

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

FACULTAD DE CIENCIAS

**PAPEL DE LOS GENES AUTOSOMICOS SF1, WT1 Y Gata4
DURANTE EL DESARROLLO GONADAL DEL RATÓN B6. Y^{tr}
CON REVERSIÓN SEXUAL.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

BIOL. ELIZABETH MORALES SÁNCHEZ

TUTORA: DRA. NORMA ANGÉLICA MORENO MENDOZA

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Dr. Jesús Chimal Monroy.

A los miembros del Jurado:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dra. Rosa María Viguera Villaseñor
Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Dra. Adriana C. Mendoza Rodríguez
Dr. Jesús Chimal Monroy.

Al Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT No. 201305) por la beca otorgada durante la realización del presente estudio.

El presente trabajo fue apoyado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Proyecto PAPIIT 201305 y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT No. P47073-Q).

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento especial a la Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza, por su excelente asesoramiento, críticas y comentarios, además, por las facilidades otorgadas para la realización del presente estudio. Y sobre todo por que más que una maestra ha sido una amiga.

Agradezco además al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por el apoyo recibido en su laboratorio, en la realización de algunas técnicas.

Mi agradecimiento muy especial a la Dra. Adriana C. Mendoza Rodríguez, por su excelente asesoramiento en las técnicas de biología Molecular. Gracias por los comentarios, críticas y conocimientos que sin duda han fortalecido mi trabajo académico, así como por su amistad.

Agradezco al Dr. Horacio Merchant Larios y a los miembros de su laboratorio Alejandro, Verónica, Marilu, Brenda, Ricardo y a la Sra. Guille, que me brindaron su amistad y apoyo.

Un agradecimiento especial al Sr. José Guadalupe Baltazar García, por su apoyo técnico, además de su valiosa amistad que siempre me ha brindado.

DEDICATORIAS

Quiero dar las gracias primeramente a Dios, y a mis amados padres por estar siempre conmigo en los momentos difíciles, así como por el gran amor, comprensión, cariño y buenos ejemplos que siempre he recibido de ellos. Gracias por hacer más feliz mi vida a su lado.

A mis hermanos tan queridos Ricardo, Reyna Angélica. y Joan Luis.
A mis cuñados: Alejandro y Angélica.
Con una dedicatoria muy especial a mis pequeños sobrinos: Paola Edith, Ángel Gabriel, Melissa Alejandra y Aline.

A mis tíos y primos por los la ayuda en los momentos difíciles, además de la grata compañía que siempre me han brindado.

A mis queridos compañeros del laboratorio: Roció, Carolina, Juanito, Gilberto y Sandra y al pequeño Alex, por su agradable compañía y apoyo.

Y finalmente quiero dedicarla a mis grandes amigos y confidentes: Fernando, David Alejandro y Cinthya , quienes siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas. Que siempre me estimularon a seguir adelante. Gracias por la oportunidad de tener su amistad.

Y con gran cariño especial a Xal con quien he compartido muchos momentos especiales, durante mi estancia en el lab. Te doy gracias por enseñarme tantas cosas de la vida, y sobre todo por brindarme tu amistad y confianza.

INDICE

I RESUMEN

1	INTRODUCCCIÓN	1
1.1	Biología del desarrollo sexual	2
1.1.2	La gónada indiferenciada	2
1.1.3	Diferenciación del testículo	2
1.1.4	Diferenciación del ovario	3
1.2	Mecanismos moleculares de la determinación sexual	3
1.2.1	Sox9 (Sry-related HMG box-9)	4
1.2.2	GATA4 [(T/A) GATA (A/G)]	5
1.2.3	SF1 (Steroidogenic Factor 1).	7
1.2.4	WT1 (Wilm's Tumor supresor 1)	8
1.3	Reversión sexual en mamíferos	9
1.4	El ratón B6.Y ^{tir} como modelo de reversión sexual en mamíferos	10
1.4.1	Fenotipo del ratón B6.Y ^{tir}	11
1.4.2	Papel del Sry en el desarrollo gonadal del ratón B6.Y ^{tir}	12
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3	HIPÓTESIS	15
4	OBJETIVO GENERAL	15
4.1	OBJETIVOS PARTICULARES	15
5	MATERIAL Y MÉTODOS	16
5.1	Animales	16
5.2	Identificación por PCR del gen Zfy	17
5.3	Micriscopia de luz	17
5.4	Inmunocitoquímica	18
5.5	Diseño de oligonucleótidos	19
5.6	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (RT-PCR)	20
5.6.1	Extracción del ARN total	20
5.6.2	RT-PCR (Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa)	21
5.6.3	Electroforesis	22
5.6.4	Densitometría	22
5.7	Extracción del los productos de WT1	24
5.8	Análisis estadístico	25
6	RESULTADOS	26
6.1	Detección del cromosoma Y ^{tir}	26
6.2	Análisis morfológico de las gónadas B6.Y ^{tir}	26
6.3	Localización inmunohistoquímica de la expresión de la proteína de los genes GATA4, WT1 y SF1	28
6.3.1	Expresión de las proteínas GATA4, WT1 y SF1 en testículos control (CD1 y B6), ovotestis y ovarios XY ^{tir} de 15 días <i>post coitum</i>	28
6.3.1	Expresión de las proteínas GATA4, WT1 y SF1 en testículos control (CD1 y B6), ovotestis y ovarios XY ^{tir} de 17 días <i>post coitum</i>	29
6.3.1	Expresión de las proteínas GATA4, WT1 y Ff1 en testículos control (CD1 y B6), ovotestis y ovarios XY ^{tir} de 1 días <i>post partum</i>	31
6.4	Cuantificación por RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes GATA4, SF1 y WT1 en testículos, ovotestis y ovarios XY ^{tir}	33
6.4.1	Expresión de GATA4, SF1 y WT1 a los 15 días <i>post coitum</i>	33
6.4.2	Expresión de GATA4, SF1 y WT1 a los 17 días <i>post coitum</i>	35
6.4.3	Expresión de GATA4, SF1 y WT1 a 1 días <i>post partum</i>	37

6.4.4	Correlación de los niveles de expresión de GATA4, SF1 y WT1 entre las tres edades y diferenciación gonadal	39
6.5	Secuenciación de WT1	39
7	DISCUSIÓN	43
8	CONCLUSIONES	50
9	BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

Cuando el cromosoma Y de la cepa de ratón *mus musculus domesticus* es transferido al genoma de la cepa C57BL/6J (B6), los individuos XY desarrollan ovarios u ovotestis pero nunca testículos normales durante la vida fetal. En esta cepa de ratón denominada B6.Y^{tir}, algunos de los individuos hermafroditas son fértiles, sin embargo, ninguna de las hembras XY^{tir} producen descendencia. En todos los individuos que acarrean el cromosoma Y^{tir}, los genes Sry y Sox9, relacionados con la determinación y diferenciación testicular, están expresándose, lo que sugiere que la presencia de estos genes no es suficiente para dirigir el establecimiento de un testículo, sino que existen otros factores involucrados que posiblemente no se están expresando o están alterados durante la diferenciación gonadal del ratón B6.Y^{tir}. Los genes autosómicos Sox9, SF1, WT1 y GATA4 han sido implicados en la regulación del promotor de la sustancia inhibidora de Müller (MIS), y por lo tanto, en la diferenciación de las células de Sertoli que en turno dirigen los eventos de la diferenciación morfológica del testículo. Con base en esto, en el presente trabajo proponemos que la reversión sexual en el ratón B6.Y^{tir} puede deberse a una alteración en el patrón de expresión de los genes SF1, WT1 y GATA4, que no permite la diferenciación de las células de Sertoli para dirigir la diferenciación morfológica del testículo. Empleando las técnicas de inmunohistoquímica estudiamos el patrón de expresión de la proteína de estos genes y analizamos por RT-PCR los niveles de transcritos en ovarios y ovotestis XY^{tir} de 15 y 17 días post coitum y 1 día postnatal, utilizando como controles ovarios y testículos de las cepas CD1 y B6. Encontramos que la expresión de la proteína de los tres genes es similar en los testículos de las cepas controles, detectándose específicamente en el núcleo de las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares. En el caso de los ovotestis, la expresión también se detecta en el núcleo de las células de Sertoli en cordones testiculares localizados en la región medular. En la región cortical, la distribución es similar a la detectada en los ovarios, es decir, se localiza en núcleos de células distribuidas de manera aleatoria. Por otro lado, tanto en los ovarios XY^{tir}, como en los controles, la expresión también se observa en los núcleos de células que temprano en el desarrollo (15 dpc) se encuentran distribuidas en todo el ovario. Conforme avanza el desarrollo del ovario (17 dpc y 1dpp), estas células se localizan dentro de los cordones ováricos. El análisis por RT-PCR mostró que a los 15 y 17 dpc no existen diferencias significativas entre las tres cepas, en los niveles de expresión de los transcritos de los genes GATA4 y SF1, solo se detectaron diferencias en los niveles de expresión para el

gen WT1. En 1dpp, diferencias estadísticamente significativas se encontraron para el gen GATA4, mientras que para SF1 y WT1 los niveles son similares. Concluimos que en el ratón B6.Y^{tir} la expresión prolongada del gen Sry y la presencia y/o regulación negativa de Sox9 no altera el patrón de expresión de los genes autosómicos GATA4, WT1 y SF1 durante la diferenciación gonadal del ratón B6.Y^{tir}. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el camino de diferenciación testicular esta regulado exclusivamente por la expresión del gen Sox9 que dirige el papel que los genes autosómicos están desempeñando en un contexto de diferenciación testicular. En ausencia de Sox9, el papel que estarán jugando GATA4, SF1 y WT1 será en el mantenimiento del desarrollo ovárico.

ABSTRACT

When the Y chromosome from *Mus musculus domesticus* mouse strain (Y^{tir}) from Tirano, Italy is transferred onto the C57BL/6J genome, XY^{tir} individuals develop ovaries, or ovotestis but never normal testes during the foetal life. While some of the hermaphroditic males became fertile, none of the XY^{tir} females produce litters. In all the individuals that carry the Y^{tir} chromosome, the Sry and Sox9 genes, related with determination and sex differentiation, are expressing, which suggests that the presence of these genes is not enough to direct the establishment of a testis if not that other factors can exist that possibly are not expressing or that they are altered during the gonadal differentiation of the B6.Y^{tir} mouse. The autosomic genes Sox9, SF1, WT1 and GATA4 have been implied in the regulation of the promoter of the Mullerian Inhibiting Substance (MIS) and therefore in the Sertoli cell differentiation that in turn direct the events of the morphological differentiation of the testis. The proposes of the present study was that the sex reversal in the B6.Y^{tir} mouse can be due to an alteration in the pattern of expression of the genes SF1, WT1 and GATA4, which does not allow the differentiation of the Sertoli cells to direct the morphological differentiation of the testis. We studied the expression pattern of the protein by immunocytochemical and the profile levels of transcripts by semiquantitative reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) in XY^{tir} ovaries and ovotestis of 15 and 17 days post coitum (dpc) and 1 day postpartum (dpp), using as control ovaries and testes from CD1 and C57(B6) strains. We find that the protein expression of the three genes was similar in testes of the control strains, the protein was detected in the nucleus of the Sertoli cells inside the testicular cords. In the case of the ovotestis, the expression is also observed in the nucleus of the Sertoli cells into the testicular cords located in the middle region. In the cortical region, the distribution of the protein is similar to the detected in the ovaries, where the signal is observed randomly distributed. On the other hand, in XY^{tir} ovaries the expression is observed like to the control ovaries, localized in the nuclei of the epithelial cells that early in the development (15dpc) appear distributed in the whole ovary. As the development advances (17 dpc and 1 dpp), the positive cells are located into the ovarian cords. RT-PCR analysis showed that the SF1, WT1 and GATA4 transcripts were

present at all stages and in all B6.Y^{flir} gonads. A semiquantitative densitometric study revealed that the levels of GATA4 and SF1 were not different at 15 and 17 dpc, only differences were detected in the transcripts of WT1. In 1 dpp statistically significant differences were observed for GATA4, whereas no significant differences were found in the levels of transcripts of SF1 and WT1. We conclude that in B6.Y^{flir} mouse, the Sry expression and the positive or negative Sox9 regulation do not alter the expression pattern of the GATA4, WT1 and SF1 genes during the gonadal differentiation of the B6.Y^{flir} mouse. Therefore, our results suggest that the way of the testicular differentiation can be regulated exclusively by the expression of the Sox9, that in turn directs the role that the autosomic genes are playing in a context of testicular differentiation. In absence of Sox9, the role that GATA4, SF1 and WT1 will be in maintaining the ovarian development.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio del desarrollo sexual de los mamíferos ha llevado al reconocimiento de tres procesos secuenciales: el establecimiento del sexo cromosómico en el momento de la fertilización, el desarrollo de la gónada indiferenciada hacia un testículo o un ovario, y la diferenciación de los genitales internos y externos como resultado de una función endocrina asociada al tipo de gónada presente. El desarrollo del fenotipo sexual es el resultado de una interacción entre señales genéticas, celulares y hormonales las cuales participan en una cascada de eventos necesarios para generar el fenotipo macho o hembra. Las diferencias fenotípicas entre machos y hembras son fácilmente distinguibles y muchas veces son consideradas como absolutas. Sin embargo, pueden ocurrir alteraciones en diferentes niveles durante el desarrollo sexual lo que puede llevar a una discrepancia entre el sexo genético y el sexo fenotípico. Estas alteraciones pueden ocasionar síndromes de reversión sexual donde en algunas situaciones los individuos pueden ser machos cromosómicos (XY) con desarrollo de fenotipo completamente femenino o hembras genotípicas (XX) que desarrollan completamente estructuras masculinas. También se puede observar el desarrollo tanto de características masculinas como femeninas en un mismo individuo, o ambigüedad de genitales internos y externos.

Las mayores contribuciones para tratar de entender los procesos de determinación y diferenciación sexual, han surgido de estudios en humanos que presentan anomalías del sexo. Muchas alteraciones no letales ocurren durante el desarrollo sexual y la variedad de fenotipos sugiere la existencia de mutaciones en muchos de los loci importantes en la determinación sexual. Frecuentemente, estas alteraciones son diagnosticadas por la observación del desarrollo anormal de los genitales externos en el momento del nacimiento, por la apariencia de irregularidades somáticas las cuales están acompañadas de algunas aberraciones en los cromosomas sexuales, o como resultado de anomalías detectadas durante y después de la pubertad (incluyendo infertilidad). Avances en técnicas citogenéticas y de biología molecular han complementado estudios clínicos y las investigaciones de correlaciones cariotipo-fenotipo continúan siendo cruciales en la identificación de genes involucrados en la determinación sexual, con lo que es posible ampliar el conocimiento de las patologías de la reversión sexual.

1.1 Biología del desarrollo sexual

1.1.2 La gónada indiferenciada

Los procesos que llevan a la diferenciación sexual se inician muy temprano en el desarrollo con el establecimiento de primordios comunes en los dos sexos: las gónadas, los conductos de Müller y de Wolff y el seno urogenital. Desde los estudios clásicos de Alfred Jost (1947) en fetos de conejo, se acepta que la gónada de los machos es la primera en diferenciarse tanto morfológica como fisiológicamente y dirige la diferenciación sexual somática de los conductos (genitales internos) y del seno urogenital (genitales externos). En fetos castrados, los genitales adquieren el fenotipo femenino independientemente de su sexo genético. Se asumió entonces que las gónadas femeninas no son necesarias para el inicio de la diferenciación sexual, y que ésta depende de la diferenciación del testículo. Sin embargo, los testículos y los ovarios surgen de la cresta genital, en la cual se encuentra una gónada bipotencial indiferenciada compuesta de tres tipos celulares: células corticales y medulares derivadas de la región del mesonefros, y células germinales primordiales (CGP) de origen extraembrionario (Wylie y Heasman, 1993).

