel, M., Anderson, R., Heasman, J., & Wylie, C. (1998). The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. *Semin Cell Dev Biol* 9, 393-400.
- Bendel-Stenzel, M. R., Gomperts, M., Anderson, R., Heasman, J., & Wylie, C. (2000). The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech Dev* 91, 143-52.
- Burgess, S., Reim, G., Chen, W., Hopkins, N., & Brand, M. (2002). The zebrafish *spiel-ohne-grenzen* (*spg*) gene encodes the POU domain protein Pou2 related to mammalian Oct4 and is essential for formation of the midbrain and hindbrain, and for pre-gastrula morphogenesis. *Development* 129, 905-16.
- Byskov, A., G. (1986). Differentiation of Mammalian Embryonic Gonad. *Physiological reviews* 66, 71-114.
- Capel (2000). The battle of the sexes. *Mechanism of Development* 92, 89-103.

- Chang, H., & Matzuk, M. M. (2001). Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 104, 61-7.
- Chuma, S., & Nakatsuji, N. (2001). Autonomous transition into meiosis of mouse fetal germ cells in vitro and its inhibition by gp130-mediated signaling. *Dev Biol* 229, 468-79.
- Cohen, P. E., & Pollard, J. W. (2001). Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *Bioessays* 23, 996-1009.
- De Felici, M., & Dolci, S. (1989). In vitro adhesion of mouse fetal germ cells to extracellular matrix components. *Cell Differ Dev* 26, 87-96.
- De Felici, M., & Pesce, M. (1994). Growth factors in mouse primordial germ cell migration and proliferation. *Prog Growth Factor Res* 5, 135-43.
- De Felici, M., & Pesce, M. (1994). Interactions between migratory primordial germ cells and cellular substrates in the mouse. *Ciba Found Symp* 182, 140-50.
- Dolci, S., Pesce, M., & De Felici, M. (1993). Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 35, 134-9.
- Escalante-Alcalde, D., and Merchant-Larios, H. (1992). Somatic and germ cell interactions during histogenetic aggregation of mouse fetal testes. *Exp Cell Res* 198, 150-8.
- Fuhrmann, G., Sylvester, I., & Scholer, H. R. (1999). Repression of Oct-4 during embryonic cell differentiation correlates with the appearance of TRIF, a transiently induced DNA-binding factor. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45, 717-24.
- Fuhrmann, G., Chung, A. C., Jackson, K. J., Hummelke, G., Banihmad, A., Sutter, J., Sylvester, I., Scholer, H. R., & Cooney, A. J. (2001). Mouse germline restriction of Oct4 expression by germ cell nuclear factor. *Dev Cell* 1, 377-87.
- Garcia-Castro, M. I., Anderson, R., Heasman, J., & Wylie, C. (1997). Interactions between germ cells and extracellular matrix glycoproteins during migration and gonad assembly in the mouse embryo. *J Cell Biol* 138, 471-80.
- Ginsburg, M., Snow, M. H., & McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-8.
- Gomperts, M., Garcia-Castro, M., Wylie, C., & Heasman, J. (1994). Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120, 135-41.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., & Lacy, E. (1994). *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual, second Edition* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 203, 323-33.
- Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in Electron Microscopy. *J Cell Biol* 27, 137A.
- Keshet, E., Lyman, S. D., Williams, D. E., Anderson, D. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Parada, L. F. (1991). Embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *Embo J* 10, 2425-35.
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., & Hogan, B. L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424-36.
- Liu, L., Leaman, D., Villalta, M., & Roberts, R. M. (1997). Silencing of the gene for the alpha-subunit of human chorionic gonadotropin by the embryonic transcription factor Oct-3/4. *Mol Endocrinol* 11, 1651-8.
- Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T., & Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *Embo J* 18, 4261-9.
- McLaren, A. (1984). Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 38, 7-23.
- McLaren, A., & Buehr, M. (1990). Development of mouse germ cells in cultures of fetal gonads. *Cell Differ Dev* 31, 185-95.
- McLaren, A. (1995). Germ cells and germ cell sex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350, 229-33.
- McLaren, A., & Southee, D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol* 187, 107-13.
- McLaren, A. (2000). Establishment of the germ cell lineage in mammals. *J Cell Physiol* 182, 141-3.
- Merchant-Larios, H., & Taketo, T. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microsc Tech* 19, 158-71.
- Merchant-Larios, H., Moreno-Mendoza, N., & Buehr, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37, 407-15.
- Minucci, S., Botquin, V., Yeom, Y. I., Dey, A., Sylvester, I., Zand, D. J., Ohbo, K., Ozato, K., & Scholer, H. R. (1996). Retinoic acid-mediated down-regulation of Oct3/4 coincides with the loss of promoter occupancy in vivo. *Embo J* 15, 888-99. [abs.html](#)

Moreno, N. A. (1999). Interacción entre las células somáticas y germinales al inicio de la diferenciación sexual de la gónada del ratón. En *Centro de Neurobiología* (D.F. Mexico: UNAM), pp. 67.

Nachtigal, M. W., Hirokawa, Y., Enyeart-VanHouten, D. L., Flanagan, J. N., Hammer, G. D., & Ingraham, H. A. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93, 445-54.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., & Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-91.

Nielsen, P. E. (1997). Peptide nucleic acid (PNA) from DNA recognition to antisense and DNA structure. *Biophys Chem* 68, 103-8.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 12, 2048-60.

Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-6.