1.1.3 Diferenciación del testículo.

La primera manifestación de la diferenciación sexual se detecta en la gónada de los machos. En el caso del ratón, los primeros indicios se observan alrededor de los 12.5 *días post coitum (dpc)*, cuando los cordones sexuales se separan del epitelio celómico como consecuencia de los arreglos producidos por una invasión de mesénquima y vasos sanguíneos que provoca la compactación de los cordones, ahora denominados cordones testiculares. El traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada se lleva a cabo por movimientos morfogenéticos, lo que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un activo depósito de las moléculas que forman la lámina basal (laminina y colágeno principalmente).

Las células del epitelio interno, es decir, las células de Sertoli, tienen dos funciones principales: el empaquetamiento de las CGP y la síntesis de la hormona anti-Mulleriana (Josso et al 1977), responsable de la regresión de los conductos Mullerianos. Las células

de Sertoli forman un epitelio de tipo columnar y presentan prolongaciones citoplasmáticas que rodean a las CGP. Estas células sólo proliferan durante la etapa fetal y por un corto tiempo en el período postnatal. Las células del estroma que rodean a los cordones testiculares se diferencian para formar varios tipos celulares: células mioides, fibroblastos, endotelios y células de Leydig, estas últimas son importantes por su actividad endócrina.

1.1.4 Diferenciación del ovario.

En etapas tempranas de la diferenciación gonadal del ratón, el ovario no muestra cambios con respecto a la estructura de la gónada indiferenciada, sólo se puede observar un cierto crecimiento debido a la proliferación de las células somáticas y germinales a los 12.5 *dpc*. En el ratón se presenta lo que se denomina meiosis inmediata, es decir, que se inicia un poco después de la diferenciación sexual de la gónada. Entre los 13 y 14 *dpc* se observan ovocitos en las primeras etapas de la profase I de la división meiótica. Entre los 15 y 16 *dpc*, la mayoría de los ovocitos se encuentran en etapas de cigoteno y paquiteno, estas últimas representadas por la presencia de complejos sinaptinémicos. Es durante estas dos etapas que ocurre un proceso de degeneración de algunos ovocitos. Las interacciones entre los ovocitos y las células de la pre-granulosa son cruciales para la formación de folículos primordiales, los cuales son reclutados dentro de una fase de crecimiento que culmina en la maduración meiótica y la ovulación de un ovocito maduro dentro del oviducto en preparación para la fertilización.

1.2 Mecanismos moleculares de la determinación sexual

Conociéndose que la presencia del cromosoma Y es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada indiferenciada, independientemente del número de cromosomas X presentes en el genoma, hace evidente que en el cromosoma Y se encuentra el gen o los genes responsables de la diferenciación testicular. Se planteó así la búsqueda del factor determinante del testículo (FDT).

En la década de los 90's se logró un gran avance en el conocimiento de los procesos de determinación y diferenciación sexual en mamíferos. Se encontró que un sólo gen ligado al cromosoma Y, es necesario para comprometer a la gónada bipotencial a desarrollarse en un testículo. A este gen se le denominó *SRY* en humanos (Berta et al., 1990) y *Sry* en

ratón (Koopman et al 1990). Se propone que este gen inicia una cascada de interacciones genéticas que transforman la gónada indiferenciada en un testículo. Como se sabe que el *Sry* codifica para una proteína que se asocia al ADN, se asume que su acción es intracelular y no se difunde. Por lo tanto, es probable que controle la expresión de otros genes en la misma célula, modulando así su actividad fisiológica. Dicha modulación pudiera ser la producción de un factor o factores responsables de los diversos cambios morfogénéticos necesarios para la diferenciación testicular. Se ha postulado que el evento más importante desencadenado por el *Sry* es la diferenciación de las células de Sertoli que a su vez, expresan genes responsables de la diferenciación de otros linajes celulares en la gónada masculina. En ausencia del *Sry*, como en individuos XX o por alguna mutación que afecta la función del *Sry*, el desarrollo gonadal es dirigido hacia ovario.

A partir de la identificación del *SRY/Sry* se han caracterizado cerca de 25 genes autosómicos involucrados en la determinación y diferenciación sexual de los mamíferos. Entre los más relevantes tenemos a los genes *Sox9*, *SF1*, *WT1* y *GATA4* indispensables para el inicio y culminación de la diferenciación de las células de Sertoli en el testículo. Además, hasta el momento se ha establecido que existe un patrón dimórfico de expresión durante la diferenciación de testículos y ovarios. A continuación se describe brevemente algunos de los aspectos más generales de estos genes.

1.2.1 *Sox9* (*Sry-related HMG box-9*)

El *Sox9* es un gen autosómico involucrado en la condrogénesis y la diferenciación de células somáticas. Durante el desarrollo gonadal, se expresa en las células somáticas de la gónada, siendo necesario y suficiente para la diferenciación del testículo en el ratón. Los patrones de expresión de *Sox9* específicos del macho en las gónadas de diversas especies de vertebrados es consistente con la idea de que *Sox9* es un gen regulador conservado evolutivamente e involucrado en la determinación y diferenciación testicular (Kobayashi et al 2005). En el caso de mamíferos, particularmente en el ratón, se ha sugerido que *Sox9* se expresa después del *Sry* coincidiendo con el establecimiento y agregación de las células precursoras de Sertoli en las gónadas XY (Moreno et al 2003). El papel de *Sox9* en la determinación del sexo en los vertebrados fue elucidada por Kent et al. (1996). Analizando su patrón de expresión, establecieron que este gen se expresa en las crestas genitales de ambos sexos a los 10.5 *dpc*. Sin embargo, a los 11.5 *dpc* la

expresión de Sox9 difiere entre los dos sexos manteniéndose sólo en la gónada de los machos. Aunado a esto, el grupo de Morais da Silva (1996) encontró señales detectables para Sox9 a los 10.5 dpc por hibridación in situ en whole-mount en gónadas de ambos sexos, pero a los 11.5 dpc la expresión de Sox9 solo fue detectada en las gónadas XY. En estudios realizados por Moreno et al. (2003), observaron que la proteína del Sox9 solo se detecta en las gónadas de los machos. Su distribución está confinada a los cordones sexuales, específicamente en el núcleo de las células de Sertoli de los testículos y se mantiene hasta la vida adulta.

El papel que juega Sox9 durante los procesos de determinación y diferenciación sexual se ha establecido estudiando casos de deleciones de este gen en humanos. Durante el desarrollo gonadal normal, la proteína de SOX9 se expresa en las células somáticas de la gónada antes de la formación de los cordones seminíferos (De Santa Bárbara et al 2000). Sin embargo, si SOX9 no es funcional causa reversión sexual de macho a hembra con desarrollo anormal del esqueleto en muchos casos (Wagner et al 1994), mientras que la duplicación de SOX9 lleva a una reversión sexual de hembra a macho (Huang et al 1999). En el caso de ratones, la deleción dirigida de Sox9 en individuos XY interfiere con la diferenciación testicular, mientras que la sobre expresión de Sox9 en gónadas XX da como resultado el desarrollo de un testículo (Chaboissier et al 2004; Bishop et al 2000). Estos hallazgos indican que el gen Sox9 puede sustituir las funciones del gen Sry. Además de que ambos genes se expresan específicamente en las células precursoras de Sertoli durante el desarrollo de las gónadas XY, lo que sugiere que Sry directamente promueve la activación de Sox9 y que Sox9 esta involucrado en el inicio y mantenimiento de la diferenciación de las células de Sertoli (Sekido et al 2004).

1.2.2 GATA4 [(T/A) GATA (A/G)]

Los factores de transcripción con dedos de zinc GATA juegan un papel crítico en varios procesos del desarrollo, incluyendo desarrollo cardiaco (Molketin et al 1997), morfogénesis del hígado (Rossi et al 2001), y desarrollo pulmonar (Yang et al 2002). Aunque el papel exacto que juegan las proteínas GATA en el desarrollo gonadal no ha sido bien establecido, se sabe que GATA4 parece ser el único miembro de la familia GATA que está presente en las células somáticas de la cresta genital (Viger et al 1998). Estudios realizados en ratones muestran que este factor se expresa en las células somáticas de la gónada en etapa indiferenciada (11.5 dpc) en ambos sexos. En el inicio

del dimorfismo sexual de la gónada, la expresión de GATA4 se empieza a detectar de manera dimórfica: en gónadas XY la expresión es sobre regulada en las células de Sertoli y regulada negativamente en las células intersticiales, mientras que en las gónadas XX, la expresión es regulada negativamente en todas las células. La expresión de GATA4 persiste en las células somáticas del testículo postnatal y es reactivada en el ovario adulto con predominio en las células de la granulosa (Heikinheimo et al 1997).

Debido a que ratones con deleciones para el gen GATA4 mueren aproximadamente entre los 7 y 9.5 dpc, el análisis sobre la diferenciación gonadal en ausencia de GATA4 no es posible (Kuo et al 1997). Sin embargo, se ha propuesto que GATA4 se une a un sitio consenso del promotor de MIS y activa su expresión in vitro (Viger et al 1998). Esto sugiere que GATA4 puede ser un factor clave en la cascada molecular, controlando el desarrollo gonadal y la diferenciación sexual masculina en mamíferos. Uno de los posibles papeles que se le han asignado a GATA4 es que contribuye al desarrollo de la gónada fetal del macho, regulando genes que participan en la regresión de los conductos Mullerianos, así como en el inicio de la síntesis de testosterona (Holly, A., 2003). El ARNm y la proteína de GATA4 persisten en el testículo en desarrollo (13.5 dpc) hasta la vida adulta localizándose en el núcleo de las células de Sertoli y Leydig, el pico inmunoreactivo de las células de Sertoli se detectó durante el período de proliferación de las células de Sertoli; en el caso de las células de Leydig, la expresión más evidente se observó en los períodos del desarrollo asociados con la producción de testosterona (semana 15 y después de la pubertad).

En el caso de la diferenciación testicular en humanos, la expresión de la proteína de GATA4 se detecta más tarde en el desarrollo. Su expresión está confinada a las células de Sertoli y solo se detecta después de la organización de los cordones seminíferos, lo que sugiere que este factor, a diferencia del ratón, parece no estar involucrado en el inicio de la expresión de MIS (De Santa Bárbara et al 2000).

1.2.3 Sf1 (*Steroidogenic Factor-1*)

El factor esteroideogénico 1 (SF-1), inicialmente se aisló como un regulador de la expresión de hidroxilasas en células corticales de la adrenal y células de Leydig (Luo et al 1994). Este factor, también conocido como SF1, Nr5a1, y Ad4bp, es un receptor nuclear huérfano codificado por *Ftz-F1*, el cual está evolutivamente conservado entre vertebrados

e invertebrados (Karpova et al 2005). Un análisis estructural del gen *Ftz-F1* de ratón indicó 4 diferentes transcritos, ELP1, ELP2, ELP3 y SF1 los cuales difieren en su inclusión de exones alternativos y el uso de diferentes promotores (Ninomiya et al 1995). SF1 regula la vía de homeostasis endócrina por ser un factor de transcripción, para genes que codifican varias enzimas que producen esteroides tales como P450_{SCC}, P450_{arom}, StAR, y α GSU; así como hormonas que regulan la esteroidogénesis (LH β , GnRH, y la α inhibina), y sus receptores respectivos (GnRHR y FSHR).

El papel esencial de SF1 en el desarrollo embrionario ha sido elucidado después de generaciones de ratones knockout para SF1, mostrando diferencias en el desarrollo adrenal y gonadal (Luo et al 1994). En estudios donde se realizó mutación dirigida del gen *Ftz-F1*, el cual codifica para SF-1, se observó que todos los ratones deficientes de SF-1 muestran genitales internos y externos de hembra y no hay presencia de tejido gonadal o glándulas adrenales independientemente de la presencia del cromosoma Y. A los 10.5 *dpc*, la cresta genital se observa con apariencia normal, aunque la región de la gónada es más pequeña comparada con los animales normales. A los 12.5 *dpc* el tejido gonadal es escaso y las pocas células que permanecen muestran características de células apoptóticas. Estas características sugieren que el SF-1 actúa de una manera similar a WT1 (Kreidberg et al 1993). Con base en esto, es probable que SF1 active la expresión de otros genes durante el desarrollo gonadal temprano. La ausencia de esteroides adrenales en los ratones nulos para SF1 resulta en la muerte poco tiempo después del nacimiento. La carencia de esteroides gonadales durante el desarrollo embrionario resulta en una reversión sexual de macho a hembra. Además de estas características los ratones también presentaron ausencia de un núcleo ventromedial del hipotálamo, dañando la expresión de genes dentro de los gonadotropos de la pituitaria.

Los sitios de expresión de SF1 correlacionan con su función esteroidogénica. SF1 es expresado por todas las células esteroidogénicas primarias, tales como células de la adrenal, células de Leydig (Luo et al 1994) y de la teca en las gónadas, además de tejidos tales como el núcleo ventromedial del hipotálamo y gonadotropos de la pituitaria. Su expresión es también dependiente de la edad mostrando una regulación en el desarrollo. El comienzo de la expresión de SF1 ocurre al los 9.5 *dpc* en las células de la cresta urogenital que da origen a las gónadas y a la glándula adrenal. Después que la determinación sexual se inicia, la expresión de SF1 es regulada negativamente en el

ovario y persiste en el testículo en los cordones seminíferos (Ikeda et al 1993) esto contribuye a la diferenciación sexual en el macho (Karpova, et al 2005).

1.2.4 WT1 (*Wilms' Tumor supresor 1*)

El gen WT1 (Wilm's Tumors 1) esta localizado en el cromosoma 11p13 en el humano y en el cromosoma 2 en el ratón y codifica para un factor de transcripción que contiene dedos de zinc que es crítica para el desarrollo y función de la cresta urogenital (Kreidberg et al 1993). Tanto en el humano como en el ratón la expresión de este gen está confinada al riñón y las gónadas (Discenza et al 2004). En la cresta urogenital del ratón los transcritos de WT1 son detectados tempranamente a los 9 dpc, tanto en macho como en hembras. Después de la diferenciación sexual de la gónada el ARNm de WT1 es localizado en las células de Sertoli, en la túnica albugínea y en la rete testis en el macho. En la hembra se detecta en las células de la granulosa, en la capa epitelial del ovario, en el útero, oviducto y en el endometrio. En ratones Knockout homocigotos para una mutación nula de WT1, se presenta agenesia gonadal, además de un alto grado de apoptosis y los embriones mueren en útero (Kreidberg et al 1993). En humanos, mutaciones en *Wt1* han sido asociadas con síndromes tales como: WAGR (Wilms' Tumor-Aniridia-Genitourinary Anomalies-Mental Retardation Síndrome; Natoli et al 2004) Denys Drash (DDS) (Pelletier et al 1991) y el síndrome Frasier (Klamt et al 1998, Barbaux et al 1997). Las características comunes de estos síndromes son la predisposición a fallas renales y defectos en el sistema reproductivo (Scharnhorst et al 2001).

En ratones, la ausencia de WT1 ocasiona disgenesia gonadal completa; el establecimiento de la cresta genital se lleva a cabo, pero el subsiguiente desarrollo es detenido (Kreidberg et al 1993). En individuos con mutaciones que afectan el "splicing" de una secuencia de tres aminoácidos (KTS) dentro del tercer dominio de los dedos de zinc muestran anomalías en el desarrollo de la gónada (Hammes et al 2001), así como homocigotos que son incapaces de generar la isoforma +KTS, desarrollando gónadas que asemejan mas a estructuras ováricas tanto en animales XX como XY.

Como se ha descrito, la expresión regulada de Sox9, SF1, GATA4 y WT1 son cruciales para el establecimiento normal del sexo. Cuando existe alguna alteración en la expresión de algunos de estos genes, el sexo cromosómico establecido en el momento de la

fertilización es alterado en los subsecuentes eventos. Estas alteraciones llevan a anomalías de la diferenciación sexual como: ambigüedad de genitales internos y/o externos, reversión sexual y hermafroditismo. Con base en esto, uno de los caminos más exitosos para investigar los mecanismos involucrados en la determinación sexual ha sido el estudio de estas alteraciones descritas principalmente en mamíferos.

1.3 Reversión sexual en mamíferos.

Como se mencionó, durante el desarrollo embrionario en humanos como en la mayoría de los vertebrados, se forma una gónada bipotencial la cual debido a especializaciones sucesivas determinan el mecanismo usual de una opción entre una diferenciación testicular u ovárica. Sin embargo, existen casos de alteraciones genéticas donde el sexo genotípico del individuo no coincide con su sexo fenotípico. En algunos casos de reversión sexual de macho a hembra (varones XX) se ha observado que el gen *SRY* está presente; mientras que en casos de individuos XY con fenotipo femenino se ha detectado la presencia del *SRY*. Estos datos sugieren que el gen *SRY/Sry* es necesario pero no suficiente para el establecimiento del sexo masculino. Otra anomalía genética de la determinación y/o diferenciación sexual es el desarrollo de individuos hermafroditas. En estos casos en un mismo individuo coexisten tejido testicular y ovárico, esto puede ser de manera lateral (la presencia de un testículo contralateral a un ovario), o formando ovotestis (diferenciación de tejido testicular y ovárico en la misma gónada).

En su mayoría, los mecanismos de reversión sexual en mamíferos pueden ser originados por mutaciones o translocaciones de genes involucrados en la determinación sexual. Ejemplos de estas anomalías las podemos encontrar en ratones sex-reversed (*Sxr*), donde las hembras con constitución cromosómica XX desarrollan testículos y fenotipo masculino debido a que un segmento del cromosoma Y es translocado al cromosoma X (Singh y Jones, 1982). Otro ejemplo es la reversión sexual encontrada en ratones XX *Odsex* (*Ods*: degeneración ocular con reversión sexual), los cuales acarrean una delección de 150 kb del gen *Sox9*. Estas hembras genéticas se desarrollan como machos XX estériles que carecen de *Sry*, lo cual se ha atribuido a una sobre expresión de *Sox9* (Bishop et al 2000). Experimentos de Vidal et al, (2001) indican que *Sox9* es suficiente para inducir el desarrollo del fenotipo de machos en gónadas XX. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido si la sola expresión de *Sox9* es suficiente para dirigir la

diferenciación gonadal hacia un testículo. Los casos de reversiones sexuales de hembra a macho en ausencia de SRY descritas en humanos se ha propuesto que se deben a una activación ectópica que causa una duplicación de la región que contiene al Sox9 en las gónadas XX (Bishop et al 2000).

En otros mamíferos también se han observado casos de reversión sexual donde los individuos presentan cromosomas sexuales sin alteraciones, y los factores involucrados en los procesos de determinación sexual se están expresando de manera normal. Un ejemplo es la condición “freemartin” en ovejas y cabras, donde en el caso de gemelos se desarrollan componentes testiculares en el ovario cuando la circulación sanguínea de un feto de hembra es compartida con la de un macho (Lillie, 1916; Jost, 1973). El mecanismo de este fenómeno no es claro, principalmente por la dificultad de reproducir la condición experimental.

En la década de los 80's el grupo de Eicher genero una cepa de ratones denominada B6.Y^{tir}, la cual asemeja estas alteraciones descritas en humanos y otras cepas de ratones. Este modelo animal presenta reversión sexual completa de macho a hembra, ambigüedad de genitales internos y externos y hermafroditismo. Estas anomalías son repetidas en cada generación, por lo que ha permitido estudiar algunos eventos moleculares, celulares y morfológicos que llevan a la reversión sexual en mamíferos (Lee y Taketo 1994; Carlisle et al 1996; Eicher et al 1996; Marmolejo et al 1999; Lee y Taketo 2001; Moreno et al 2004; Taketo et al 2005).

1.4 El ratón B6.Y^{tir} como modelo de reversión sexual en mamíferos

Eicher et al (1982) reportaron que cuando el cromosoma Y de la subespecie *Mus musculus domesticus* originado en Poschiavo (Suecia) se introduce al background de la cepa B6, toda la progenie falla en desarrollar testículos normales durante la vida fetal, y algunos individuos desarrollan ovarios bilaterales y fenotipo femenino. Después, otros miembros de *Mus musculus domesticus* mostraron también el mismo fenotipo. Uno de estos casos fue cuando el cromosoma Y del ratón silvestre *Mus musculus domesticus* (Y^{tir}; Tirano, Italia) se introdujo en el genoma de la cepa C57BL/6J (B6). De la primera generación (F1) todos los machos, denominados B6.Y^{tir}, resultaron normales, pero en la progenie de la retrocruza obtenida entre machos F1 y hembras B6, el cromosoma Y^{tir} falla

en llevar a cabo la diferenciación testicular normal y como resultado hay una reversión sexual parcial o completa de los individuos XY (Eicher y Washburn, 1986; Nagamine et al 1987). A partir de la sexta generación (F6), ningún individuo XY desarrolla testículos normales durante la vida fetal, aproximadamente el 50% desarrolla ovotestis y el otro 50% presenta reversión sexual severa, donde se desarrollan ovarios y los individuos son fenotípicamente hembras. De la misma manera, también se desarrollan individuos hermafroditas con un testículo y un ovario contralateral.

1.4.1 Fenotipo del ratón B6.Y^{tir}

La diferenciación sexual anormal en el B6.Y^{tir} se inicia a nivel de la gónada. Los ovotestis de los hermafroditas están formados por cordones testiculares en la región medular, mientras que en las regiones craneal y caudal, la organización morfológica corresponde a una diferenciación ovárica (Merchant y Taketo, 1991). En la región medular de los ovotestis se ha demostrado la expresión de la sustancia inhibidora de los conductos Mullerianos y la producción de testosterona, factores característicos de la diferenciación testicular normal, mientras que en la región ovárica se han observado células meióticas (Taketo et al 1989). Algunos hermafroditas se desarrollan como machos si desarrollan suficiente tejido testicular para masculinizar sus genitales internos y externos y producir suficiente espermatozoides para fertilizar. Estos hermafroditas fértiles permiten mantener la cepa C57B6.Y^{tir}, lo cual no es posible con las hembras B6.Y^{tir} debido a que son estériles (Eicher et al 1995).

El ovario B6.Y^{tir} es también morfológicamente idéntico al ovario normal XX hasta los 16.5 días post coitum (*dpc*). Sin embargo, muchos ovocitos en el área central degeneran entre los 16.5 y 19.5 *dpc*. En los ovarios XX, la degeneración de ovocitos es también una característica normal pero esta no está confinada a la región medular, ni se lleva a cabo de una manera masiva.

Con una excepción, se ha reportado que las hembras XY^{tir} son estériles. El análisis histológico de sus ovarios revela un número reducido de folículos comparándolos con los ovarios XX (Nagamine et al 1987., Morales et al, 2004). El número reducido de folículos se ha relacionado con la muerte masiva de ovocitos en ovarios fetales entre los 16 y 18 *dpc* (Taketo et al 1989). A las tres semanas postparto, los cordones medulares

desprovistos de ovocitos forman cuerpos luteos que producen niveles anormales de hormonas esteroides (Villalpando et al 1993). Después del nacimiento, los ovocitos que permanecen en el ovario forman folículos normales morfológicamente. Además, después del tratamiento con gonadotropinas, las hembras B6.Y^{tir} ovulan y sus ovocitos son fertilizados. Algunos embriones inician la segmentación pero no logran implantarse (Merchant et al 1994). Los ovocitos fertilizados de los ovarios B6.Y^{tir} podrían no desarrollarse debido a un factor inhibidor producido por el cromosoma Y^{tir} durante la ovogénesis y/o debido al ambiente somático XY que lo rodea desde etapas tempranas del desarrollo (Morales et al 2004).

1.4.2 Papel del Sry en el desarrollo gonadal del ratón B6.Y^{tir}

En el caso del ratón B6. Y^{tir} se pensaba que la expresión del Sry estaba bloqueada. Sin embargo, se encontró que este gen inicia su transcripción al mismo tiempo que en el desarrollo normal, aunque su patrón de expresión permanece en la gónada Y^{tir} 36 horas más que en los testículos normales (Lee y Taketo, 1994). Uno de los papeles que parece estar jugando el gen Sry durante el desarrollo normal, es dirigir la diferenciación de las células de Sertoli, las cuales a su vez dirigirán la diferenciación de otros linajes celulares durante el desarrollo normal del testículo. Sin embargo, se ha encontrado que en los ovarios XY^{tir}, al igual que ocurre en los ovarios XX, no se detecta la expresión de genes como la 3 β -HSD y la 17 α -hidroxilasas, enzimas importantes para la producción de testosterona y la subsiguiente diferenciación de genitales internos y externos masculinos. Por lo que, Nagamine y col (1999), realizando un estudio semicuantitativo por RT-PCR comparando los niveles de expresión del Sry de las cepas Y^{tir} (reversión sexual severa), AKR (reversión sexual transitoria) y FVB (desarrollo sexual normal), encontraron que el Sry se expresa en el mismo tiempo que en el desarrollo gonadal normal, pero los niveles detectados están reducidos de acuerdo con el grado de reversión sexual en cada cepa. Sin embargo, en estudios posteriores donde se compararon los niveles de expresión de los transcritos de Sry de la cepa normal B6 con la Y^{tir}, se observaron bajos niveles en ambas cepas, sugiriendo que los bajos niveles de expresión no son solo la causa de la reversión sexual en el ratón B6.Y^{tir} (Lee y Taketo 2001). Actualmente, se ha analizado la expresión endógena del Sry en las crestas genitales del ratón por hibridación in situ (Bullejos y Koopman 2001), y otros autores han estudiado la expresión del transgene de Sry aumentando los niveles y marcando las

secuencias reguladoras del gen *Sry* con la proteína verde fluorescente (Albrecht y Eicher 2001). Los resultados fueron similares en ambos estudios, donde se observó que la expresión de *Sry* es espacialmente dinámica, y ocurre en una oleada que emana de la región central de la cresta genital, extendiéndose al polo rostral y después caudal y retrocede hacia el polo caudal donde es extinguida. Con base en esto, un estudio similar fue realizado en la cepa B6.Y^{dom} con el fin de establecer la causa de la reversión sexual y determinar si los eventos desencadenados por el *Sry* están afectados. Los resultados sugieren que un retraso en la expresión de *Sry* y genes cascada abajo, tal como el *Sox9*, llevan a la reversión sexual del ratón B6.Y^{dom} (Bullejos y Koopman 2005).

Conociendo que el gen *Sry* se expresa en la gónada fetal del ratón B6.Y^{tir}, es factible pensar que la formación de ovotestis u ovarios en machos XY^{tir} puede deberse a una falla en los eventos desencadenados por este factor. Correlacionando el tiempo y distribución de las células de pre-Sertoli que expresan *Sox9* en las gónadas fetales del ratón B6.Y^{tir}, Moreno y col (2004) encontraron que en las células de pre-Sertoli se expresa *Sox9* en todas las gónadas B6.Y^{tir} a los 11 y 12 dpc. Sin embargo, de los 13 dpc en adelante en el 50% de las gónadas *Sox9*, es regulado negativamente, lo que corresponde al número de gónadas XY^{tir} que se desarrollan como ovarios. Esto sugiere que el desarrollo anormal en la cepa B6.Y^{tir} puede deberse a una falla parcial de la función de *Sox9* como consecuencia de los bajos niveles de transcritos de *Sry*. Estos datos sugieren que la presencia del gen *Sry* no es suficiente para dirigir la diferenciación testicular, sino que su expresión depende a su vez de genes autosómicos y/o genes ligados al cromosoma X.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con la identificación del gen *Sry* como el factor determinante de la diferenciación testicular, el enfoque que actualmente se da a los problemas de reversión sexual se ha dirigido hacia el establecimiento de mecanismos celulares y moleculares que participan durante los procesos de determinación y diferenciación sexual en mamíferos. El desarrollo sexual normal involucra una serie de procesos complejos, que comprende un número significativo de genes, así como de interacciones celulares. Uno de los caminos más exitosos para entender estos procesos ha sido la descripción de casos clínicos en humanos relacionados con anomalías del sexo. Por esto, el modelo de reversión sexual aquí descrito presenta ciertas ventajas ya que las anomalías sexuales que presenta se observan repetidamente en cada generación, por lo cual los hallazgos pueden ser verificados con más acierto. De esta manera, es posible generar un avance más significativo y reproducible en la biología molecular y celular involucrada en la diferenciación sexual de los mamíferos.

En los ratones B6.Y^{tir}, los embriones XY se desarrollan como hembras con dos ovarios o como hermafroditas verdaderos con dos ovotestis o un ovotestis y un ovario. En todos los casos la expresión de los genes *Sry* y *Sox9* es positiva, lo que nos sugiere que la presencia de estos genes no es suficiente para dirigir la diferenciación testicular, sino que existen otros factores involucrados en los mecanismos de determinación y diferenciación sexual. Por lo que, conociéndose algunos mecanismos moleculares involucrados en la determinación sexual del ratón B6.Y^{tir}, se aportará datos relevantes sobre el desarrollo normal de la gónada.

3. HIPOTESIS

La reversión sexual en el ratón B6. Y^{tir} se debe a una alteración en el patrón de expresión de genes autosómicos en etapas tempranas del desarrollo gonadal. Estas alteraciones pueden o no ser reguladas por los genes Sry y Sox9.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el patrón de expresión de los genes autosómicos GATA4, SF1 y WT1 durante la diferenciación sexual gonadal del ratón B6. Y^{tir} con reversión sexual.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1. Establecer las características morfológicas de las gónadas B6. Y^{tir} en diferentes etapas del desarrollo ovárico y testicular.**
- 2. Correlacionar el patrón de expresión de la proteína de los genes GATA4, SF1 y WT1 durante el desarrollo gonadal de las cepas normales de ratón CD1 y C57 (B6) con la cepa B6. Y^{tir} con reversión sexual.**
- 3. Cuantificar por RT-PCR los niveles de transcritos de los genes GATA4, SF1 y WT1 en los ovotestis y ovarios XY^{tir} , y compararlos con los niveles detectados en ovarios y testículos normales provenientes de las cepas CD1 y B6.**

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Animales

En el presente estudio se emplearon ratones machos de la cepa B6.Y^{tir} de las generaciones N 37-41 que poseen el genoma C57BL/6J y acarrean el cromosoma Y del ratón domestico *Mus musculus domesticus* (Tirano, Italia). Se colocaron de dos a tres hembras de la cepa C57BL/6J (B6) no relacionadas con machos de la cepa B6.Y^{tir} durante toda la noche. A la mañana siguiente, se observó la presencia del tapón vaginal, formado por las secreciones de las glándulas coagulantes del macho que obstruyen el orificio vaginal, señal de que hubo cópula. Se considero como 0.5 *día post coitum* (*dpc*), el día que se registro la presencia del tapón. Para la obtención de embriones de la cepa CD1 y B6 se siguió el mismo procedimiento descrito de cruce.