Ochiya, T., Sakamoto, H., Tsukamoto, M., Sugimura, T., & Terada, M. (1995). Hst-1 (FGF-4) antisense oligonucleotides block murine limb development. *J Cell Biol* 130, 997-1003.

Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., & Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461-72.

Okazawa, H., Okamoto, K., Ishino, F., Ishino-Kaneko, T., Takeda, S., Toyoda, Y., Muramatsu, M., & Hamada, H. (1991). The oct3 gene, a gene for an embryonic transcription factor, is controlled by a retinoic acid repressible enhancer. *Embo J* 10, 2997-3005.

Okuda A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo A., Yamagisho T., Nabeshima, Y., Kuro-o M., Nabeshima, Y., Boon K., Keaveney M., Stunnenberg, H. & Muramatsu M. (1998). UTF-1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *Embo J* 1, 2009-2032.

Palmieri, S. L., Peter, W., Hess, H., & Scholer, H. R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol* 166, 259-67.

Patzel, V., Steidl, U., Kronenwett, R., Haas, R., & Sczakiel, G. (1999). A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res* 27, 4328-34.

Pesce, M., Di Carlo, A., & De Felici, M. (1997). The c-kit receptor is involved in the adhesion of mouse primordial germ cells to somatic cells in culture. *Mech Dev* 68, 37-44.

Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D. J., & Scholer, H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71, 89-98. [bin/cas/tree/store/mod/cas\\_sub/browse/browse.cgi?year=1998&volume=71&issue=1-2&aid=856](http://bin/cas/tree/store/mod/cas_sub/browse/browse.cgi?year=1998&volume=71&issue=1-2&aid=856).

Raz, R., Lee, C. K., Cannizzaro, L. A., d'Eustachio, P., & Levy, D. E. (1999). Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2846-51.

Reim, G., & Brand, M. (2002). *Spiel-ohne-grenzen/pou2* mediates regional competence to respond to Fgf8 during zebrafish early neural development. *Development* 129, 917-33.

Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K., Timmons, P. M., Poirier, F., Rigby, P. W., & Staudt, L. M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686-92.

Ryan, A. K., & Rosenfeld, M. G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev* 11, 1207-25.

Saitou, M., Barton, S. C., & Surani, M. A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418, 293-300.

Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H., & Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t- complex. *Embo J* 9, 2185-95.

Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., & Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344, 435-9.

Schoorlemmer, J., van Puijenbroek, A., van Den Eijnden, M., Jonk, L., Pals, C., & Kruijer, W. (1994). Characterization of a negative retinoic acid response element in the murine Oct4 promoter. *Mol Cell Biol* 14, 1122-36.

Seth, R., Shum, L., Wu, F., Wuenschell, C., Hall, F. L., Slavkin, H. C., & Warburton, D. (1993). Role of epidermal growth factor expression in early mouse embryo lung branching morphogenesis in culture: antisense oligodeoxynucleotide inhibitory strategy. *Dev Biol* 158, 555-9.

Shimazaki, T., Okazawa, H., Fujii, H., Ikeda, M., Tamai, K., McKay, R. D., Muramatsu, M., & Hamada, H. (1993). Hybrid cell extinction and re-expression of Oct-3 function correlates with differentiation potential. *Embo J* 12, 4489-98.

Shum, L., Sakakura, Y., Bringas, P., Jr., Luo, W., Snead, M. L., Mayo, M., Crohin, C., Millar, S., Werb, Z., Buckley, S., & et al. (1993). EGF abrogation-induced fusilli-form dysmorphogenesis of Meckel's cartilage during embryonic mouse mandibular morphogenesis in vitro. *Development* 118, 903-17.



- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-90.
- Smith, L., Andersen, K. B., Hovgaard, L., & Jaroszewski, J. W. (2000). Rational selection of antisense oligonucleotide sequences. *Eur J Pharm Sci* 11, 191-8.
- Summerton, J., & Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7, 187-95.
- Sylvester, I., & Scholer, H. R. (1994). Regulation of the Oct-4 gene by nuclear receptors. *Nucleic Acids Res* 22, 901-11.
- Tam, P. P., & Zhou, S. X. (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Dev Biol* 178, 124-32.
- Visser, J. A., Olaso, R., Verhoef-Post, M., Kramer, P., Themmen, A. P., & Ingraham, H. A. (2001). The serine/threonine transmembrane receptor ALK2 mediates Mullerian inhibiting substance signaling. *Mol Endocrinol* 15, 936-45.
- Volpe, M. V., Vosatka, R. J., & Nielsen, H. C. (2000). Hoxb-5 control of early airway formation during branching morphogenesis in the developing mouse lung. *Biochim Biophys Acta* 1475, 337-45.
- Werner, M. H., Huth, J. R., Gronenborn, A. M., & Clore, G. M. (1996). Molecular determinants of mammalian sex. *Trends Biochem Sci* 21, 302-8.
- Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., & Scholer, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development* 122, 881-94.
- Yeom, Y. I., Ha, H. S., Balling, R., Scholer, H. R., & Artzt, K. (1991). Structure, expression and chromosomal location of the Oct-4 gene. *Mech Dev* 35, 171-9.
- Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A., & Zhao, G. Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14, 1053-63.
- Ying, Y., & Zhao, G. Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 232, 484-92.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., & Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 9, 2635-45.

Yuan, L., Liu, J. G., Zhao, J., Brundell, E., Daneholt, B., & Hoog, C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell* 5, 73-83.

Zamboni, L., and Upadhyay, S. (1983). Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. *J Exp Zool* 228, 173-93.