Las hembras gestantes de 15.5 y 17.5 *dpc* se sacrificaron por dislocación cervical y se colocaron en una plancha aplicándoles en el abdomen una solución antiséptica de benzalcohol al 70%. Los productos se aislaron del útero y se les realizó un corte diagonal abarcando la región media caudal del embrión dejando expuesto el sistema urogenital. Con ayuda de micro tijeras se disecaron las gónadas y fijaron en paraformaldehído al 4% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para su análisis inmunocitoquímico, o se congelaron a -70°C para la detección de los niveles de transcritos del ARNm. Las crías de 1 *día post partum* (*dpp*) se sacrificaron por decapitación y se obtuvieron los tejidos que fueron fijados o congelados de la misma manera. El sexo de los embriones en las cepas control CD1 y B6 se determinó por las características morfológicas de la gónada: en el testículo la presencia de cordones le da la apariencia de tener estrías, se encuentra altamente vascularizado y presenta una forma redondeada. En el caso del ovario, hay poca penetración de vasos sanguíneos y su estructura permanece compacta. En el caso de los individuos provenientes de la cepa B6.Y^{tir}, en las edades estudiadas ya es posible detectar también diferencias morfológicas a nivel de la gónada. Sin embargo, es necesario conocer el sexo cromosómico con el fin de detectar los individuos que presentan reversión sexual.

5.2 Identificación por PCR del gen *Zfy*

El sexo cromosómico de embriones B6.Y^{tir} se determinó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificando un fragmento de 600 pb del gen *Zfy* presente en el cromosoma Y. El DNA utilizado se aisló de tejido fetal (15.5 y 17.5 *dpc*) o de una pata de los ratones de 1 *dpp*. Los tejidos se incubaron en buffer de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.5% Tween 20, 0.5% NP-40 y 0.4mg/ml proteinasa K) a 55°C toda la noche. La acción de la proteinasa K se inactivó por calentamiento a 85°C durante 10 min. Posteriormente 15 µl del lisado se mezcló con 85 µl de H₂O bidestilada (bd). Dos microlitros de DNA de cada muestra se amplificó en un volumen total de 20 µl conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 0.01% gelatina, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTP, 0.5 U de Taq DNA polimerasa y 0.25 µM de cada uno de los siguientes oligonucleótidos:

Detección del gen *Zfy*:

***Zfy1*: 5' AAG ATA AGC TTA CAT AAT CAC ATG GA 3'**

***Zfy2*: 5' CCT ATG AAA TCC TTT GCT GCA CAT GT 3'**

Detección del gen β-actina como control interno:

Actina 1 5'GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3'

Actina 2 5'GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3'

El programa de amplificación abarco los siguientes rangos: 94°C/10 min (una vez), 94°C/15 sec, 60°C/15 sec, 72°C/30 sec (35 ciclos), 72°C/10 min (una vez). La reacción de PCR obtenida se visualizó en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (48.4 g de Tris base 11.5 ml de ácido acético, 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8 y H₂O.desionizada), con bromuro de etidio sobre un transiluminador con luz UV.

5.3 Microscopia de luz

Para el análisis de los tejidos a nivel de microscopía de campo claro, las gónadas se fijaron en una solución de Karnovsky (Karnovsky, 1965) sin calcio (pH 7.4), se

postfijaron con 1% de Tetroxido de Osmio (OsO_4) en buffer de Zetterqvist (Zetterqvist, 1956) e incluyeron en Epón 812. Se obtuvieron cortes de 1 μm y se tiñeron con azul de toluidina.

5.4 Inmunocitoquímica

Las gónadas disecadas se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min y se incubaron toda la noche en una solución de sacarosa al 30% en PBS a 4°C. Los tejidos se incluyeron en Tissue-Tek para obtener cortes en congelación de 20 μm de espesor, los cuales se adhirieron a portaobjetos cubiertos con poly-L-lysina. Las secciones se trataron con la solución de bloqueo compuesta por albúmina al 1% en PBS (Ab-PBS) por 2 horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Se utilizaron cuatro anticuerpos primarios con las siguientes diluciones:

1. **anti-Ad4BP/SF1** policlonal generado en conejo (donado por el Dr. Ken-ichirou, National Institute of Natural Sciences. Aichi, Japón) 1:1000 en Ab-PBS.
2. **anti-GATA4** policlonal generado en cabra (Santa Cruz Biotechnology C-20) 1:250 en Ab-PBS.
3. **anti-WT1** policlonal generado en conejo (Santa Cruz Biotechnology C-19) 1:200 en Ab-PBS.
4. **anti-Laminina** policlonal generado en conejo (Sigma) 1:500 en Ab-PBS.

El sitio de unión del antígeno se evidenció incubando las secciones con los anticuerpos secundarios anti-conejo IgG CyTM5 (SF1 y WT1), anti-cabra CyTM5 (GATA4). En las mismas secciones tratadas con el anticuerpo anti-GATA4 se detectó la distribución del anticuerpo anti-laminina post fijando con paraformaldehído al 4% en PBS por 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente se trataron con la solución de bloqueo por 2 horas y se incubó con el anticuerpo anti-laminina toda la noche a 4°C. Después de lavar en PBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo Rodaminado. Las observaciones se realizaron en un microscopio confocal láser (LSM Pascal, Zeiss. Argón-Criptón y Helio-Neón). Se utilizaron los filtros BP 546/12 (rodamina-Cy3) y LP 650 (Cy5).

5.5 Diseño de oligonucleótidos

Se realizó el diseño de los oligonucleótidos de los genes GATA4, SF1 y WT1 a partir de las secuencias previamente reportadas en el Banco de Genes utilizando el RNAm de estos genes:

1. **AF511594:** *Mus musculus* steroidogenic factor-1 (Ftzf1)

Sentido: CAT TAC ACG TGC ACC GAG AG

Antisentido: GAT GGT GCG GTT AGA GAA GG

2. **NM_008092:** *Mus musculus* GATA binding protein 4 (GATA4)

Sentido: CAC AAG ATG AAC GGC ATC AA

Antisentido: GCG ATG TCT GAG TGA CAG GA

3. **NM_144783:** *Mus musculus* Wilms tumor homolog (WT1)

Sentido: AGT TCC CCA ACC ATT CCT TC

Antisentido: TGG TCT GAG CGA GAA AAC CT

El diseño de los oligonucleótidos consideró los siguientes parámetros:

- Longitud del oligonucleótido de 8 a 20 nucleótidos
- Porcentaje de G/C y A/T cercano al 50%
- Tm (temperatura media) de los pares similar

Tomando en cuenta estos parámetros, se utilizó el programa denominado "Primer 3" para obtener nuestros oligonucleótidos. Se seleccionaron los más adecuados para cada gen, cada par generado consto de 20 nucleótidos, tanto para los oligonucleótidos sentido como los antisentido.

5.6 Reacción en cadena de la polimerasa-Transcriptasa reversa (RT-PCR)

5.6.1 Extracción del ARN Total

El ARN total se obtuvo a partir de un par de gónadas previamente congeladas a -70°C. Utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA); la extracción se basó en el método de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomezynski and Sacchi 1987) considerando el protocolo recomendado por los fabricantes de TRIzol, el cual es el más adecuado para los tejidos de mamíferos. Se realizaron algunas modificaciones para mejorar el aislamiento del ARN debido al tamaño de las muestras. El protocolo optimizado para 1 par de gónadas fue el siguiente:

Fase de separación: una vez que se aislaron los tejidos, se congelaron en tubos eppendorf a -70 °C, posteriormente se realizó el homogeneizado de las gónadas en 200 µl de TRIzol por muestra. Durante la homogeneización de las muestras o lisis, el TRIzol mantiene la integridad del ARN, mientras se rompen las células y se disuelven los componentes celulares. Se adicionaron 40 µl de cloroformo y se dejó incubando 5 min a 4° C, seguido por una centrifugación a 14000 rpm/4° C por 30 min, obteniendo 2 fases del homogeneizado una fase acuosa y una fase orgánica. El ARN permaneció en la fase acuosa.

Fase de precipitación: esta fase consistió en transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf tratado con H₂O DEPC (dietilpirocarbonato); evitando tocar la fase orgánica para obtener un ARN libre de DNA, proteínas y de TRIzol. Al ARN total recuperado se le adicionó 100 µl de alcohol isopropílico (isopropanol), se mezcló suavemente hasta ver una sola fase y se dejó precipitando toda la noche a -20° C.

Lavado del ARN: al día siguiente se centrifugaron las muestras a 14000 rpm/4° C durante 30 min, se decantó el sobrenadante, y el botón formado fue lavado en 100 µl de etanol 80% en H₂O libre de RNasas. Se mezcló muy bien y nuevamente se volvió a centrifugar a 14000 rpm/4° C durante 30 min. La fase acuosa se retiró y el botón del ARN total se dejó secar en la campana de flujo laminar durante 10 min.

Resuspensión del ARN: finalmente el botón que contenía al ARN total fue resuspendido en H₂O tratada con DEPC (10 µl). Se tomó una alícuota del ARN total por muestra y se diluyó en H₂O DEPC (1:100), se analizó por espectrofotometría, leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm. (Sambrook et al 1989). Un microgramo de ARN total se utilizó inmediatamente como sustrato para la reacción de RT-PCR

5.6.2 RT-PCR (Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa)

El ARN total de cada muestra, se trato con la enzima DNAsa I (Deoxyribonuclease I, amplificación Grade; Invitogen), siguiendo el protocolo recomendado por los fabricantes. Brevemente, a 1 µg del ARN total se le adicionó 1 µl del Buffer de Reacción DNasa I 10X, 1 µl DNase I, Amp Grade, 1 U/1µl, llevándose a un volumen final de 10 µl con H₂O DEPC. El tiempo de acción de la enzima de la DNAsa I en la reacción fue de 30 min a temperatura ambiente. Cumplido el tiempo se le adicionó 1µl de EDTA 25 mM para inactivar la acción de la DNAsa I, incubando la reacción a 65° C por 10 min. Finalmente las muestras tratadas con la DNAsa I están listas para ser utilizadas para la RT-PCR.

La reacción de amplificación se realizó con el Kit One-Step, conteniendo los siguientes reactivos: 2X mix, Superscript II RT/ Taq polimerasa RT-PCR kit (Life Technologies Invitrogen); H₂O RNAsa free, 200 ng de ARN total y el par de oligonucleótidos específicos para cada gen, obteniendo 20 µl de reacción final.

Para establecer la temperatura de alineamiento para cada par de oligonucleótidos se prepararon cuatro diferentes tubos con la misma mezcla de reacción, probando cuatro temperaturas diferentes alrededor de la temperatura de alineamiento teórica calculada. Para realizar el RT-PCR de cada uno de los genes se utilizó el termociclador Master Cycler Gradient (Eppendorf). Como control interno de expresión se realizó la amplificación de un fragmento de 243 pb del ARNm de la β-actina, utilizando los siguientes oligonucleótidos

Actina 1: 5'GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG 3'

Actina 2: 5'GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG 3'

La reacción de amplificación de la β -actina se realizó en paralelo con la del gen de interés bajo las mismas condiciones de reacción y el mismo programa de amplificación. La reacción en todos los casos se llevó a cabo en una concentración 2X del amortiguador del reactivo (contiene 0.4mM de cada dNTP, 2.4 mM $MgSO_4$), 1 a 1.5 mM de oligonucleótidos y 0.5 μ l de la enzima Superscript II RT/Taq polimerasa (Life Technologies Invitrogen). En cada experimento se incluyó el control sin RT, solo con Taq polimerasa, para detectar una probable contaminación con ADN genómico.

En la tabla 1 se muestra el programa de amplificación que se utilizó para cada par de oligonucleótidos y el tamaño del fragmento obtenido. La especificidad de los oligonucleótidos se determinó tomando como molde ARN total obtenido de las gónadas de ratón, y utilizando como control positivo el ARN total de diferentes tejidos como corazón para el caso de GATA4, glándulas adrenales para SF1 y riñón para WT1.

5.6.3 Electroforesis

Los productos de las reacciones paralelas se corrieron individualmente en un gel de agarosa 1% en TAE 1X, con bromuro de etidio (0.1 μ g/ml) (Sambrook et al 1989). Los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con una cámara Polaroid DS-34 (Polaroid, Waltham, MA).

5.6.4 Densitometría

Para tener un valor semi-cuantitativo de la expresión de los genes GATA4, SF1 y WT1 se realizó un análisis densitométrico. Para obtener las imágenes de los geles se utilizó un transiluminador de UV y la cámara fotográfica DS-34. Las fotografías se adquirieron con una apertura de 5.6 y una exposición de medio segundo, condiciones con las que se observaron las bandas con mayor definición. La película empleada en todas las ocasiones fue la Polaroid Polopan 667, asa 3000 y en todos los casos el tiempo de revelado fue de 60 segundos. Los geles se digitalizaron en un Scanner HP Scanjet 3770, con una resolución 300 dpi.

Tabla 1. Diseño de oligonucleótidos para cada gen y su programa de amplificación por RT-PCR.

Gen	Oligonucleótidos [10 Mm].	Programa	Tamaño del fragmento (pb).
GATA4 Oligonucleótido sentido 1337-1356 Oligonucleótido anti- sentido 1840-1859	Gata4 (1): 5' CAC AAG ATG AAC GGC ATC AA 3' Gata4 (2): 5' GCG ATG TCT GAG TGA CAG GA 3' 1.5µl de cada uno	50 ° C 30 min (1 ciclo), 94 ° C/ 5 min (1 ciclo), 94 ° C/30 seg, 56° C/60 seg, 72° C/60 seg (28 ciclos), 72° C/5 min 4° C	552
SF1 Oligonucleótido sentido 167-186 Oligonucleótido anti- sentido 591-610	SF1 (1): 5' CAT TAC ACG TGC ACC GAG AG 3' SF1 (2): 5' GAT GGT GCG GTT AGA GAA GG 3' 1.5 µl de cada uno	50 ° C 30 min (1 ciclo), 94 ° C/ 5 min (1 ciclo), 94 ° C/30 seg, 58° C/60 seg, 72° C/60 seg (32 ciclos), 72° C/5 min 4° C	443
WT1 Oligonucleótido sentido 986-1005 Oligonucleótido anti- sentido 1564-1583	WT1 (1): 5' AGT TCC CCA ACC ATT CCT TC 3' WT1 (2): 5' TGG TCT GAG CGA GAA AAC CT 3' 1.3 µl de cada uno	50 ° C 30 min (1 ciclo) 94 ° C/ 5 min (1 ciclo) 94 ° C/30 seg, 58.2° C/60 seg (34ciclos) 72° C/60 seg, 72° C/5 min 4° C	597 (A) 546 (B)

Las imágenes de los geles se analizaron por computadora; en cada imagen se delimitó una zona que incluyó las bandas de los genes de interés y las del gen control β -actina. La zona delimitada se evaluó píxel por píxel en la escala de blanco a negro.

Para obtener las lecturas densitométricas de las bandas se utilizó el programa Kodak 1D versión 3.6, el cual asigna un valor por área a cada banda. Se analizaron un total de 3 geles para cada uno de los genes, así como, de los controles internos. Se graficó el promedio de la relación gen de interés/ actina para cada una de las edades estudiadas.

5.7 Extracción de los productos de WT1

Debido a que en nuestros geles se observaron dos bandas para la amplificación de WT1, se llevo a cabo la purificación de estas bandas con el fin de conocer su identidad. Se utilizaron los productos de la RT-PCR obtenidos de hembras y machos CD1 de 1 dpp. Las bandas con un peso molecular de 597 y 546 pb, se aislaron individualmente y se purificaron de acuerdo a las instrucciones recomendadas en el kit QIAquick Gel Extracción Kit (QIAGEN). Una vez aisladas las bandas se les agregó el buffer QG, y se incubaron a 55°C de 10 a 15 min. Posteriormente se agregó isopropanol V/V de agarosa, y el contenido de estos tubos se colocó en las columnas de QIAquick, seguido por una centrifugación de 1.5 min a 11,000 rpm. La fase acuosa obtenida durante la centrifugación se decantó para agregar a la columna el buffer PE, seguido por una centrifugación al mismo tiempo y a la misma velocidad anteriormente recomendada. Finalmente, se lleva a cabo la elusión del ADN agregando a la columna 30 μ l de H₂O bi destilada estéril, y centrifugando por 3 min a 12,000 rpm para obtener la mayor cantidad de ADN; el producto obtenido que contiene al ADN se almacenó a 4°C para su posterior análisis de secuenciación.

Una vez obtenido el ADN, el producto purificado se visualizó en un gel de agarosa al 2.5 % disuelto en TAE 1X, con bromuro de etidio; se corrió a 90 V por 1:30 min; para conocer la calidad de las bandas purificadas y su concentración. La concentración del ADN se determinó diluyendo el ADN 2- 100 en H₂O bd estéril, y analizándolo por espectrofotometría (Perkin Elmer) a una longitud de onda de 260/280 nm. Para la secuenciación de las bandas se utilizó el Secuenciador Automático ABI PRISM 310 versión 3.4.1 ABI- CEI versión 3.2 Genetic Analizar PE Applied Biosystems; Perkin Elmer.

5.8 Análisis estadístico

Con el fin de determinar diferencias significativas, entre los niveles de expresión del ARNm de los genes GATA4, SF1 y WT1 en las diferentes cepas y edades estudiadas, se realizó la prueba de U de Mann Whitney. Esta prueba se realizó a partir de las cuantificaciones obtenidas de la densitometría de los productos de RT-PCR. Los datos obtenidos fueron evaluados en el paquete estadístico STATISTICA 6 con un nivel de significancia de $P < 0.05$.

En las gráficas obtenidas se muestra en el eje de las X, las cepas utilizadas, mientras que en el eje de las Y se muestra el promedio y el error estándar de la relación gen/actina, para cada una de las muestras.

6. RESULTADOS

6.1 Detección del cromosoma Y^{tir}

El sexo cromosómico de los embriones y recién nacidos se determinó utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Esta técnica se basa en el uso de oligonucleótidos sentido y anti-sentido que dirigen la síntesis de secuencias específicas de DNA. En este estudio se emplearon el par de oligonucleótidos *Zfy-1* y *Zfy-2* (Nagamine et al 1989), que flanquean una región de 600 pares de bases (pb) del gen *Zfy* encontrada solo en el cromosoma Y. De esta manera se detectó a los embriones que acarrean el cromosoma Y^{tir} y se comparó con el sexo gonadal para establecer que en nuestra cepa se está llevando a cabo reversión sexual de macho a hembra y el hermafroditismo.

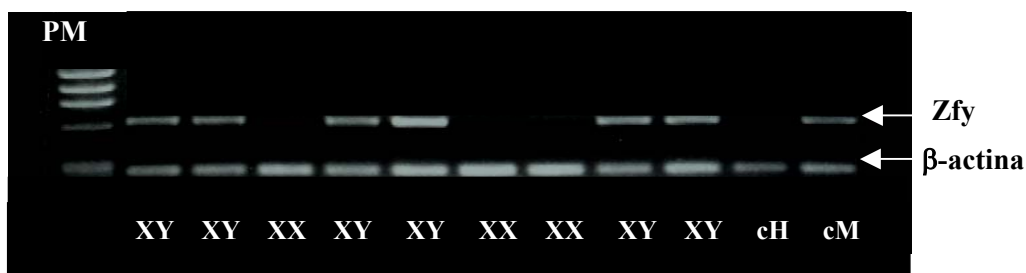
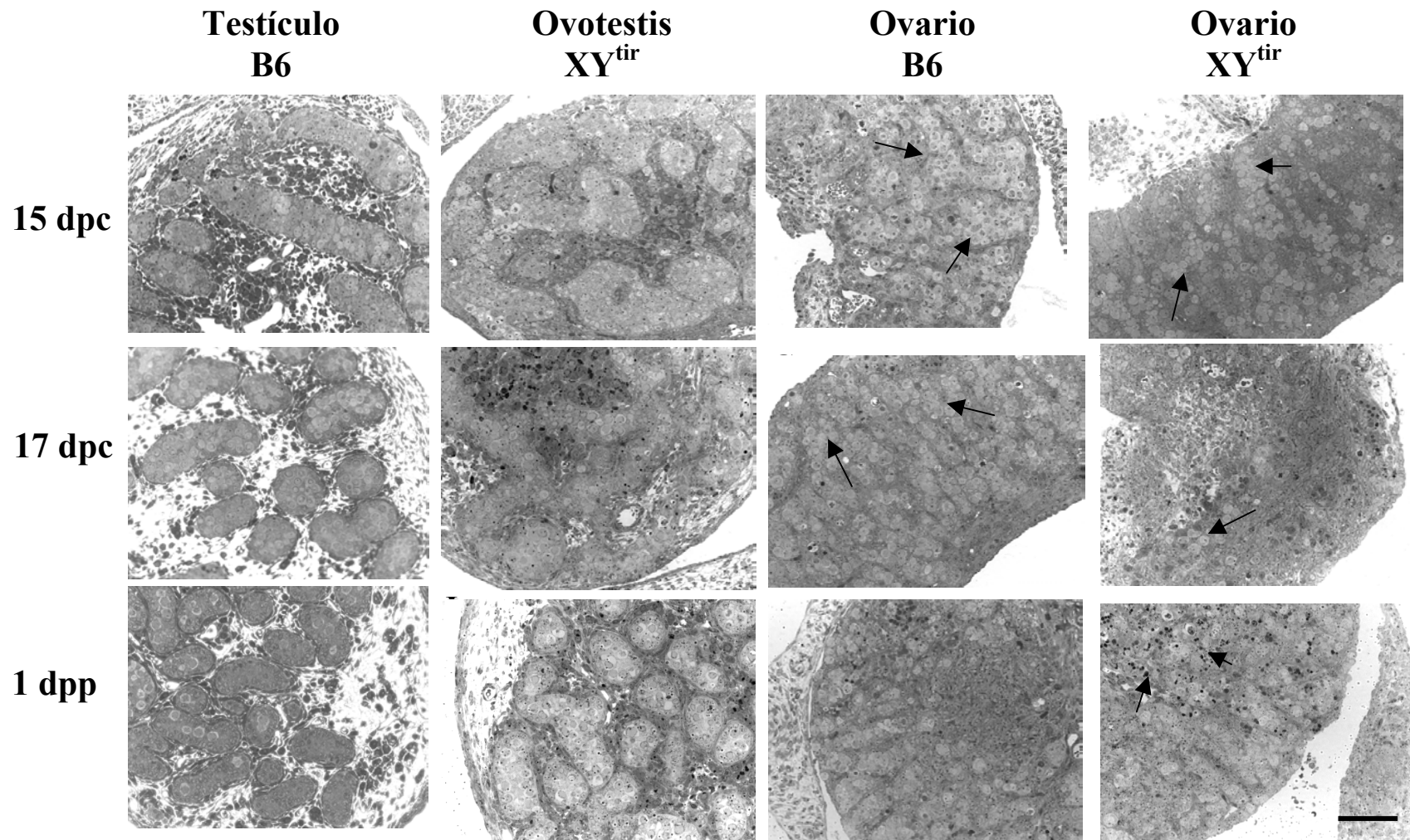


Figura 1. Gel de agarosa que representa el número de embriones que acarrean el cromosoma Y^{tir} en una camada de 15 dpc obtenida de la cruce de una hembra B6 con un macho B6. Y^{tir} . Se observa una banda de 600 pb correspondiente a la detección del gen *Zfy*, en seis de los nueve embriones analizados (XY). Como control negativo y positivo se utilizaron ovarios (cH) y testículos (cM) respectivamente de ratones adultos de la cepa B6. PM: marcador de peso molecular. (100 pb) y β -actina: control interno.

6.2 Análisis morfológico de las gónadas B6. Y^{tir}

Se realizó el análisis histológico a nivel de campo claro de gónadas provenientes de las cepas B6 y B6. Y^{tir} de 15 dpc, 17 dpc y 1 dpp. A los 15 dpc en el testículo B6 se observó la formación de los cordones seminíferos separados del epitelio celómico y rodeados por tejido mesenquimático laxo, debido a la abundancia de vasos sanguíneos (Fig. 2A). En el caso de los ovotestis de la misma edad se observó una estructura más compacta. Los cordones seminíferos están bien delimitados y rodeados por tejido mesenquimático en la región central. Sin embargo, en la región cortical del ovotestis los

Figura 2

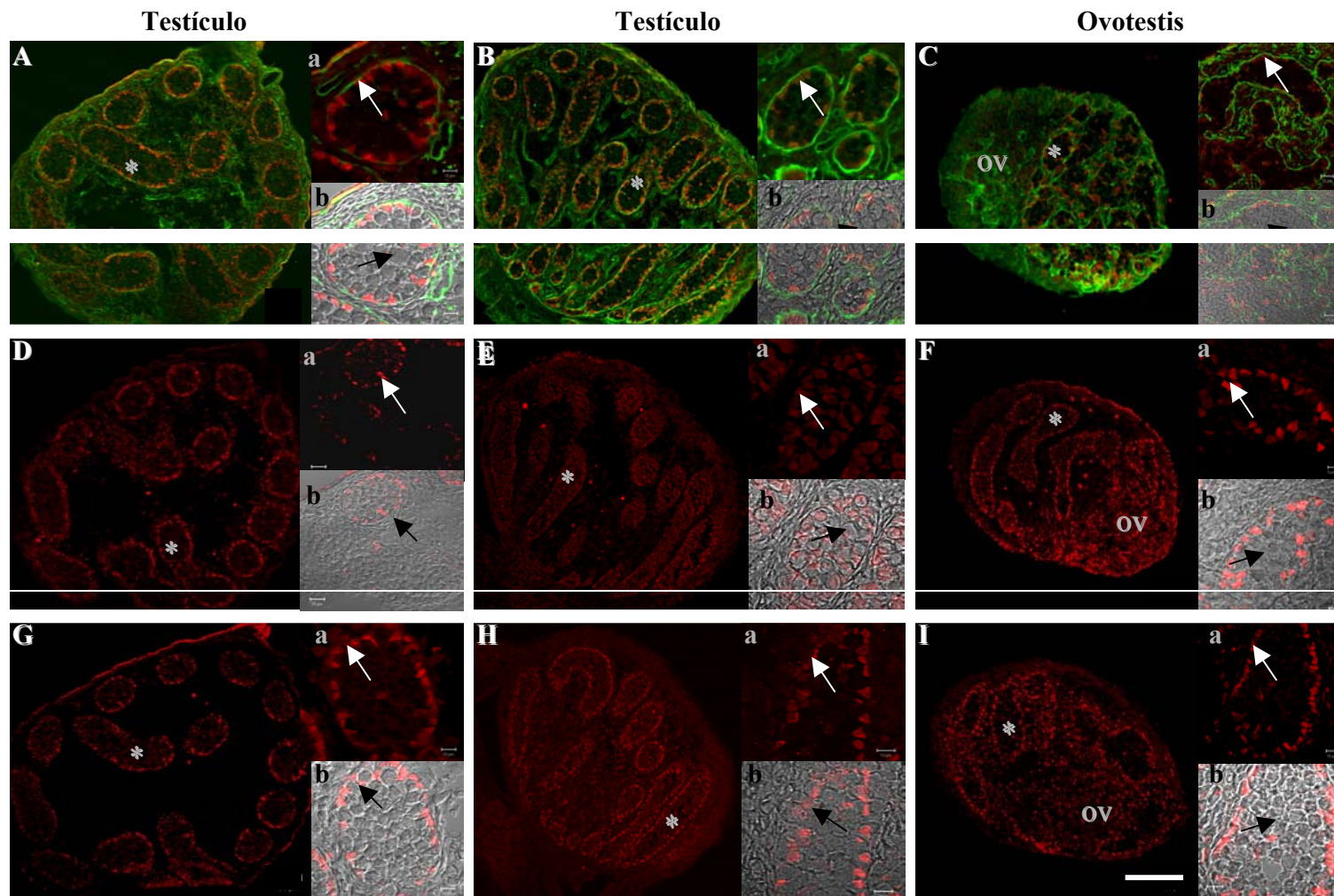


cordones se encuentran continuos con el epitelio celómico (Fig. 2B). En el caso de los ovarios B6 y XY^{tir} de 15 *dpc* no se observaron diferencias morfológicas. En ambos casos, se presenta una estructura compacta con gran abundancia de células germinales (CG) distribuidas en todo el órgano (Figs. 2C y 2D). En los testículos de 17 *dpc* de la cepa B6, la morfogénesis testicular es mas evidente, detectándose la fragmentación de los cordones debido a la gran invasión y proliferación de vasos sanguíneos (Fig. 2E). En el caso de los ovotestis de la misma edad, los cordones seminíferos se observan aún continuos con el epitelio celómico. En algunas regiones ya se detecta la separación de estos cordones con el epitelio celómico (Fig. 2F). El ovario B6 de 17 *dpc* no muestra muchos cambios con respecto al ovario de 15 *dpc*, aparece como una estructura compacta donde solo hay un cierto arreglo de la CG en cordones rodeados por tejido estromático (2G). En contraste, en el ovario XY^{tir}, el número de CG ha disminuido drásticamente observándose solo algunas de ellas en la región cortical (Fig. 2H). En testículos de ratones B6 de 1 *dpp* la fragmentación y por consiguiente el número de cordones seminíferos es mas evidente, así como, la separación de los mismos del epitelio celómico (Fig. 2I). En el ovotestis de 1 *dpp* ya es posible observar el desarrollo de los cordones seminíferos, los cuales en su mayoría están ya separados del epitelio por acción de células del estroma y vasos sanguíneos (Fig. 2J). Los ovarios B6 continúan con su desarrollo, y en 1 *dpp* son más evidentes los cordones ovígeros formados por células germinales en su mayoría y localizados hacia la corteza del ovario (Fig. 2K). En el ovario XY^{tir} de 1 *dpp* también están presentes los cordones ovígeros cercanos a la región cortical. Sin embargo, a diferencia del ovario XX B6, en la región medular se encuentran células picnóticas, características de muerte celular (Fig. 2L).

Figura 2. Análisis morfológico a nivel de microscopia de campo claro de testículos B6, ovotestis, ovarios B6 y ovarios XY^{tir}. (A) Testículo B6 de 15 *dpc*. Se observa la formación de los cordones seminíferos (cs) separados del epitelio celómico (*). (B) Ovotestis XY^{tir} de 15 *dpc*. Se observan también los cordones seminíferos (cs) bien delimitados en la región central, sin embargo, en la región cortical se observa una continuidad con el epitelio celómico (**) que se mantiene hasta los 17 *dpc* (E). En testículos B6 de 17 *dpc* (E) y 1 *dpp* (I) es mas evidente la formación de los cordones (cs) rodeados por tejido mesenquimático laxo (*) al igual que en el testículo XY^{tir} de 1 *dpp* (J). En el caso de la morfogénesis del ovario, a los 15 *dpc* tanto el ovario B6 (C) como el ovario XY^{tir} (D) presentan una morfología similar con gran abundancia de células germinales (flechas). Sin embargo, a los 17 *dpc* en el ovario XY^{tir} (H) el número de células germinales se ha reducido considerablemente y solo se observan algunas de ellas (flechas) comparado con el ovario B6 (G). En 1 *dpp*, en el ovario B6 (K) se observa la formación de cordones ováricos (ov) cercanos a la periferia del ovario. En el ovario XY^{tir} también se detectan cordones ováricos (ov), pero en la región central se observan células picnóticas (flechas). Barra = 100µm.

Figura 3

15



6.3 Localización inmunohistoquímica de la expresión de la proteína de los genes *GATA4*, *WT1* Y *SF1*.

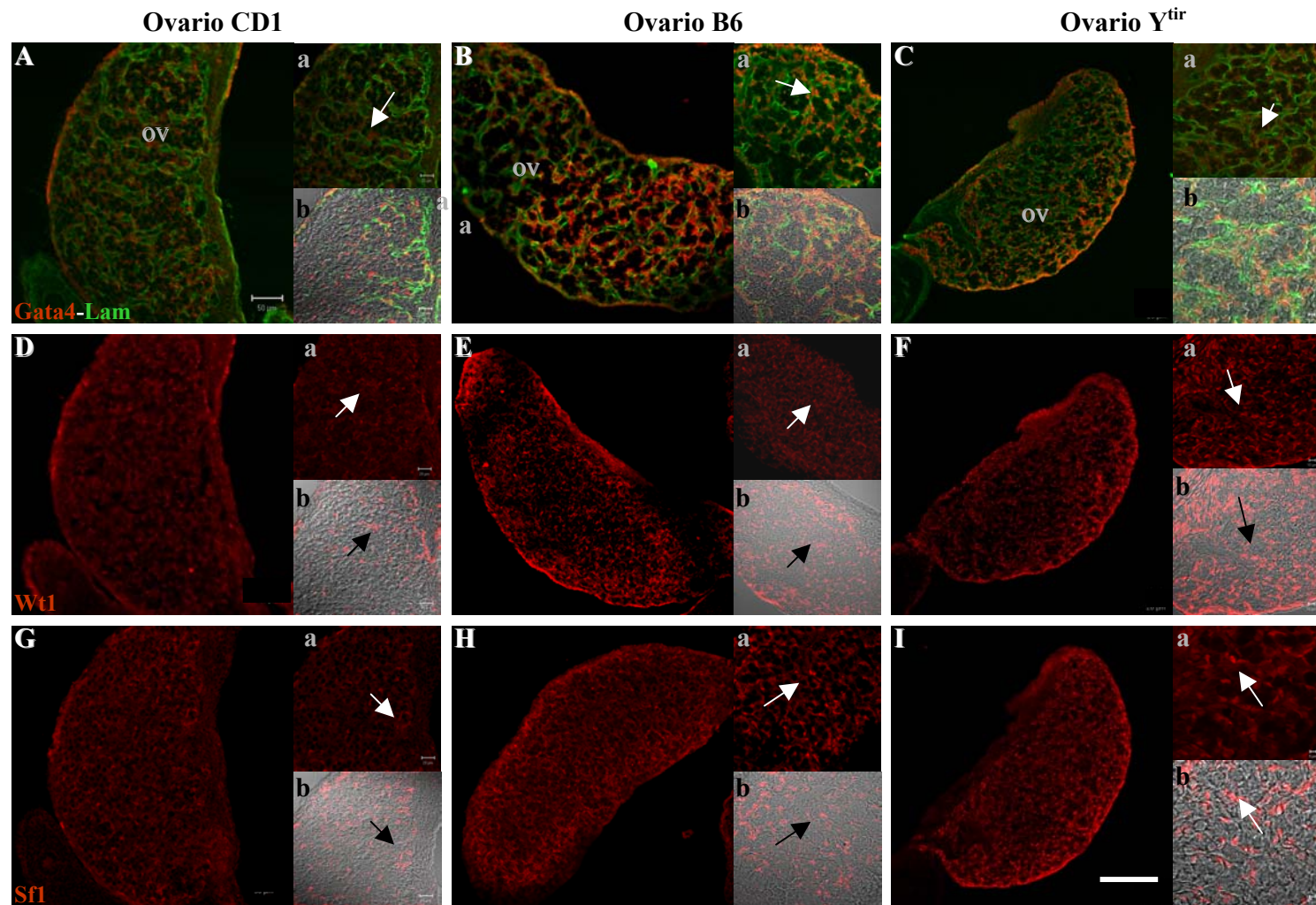
6.3.1 Expresión de las proteínas *GATA4*, *WT1* y *SF1* en testículos control (CD1 y B6), ovotestis y ovarios *XY^{tir}* de 15 días *post coitum* (*dpc*).

Durante el desarrollo gonadal normal, a los 15 *dpc* el testículo CD1 y B6 muestra una fragmentación de los cordones testiculares evidenciados por la presencia de laminina. Estos cordones se encuentran distribuidos en toda el área testicular y separados del epitelio celómico. La expresión de la proteína de *GATA4* en los machos de las cepas control CD1 y B6 se observó dentro de los cordones seminíferos específicamente en el núcleo de las células de Sertoli. Estas células se encuentran localizadas en la base de la lámina basal de los cordones rodeando a las células germinales (CG). Por fuera de los cordones, en el compartimiento estromático no se detectó señal de la proteína (Figs. 3A y 3B). En el caso de los ovotestis B6. *Y^{tir}* también se observa la presencia de cordones testiculares separados del epitelio celómico. Sin embargo, la detección con laminina hace evidente que estos cordones aún permanecen continuos y localizados solo en una región del ovotestis. Las células positivas a la proteína de *GATA4* se localizan en la base de estos cordones específicamente en la periferia de los mismos, lo que sugiere que estas corresponden a células de Sertoli que rodean a las CG formando los cordones seminíferos. Además del tejido testicular, también se observa una región positiva a laminina pero distribuida de manera irregular y en continuidad con el epitelio celómico. En esta región encontramos células positivas a *GATA4* localizadas de manera aleatoria y en menor número, comparada con la región testicular. Como se mencionó, en nuestra cepa B6.*Y^{tir}* cada ovotestis puede presentar

Figura 3. Inmunolocalización de la proteína de los genes *GATA4*/laminina (A-C), *WT1* (D-F) y *SF1* (G-I) en testículos CD1 (A, D y G), B6 (B, E y H) y ovotestis *XY^{tir}* (C, F e I) de 15 *dpc*. La expresión de la proteína de los tres genes se observa delimitando los cordones testiculares (*). A mayor amplificación, la señal se detecta específicamente en el núcleo de las células de Sertoli (flechas, recuadros a). En combinación con microscopía de Nomarski, se confirma la localización nuclear de la proteína en las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares formados también por células germinales (flechas, recuadros b). En los ovotestis *XY^{tir}*, el patrón de expresión de estos genes muestra un área con formación de cordones testiculares (*) adyacente a una región donde la distribución de las proteínas es aleatoria, lo que sugiere el desarrollo de una región ovárica (ov). Barra=100µm.

Figura 4

15 dpc



una distribución diferente de cada uno de los dos tejidos predominando uno en especial (Fig. 3C). El patrón de distribución y localización para las proteínas de los genes WT1 y SF1 en testículos CD1 (Fig. 3D y 3G) y B6 (Fig. 3E y 3H) se observó similar al detectado para el gen GATA4. Ambas proteínas están localizadas dentro de los cordones testiculares en el núcleo de las células de Sertoli, adyacentes a la lámina basal de los cordones. En los ovotestis, la expresión también fue evidente en las células de Sertoli de los cordones, mientras que en la región ovárica la distribución de los núcleos positivos a WT1 y SF1 aparecen de manera irregular (Figs 3F y 3I).

Por otro lado, en los ovarios de las cepas control (CD1 y B6), la inmunoreactividad con el anticuerpo anti-laminina evidencia la presencia de cordones ovígeros no fragmentados distribuidos en toda el área del ovario y en continuidad con el epitelio celómico. Las células positivas a las proteínas de GATA4 (Figs. 4A y 4B), WT1 (Figs. 4D y 4E) y SF1 (Figs. 4G y 4H) se localizan distribuidas en toda el área del ovario principalmente dentro de los cordones y adyacentes a la lamina basal rodeando a las células germinales primordiales (Figs. 4A y 4B). En el caso de los ovarios XY^{tir} se observa una distribución de laminina y de la proteína de los tres genes similar a la de los ovarios control, aunque los ovarios son mas pequeños (Figs. 4C, 4F y 4I).

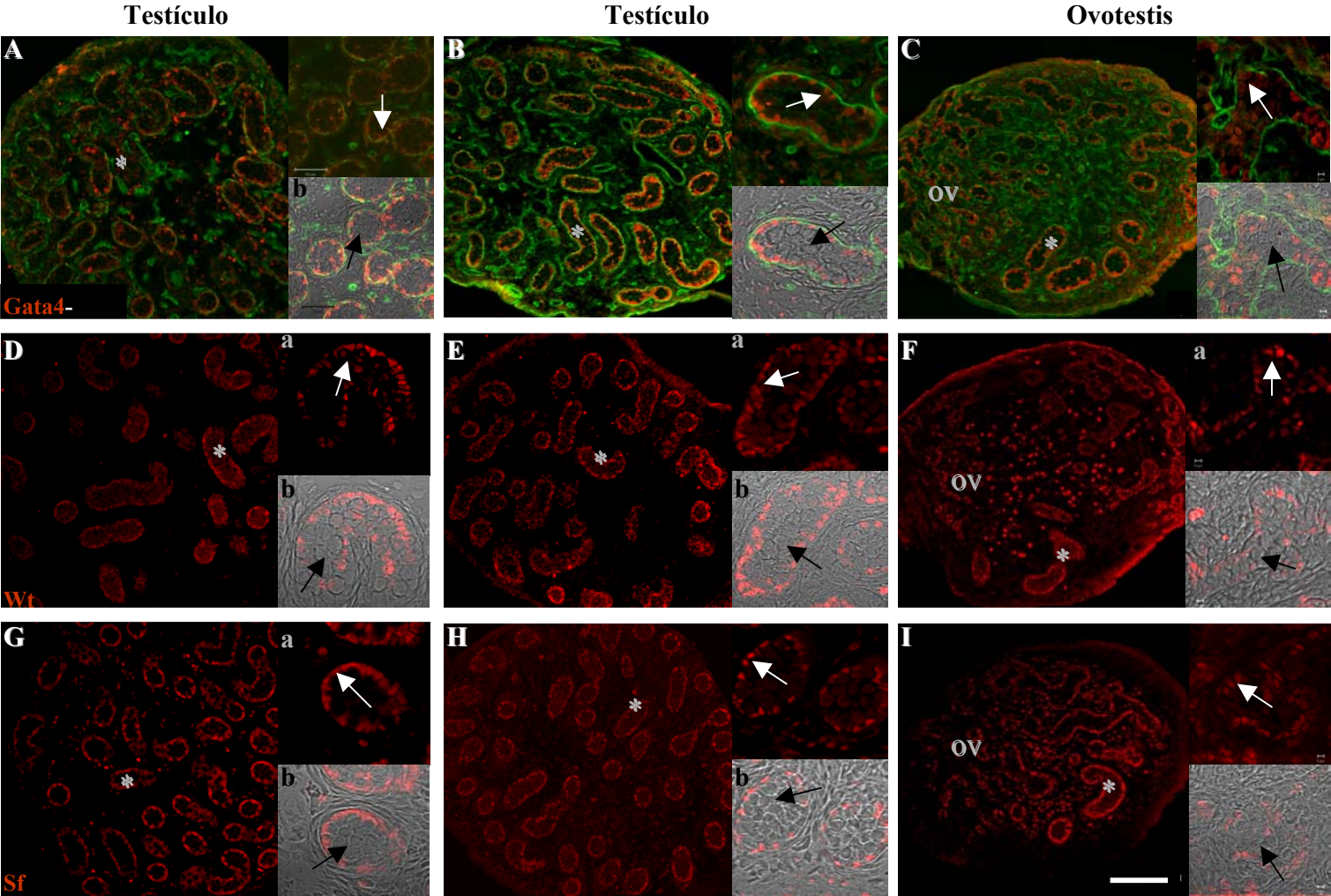
6.3.1 Expresión de las proteínas GATA-4, WT1 Y SF1 en testículos control (CD1 y B6), ovotestis y ovarios XY^{tir} de 17 días post coitum (dpc).

La distribución de laminina a lo largo de las laminas basales muestra que el desarrollo testicular normal, es decir la formación de los cordones testiculares y su fragmentación, es mas evidente a los 17 dpc (Figs. 5A y 5B). GATA4, WT1 y SF1 continúan expresándose en el núcleo de las células de Sertoli, las cuales se localizan en la periferia de los cordones y envuelven a las células germinales ahora denominadas

Figura 4. Inmunolocalización de la proteína de los genes GATA4/laminina (A-C), WT1 (D-F) y SF1 (G-I) en ovarios CD1 (A, D y G), B6 (B, E y H) y ovarios XY^{tir} (C, F e I) de 15 dpc. El patrón de distribución de laminina hace evidente el desarrollo de los cordones ováricos (ov). A mayor amplificación, la señal de Gata4 se detecta en núcleos de células dentro de los cordones en contacto con la membrana basal en las tres cepas (recuadros A ab, B ab y C ab; flechas). La expresión de WT1 y SF1 se detecta distribuida en todo el ovario (D – I). A mayor amplificación y en combinación con microscopia de Nomarski la señal es evidente en el núcleo de las células epiteliales (recuadros D a I ab; flechas). Barra=100µm.

Figura 5

17



espermatogonias. Esta distribución es similar en los testículos CD1 y B6. Sin embargo, GATA4 aparece mas específico en las células de Sertoli (Figs. 5A y 5B), mientras que en el caso de WT1 y SF1 ya se detectan algunas células con núcleos positivos a estas proteínas en el intersticio, es decir, en el compartimiento estromático que rodea a los cordones testiculares (Figs. 5D y 5E; 5G y 5H respectivamente).

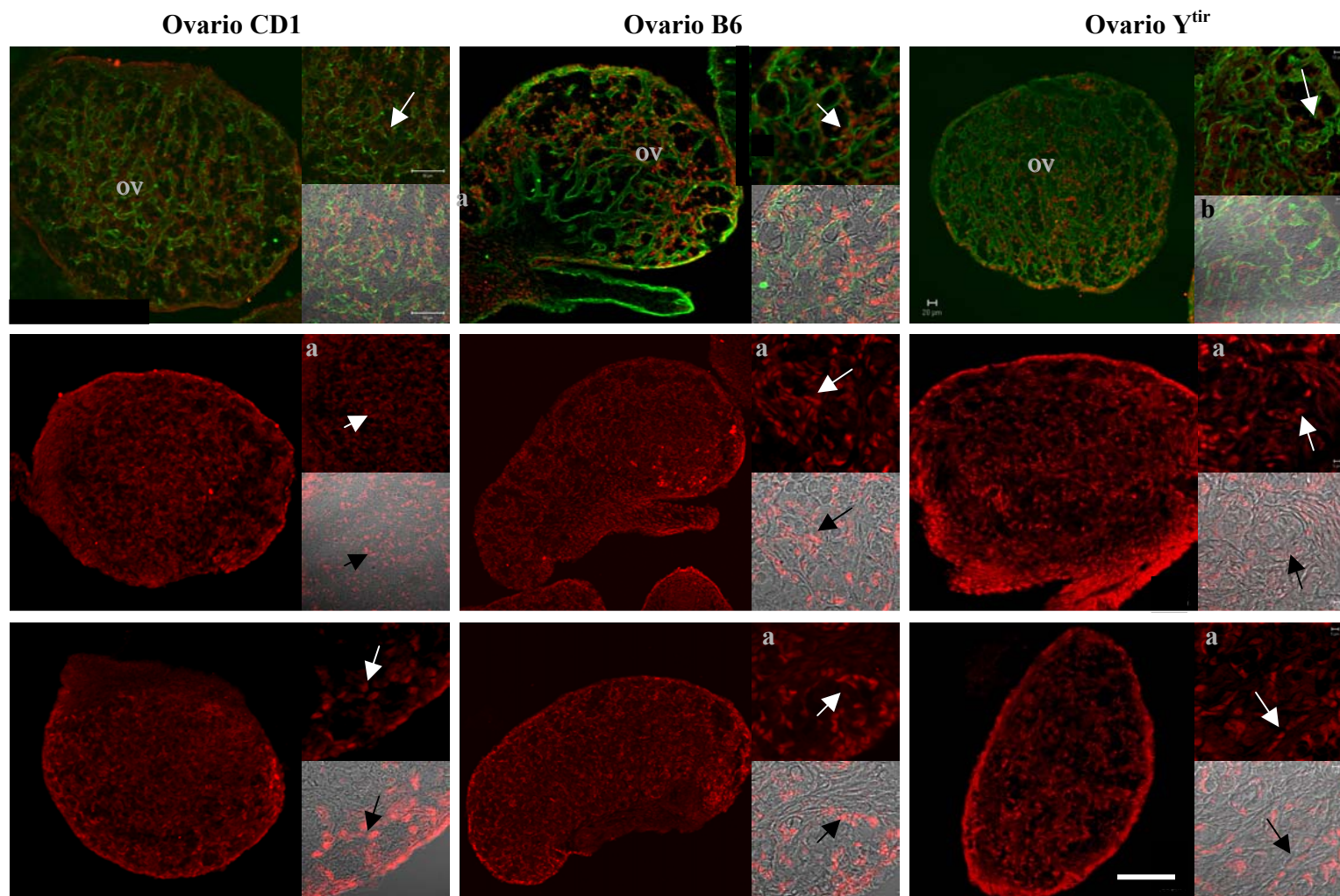
El análisis de la distribución de laminina en los ovotestis muestra que existen cordones testiculares fragmentados, pero éstos se encuentran en menor cantidad comparados con los encontrados en los testículos normales. Es evidente el patrón irregular de laminina en algunas regiones de los ovotestis, principalmente en la medula del tejido (Fig. 5C). GATA4 permanece específicamente expresado en el núcleo de las células de Sertoli dentro de los cordones rodeando a las espermatogonias, mientras que en el intersticio no se detecta señal (Fig. 5C). La expresión de la proteína para WT1 también se detecta en células de Sertoli de los pocos cordones formados, aunque también se observó en el tejido estromático. Sin embargo, la mayoría de las células del estroma están intensamente positivas, por lo que podrían corresponder a células apoptóticas (Fig. 5F). El mismo patrón se observa para la expresión de SF1, con la diferencia que las células positivas en el estroma si parecen corresponder a una señal específica, lo que sugiere que pueden ser células de Leydig (Fig. 5I).

En el caso de los ovarios de las tres cepas, el anticuerpo anti-laminina evidenció la formación de los cordones ovígeros que se distribuyen por todo el tejido y se encuentran en continuidad con el epitelio celómico (Figs. 6A, 6B y 6C). La distribución de núcleos positivos a GATA4 se detecta solo en células que se localizan dentro los cordones ováricos (Fig. 6A), mientras que la expresión de WT1 y SF1 es mas irregular observándose en algunas regiones dibujando a los cordones y en otras de manera aleatoria (Figs. 6F y 6I).

Figura 5. Expresión de la proteína de los genes GATA4/laminina (A-C), WT1 (D-F) y SF1 (G-I) en testículos CD1 (A, D y G), B6 (B, E y H) y ovotestis XY^{tir} (C, F e I) de 17 *dpc*. La expresión de la proteína de los tres genes se observa delimitando los cordones testiculares evidenciados por laminina (*). A mayor amplificación, la señal se detecta en el núcleo de las células de Sertoli (flechas, recuadros A a, B a y C a). En combinación con microscopia de Nomarski, se confirma la localización nuclear de estos genes en células de Sertoli dentro de los cordones testiculares envolviendo a las células germinales (flechas, recuadros A b, B b y C b). En los ovotestis XY^{tir}, el patrón de expresión de estos genes muestra tanto el desarrollo de cordones testiculares (*), como el desarrollo de una región ovárica (ov). Barra=100µm.

Figura 6

17



6.3.1 Expresión de las proteínas GATA-4, WT1 Y SF1 en testículos control (CD1 y B6), ovotestis y ovarios XY^{tr} de 1 día *post partum* (dpp).

La expresión de laminina en los testículos normales de las cepas CD1 (Fig. 7A) y B6 (Fig. 7B) hace evidente el avanzado desarrollo y fragmentación de los cordones testiculares que, prácticamente en su totalidad, han sido separados del epitelio celómico. La distribución de la proteína de laminina también se detecta en el compartimiento estromático delimitando a los vasos sanguíneos. La expresión de GATA4 se mantiene específicamente en el núcleo de las células de Sertoli localizadas en la periferia de los cordones testiculares y en contacto con las espermatogonias (Figs. 7A y 7B). La proteína de WT1 también se mantiene específicamente expresada en las células de Sertoli, delimitando a los cordones testiculares y no se observó expresión en células del estroma (Fig. 7D y 7E). En el caso de la expresión de SF1, se detecta tanto en células de Sertoli dentro de los cordones testiculares, como en el compartimiento estromático de los testículos (Figs. 7G y 7H).

La distribución de laminina en los ovotestis muestra claramente la presencia de dos compartimientos; uno donde existe formación de cordones testiculares fragmentados, y otro donde se observa una distribución irregular de la laminina, donde parece no se completa la morfogénesis testicular y se asemeja más el desarrollo de un ovario (Fig. 7C). En la región donde se forman los cordones testiculares, la expresión de GATA4 es evidente en las células de Sertoli que rodean a las espermatogonias. Sin embargo, se observaron algunos cordones cercanos a la región no diferenciada negativos a la proteína de GATA4. Algunos núcleos positivos a GATA4 se localizaron distribuidos en la periferia del ovotestis, en contacto con membranas basales evidenciadas por laminina (Fig. 7C). La expresión de la proteína para WT1 también se detectó en células de Sertoli de los

Figura 6. Inmunolocalización de la proteína de los genes GATA4/laminina (A-C), WT1 (D-F) y SF1 (G-I) en ovarios CD1 (A, D y G), B6 (B, E y H) y ovarios XY^{tr} (C, F e I) de 17 *dpc*. El patrón de expresión de laminina hace evidente la formación de los cordones ováricos (ov). A mayor amplificación, la señal de GATA4- se detecta en núcleos de células epiteliales dentro de los cordones ováricos en contacto con la membrana basal en las tres cepas (recuadros A ab, B ab y C ab; flechas). La distribución de WT1 y SF1 continúa detectándose de manera aleatoria en los tres tipos de ovarios (D – I). Sin embargo, a mayor amplificación y en combinación con microscopía de Nomarski la señal es evidente en el núcleo de las células epiteliales delimitando los cordones ováricos (recuadros D a I ab; flechas). Barra=100µm.

Figura 7

1

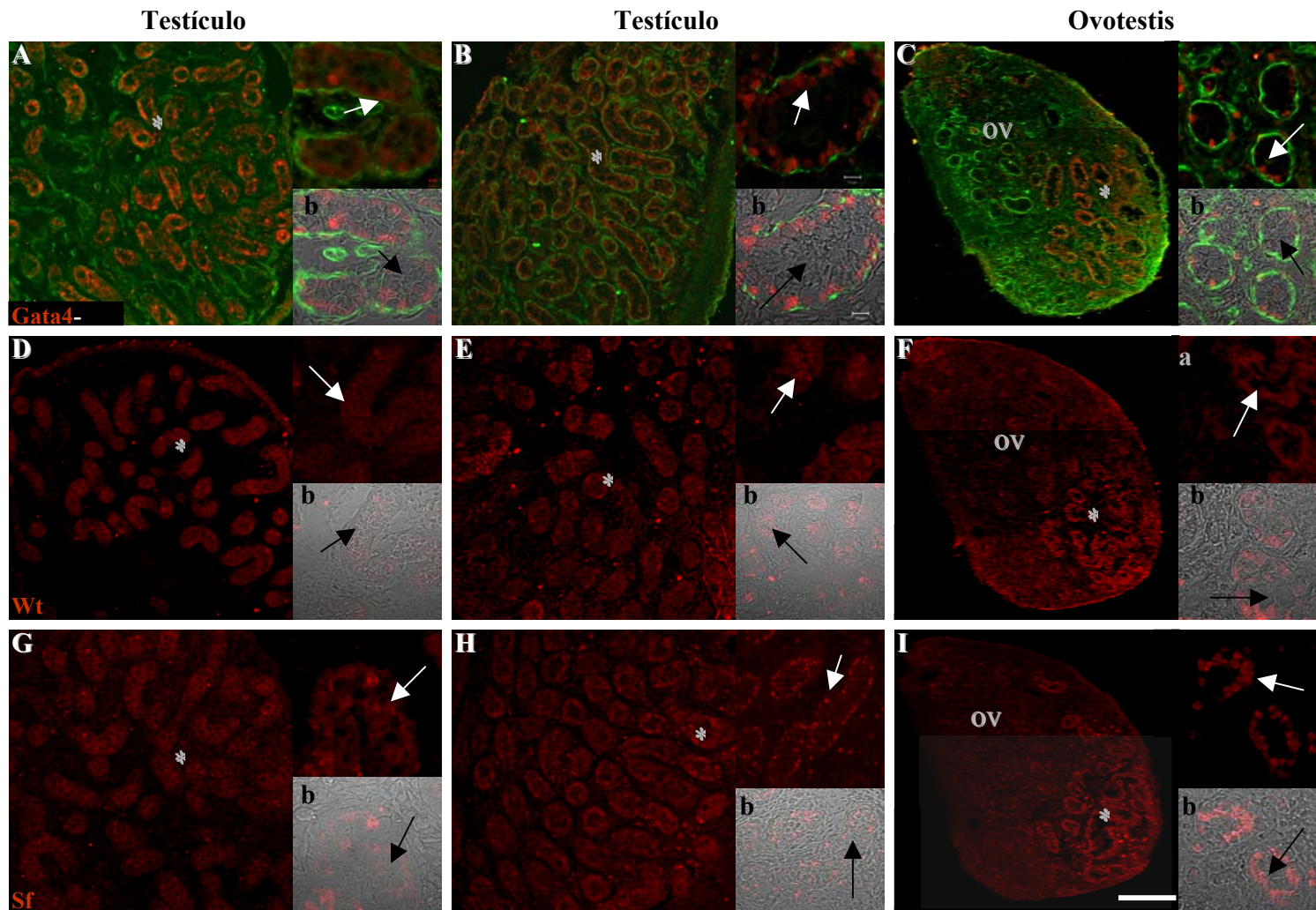
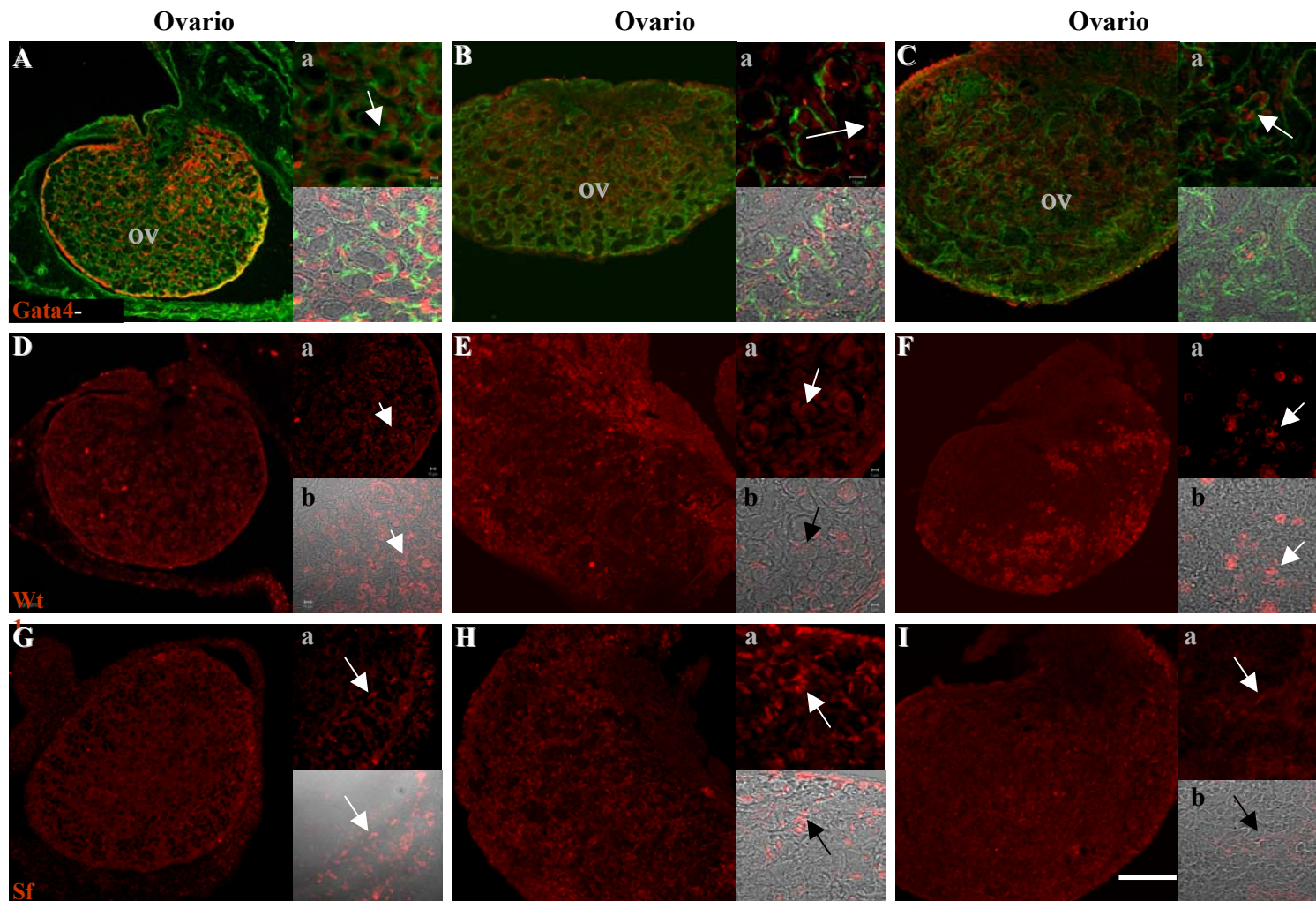


Figura 8

1



cordones que lograron desarrollarse, aunque también se observó en el tejido en la región ovárica del ovotestis, pero en menor cantidad (Fig. 7F). El mismo patrón se observa para la expresión de SF1, con la diferencia de que en la zona ovárica la detección de la proteína es menos evidente y solo se observan algunos núcleos positivos en la periferia del ovotestis (Fig. 7I).

El análisis del patrón de distribución de laminina en los ovarios de las tres cepas, muestra la formación de los cordones ovígeros que se distribuyen por todo el tejido y en continuidad con el epitelio celómico. Sin embargo, en los ovarios XY^{tir} (Fig. 8C) no se observa el inicio del proceso de foliculogénesis, como se detecta en los ovarios CD1 (Fig. 8A) y B6 (Fig. 8B), sobre todo en la periferia de los mismos. La distribución de núcleos positivos a GATA4 en las tres cepas, se detecta solo en células que se localizan dentro los cordones ováricos. WT1 y SF1 en los ovarios CD1 (Figs. 8D y 8E) y B6 (Figs. 8G y 8H) se mantienen en el núcleo de células epiteliales dentro de los cordones ováricos e interactuando con los ovocitos. Sin embargo, en los ovarios XY^{tir}, WT1 se observa solo en una región del ovario, revelando la falta de patrón de diferenciación ovárica (Fig. 8F), mientras que la expresión de SF1 es mas regular observándose en algunas regiones delimitando a los cordones ováricos y en otras de manera aleatoria (Fig. 8I).

Figura 7. Inmunohistoquímica de la expresión de la proteína de GATA4/laminina (A-C), WT1 (D-F) y SF1 (G-I) en testículos CD1 (A, D y G), B6 (B, E y H) y ovotestis XY^{tir} (C, F e I) de 1 *dpp*. La proteína de los tres genes se observa delimitando los cordones testiculares fragmentados (*). A mayor amplificación, la señal se detecta específicamente en el núcleo de las células de Sertoli (flechas, recuadros Aa – Ia). Con microscopia de Nomarski, se confirma la localización nuclear de la proteína en las células de Sertoli que forman los cordones testiculares junto con las células germinales (flechas, recuadros Ab-Ib). Con respecto a los ovotestis XY^{tir}, el patrón de expresión de estos genes muestra un área con formación de cordones testiculares (*) en continuidad con una región ovárica (ov) donde la distribución de las proteínas es débil. Barra=100µm.

Figura 8. Inmunohistoquímica de la expresión de la proteína de GATA4/laminina (A-C), WT1 (D-F) y SF1 (G-I) en ovarios CD1 (A, D y G), B6 (B, E y H) y ovarios XY^{tir} (C, F e I) de 1 *dpp*. La expresión de la proteína de los tres genes se observa delimitando los cordones ováricos (ov). A mayor amplificación, la señal de GATA4 se detecta específicamente en el núcleo de las células epiteliales adyacentes a la lamina basal (flechas, recuadros Aa, Ba y Ca). Con microscopia de Nomarski, se confirma la localización nuclear de la proteína en las células epiteliales que forman los cordones junto con las células germinales (flechas, recuadros Ab, Bb y Cb). La distribución de WT1 y SF1 continúa detectándose de manera aleatoria y débil en los tres tipos de ovarios (D – I). Sin embargo, a mayor amplificación y en combinación con microscopia de Nomarski la señal es evidente en el núcleo de las células epiteliales delimitando los cordones ováricos (recuadros D a I ab; flechas). Barra=100µm.

6.4 Cuantificación por RT-PCR de los niveles de transcritos de los genes GATA4, SF1 y WT1 en testículos, ovotestis y ovarios XY^{tir}.

Se estudio la expresión de los niveles de transcritos de los genes GATA4, SF1 y WT1 en testículos y ovarios provenientes de las cepas CD1 y C57(B6), así como, en ovotestis y ovarios XY de la cepa B6.Y^{tir} de 15dpc, 17 dpc y 1 dpp. A continuación se muestra el análisis de los resultados de la expresión de estos genes obtenidos por RT-PCR y analizados semicuantitativamente por densitometría.

6.4.1 Expresión de GATA4, SF1 y WT1 a los 15 días *post coitum*

GATA4

En la figura 9A se observan la banda del fragmento amplificado de GATA4 el cual presenta una intensidad homogénea en todas las muestras. El análisis estadístico (figura 9a) no mostró diferencias significativas en ninguno de los casos. Sin embargo, podemos observar una expresión dimórfica del gen GATA4 pues aunque se expresa en ambos sexos, los testículos de las cepas CD1 y B6 así como los ovotestis mostraron niveles de expresión ligeramente menores a los de los ovarios de cada una de las cepas.

SF1

En la figura 9B se observa una mayor intensidad de las bandas del fragmento amplificado de SF1 en el caso de los testículos CD1 y B6, mientras que en los ovarios de las mismas cepas control, así como el ovario XY^{tir}, la intensidad de las bandas es ligeramente menor. Contrariamente en la figura 9b se muestra el patrón de expresión de los transcritos, que se ven aumentados en los ovarios B6, seguido por los ovarios CD1 y los ovotestis, ligeramente por debajo de ellos, con niveles muy similares, encontramos a los testículos control (CD1 y B6) y la hembra XY^{tir}, sin embargo, aunque los niveles de expresión del gen SF1, en los ovarios B6 parecen aumentados, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas al comparar las muestras.

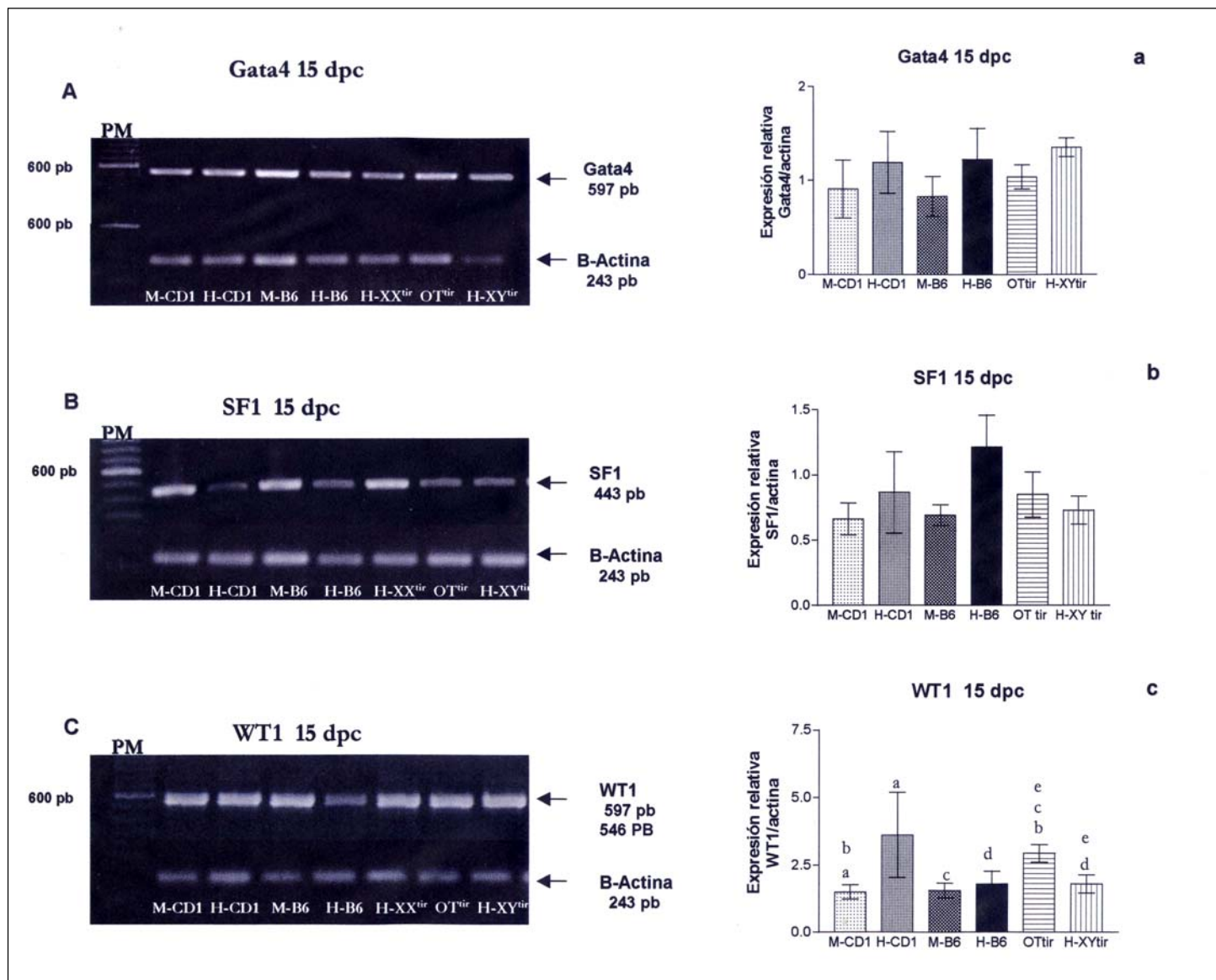


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del RT-PCR para GATA4 (A), SF1 (B) y WT1 (C) a los 15 dpc. En los carriles se muestran las bandas obtenidas de un par de gónadas provenientes de macho CD1 (M-CD1), hembra CD1 (H-CD1), macho B6 (M-B6), hembra B6 (H-B6), ovotestis XY^{tir} (OT^{tir}) y hembra XY^{tir} (H-XY^{tir}). Carril PM: marcador de peso molecular (100 pb). Las figuras muestran un experimento representativo.

Perfiles de expresión de los genes GATA4 (a), SF1 (b) y WT1 (c). En las gráficas se muestran los niveles de transcritos en gónadas de las diferentes cepas, y su expresión relativa con respecto a β -actina. Diferencias estadísticamente significativas se encontraron solo en los niveles de expresión de WT1 entre M-CD1 - H-CD1 (a), M-CD1 - OT^{tir} (b), M-B6-OT^{tir} (c), H-B6-OT^{tir} (d) y OT^{tir}-H-XY^{tir} (e). Se muestran los valores calculados \pm ESM. $P \leq 0.05$.

WT1

Recordando que para WT1 se presentan 2 bandas de 597 y 546 pb, que debido a su proximidad se manejaron estadísticamente como una sola:

En la figura 9C observamos bandas de intensidad homogénea en la mayoría de las muestras, sin embargo podemos ver claramente que en los ovarios B6 esta intensidad es menor. En la figura 9c se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre:

testículos y los ovarios CD1 (a)

testículos CD1 y los ovotestis (b)

testículos B6 y los ovotestis, (c)

ovarios B6 y los ovotestis (d)

ovotestis y los ovarios XY^{tir} (e)

6.4.2 Expresión de GATA4, SF1 y WT1 a los 17 días *post coitum*

GATA4

En la figura 10A se puede observar que los niveles de expresión de los transcritos de GATA4 se ven aumentados en los testículos con respecto a los ovarios controles, sin embargo, como también esta aumentada la cantidad de β - actina nos indica que pusimos mayor cantidad de RNAm. Al corregir con β - actina observamos en la gráfica 10a, en el caso de los testículos control, los niveles de los transcritos son mantenidos. Mientras que en los ovarios CD1 y

B6 los niveles de expresión de transcritos de este gen se ven disminuidos en esta edad; en los ovotestis, podemos observar que de los 15 a los 17 dpc, los niveles de expresión de los transcritos se encuentran aumentados, sin embargo, al realizar el análisis estadístico no encontramos diferencias significativas.

SF1

Como se puede ver en la figura 10B la intensidad de las bandas de los niveles de expresión del gen SF1 se ven muy similares tanto en los testículos y ovarios control como en los ovotestis y en los ovarios XY^{tir}. En la gráfica 10b se puede observar que en los niveles de los transcritos, no se encontraron diferencias significativas, aunque se observa un mayor nivel de expresión en los ovarios XY^{tir}.

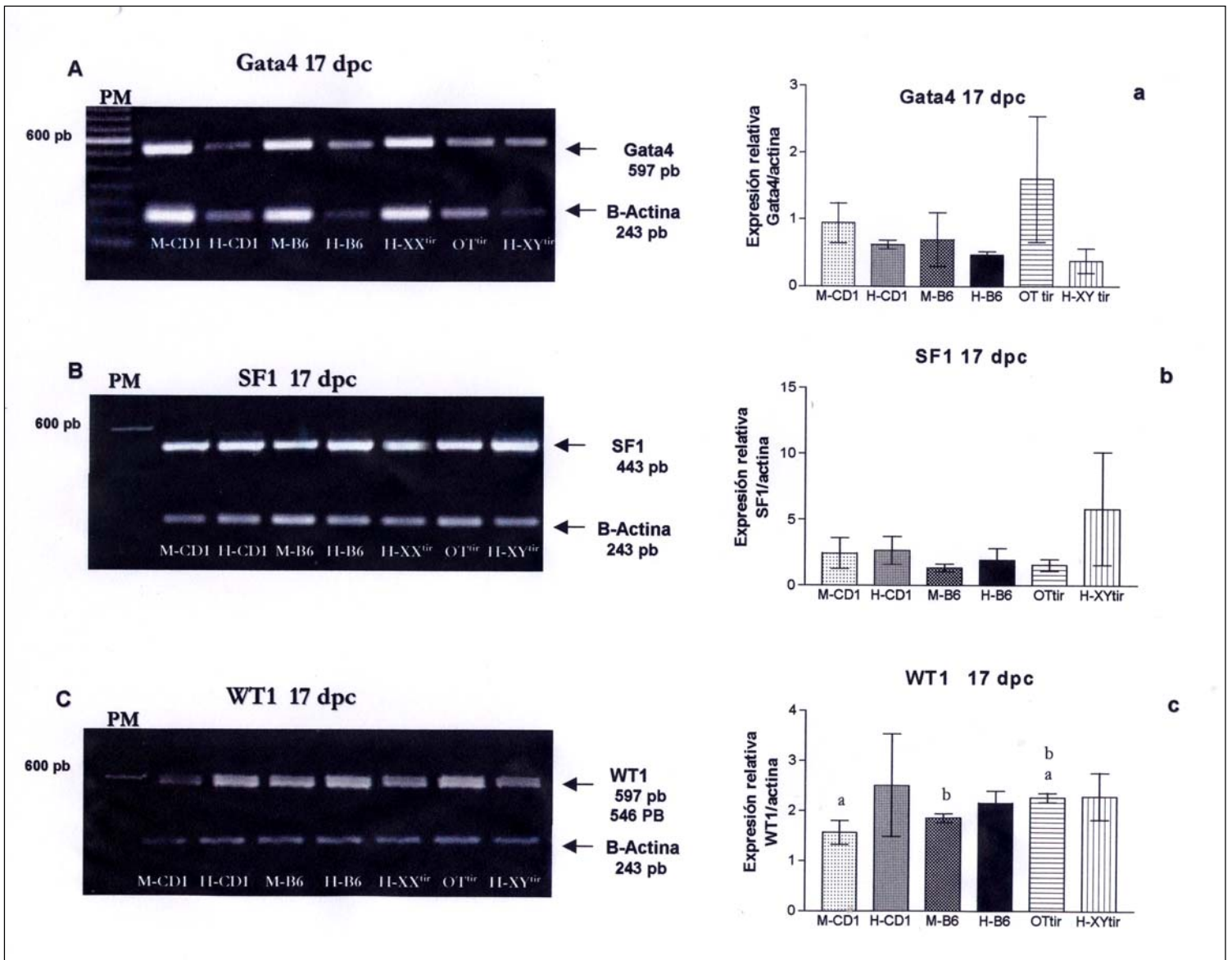


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa del RT-PCR: GATA4 (A), SF1 (B) y WT1 (C); el carril PM corresponde al marcador de peso molecular (100 pb); en los siguientes carriles se encuentran las muestras: macho CD1 (M-CD1), hembra CD1 (H-CD1), macho B6 (M-B6), hembra B6 (H-B6), ovotestis XY^{tir} (OT^{tir}) y la hembra XY^{tir} (H-XY^{tir}). Patrón de expresión de los genes GATA4 (a), SF1 (b) y WT1 (c). A los 17 dpc encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen WT1 (c) entre: M-CD1-OT^{tir} (a) y M-B6-OT^{tir} (b). Los resultados están expresados como la media \pm ESM $P \leq 0.05$.

WT1

En el gel de la figura 10C se observan niveles de expresión aparentemente similares en todas las muestras a excepción, de los testículos CD1, en los que se observa una banda de menor intensidad. En la figura 10c el análisis estadístico mostró diferencias en los niveles de expresión entre los testículos CD1 y los ovotestis así como entre los testículos B6; en ambos casos los ovotestis presentaron mayores niveles de expresión.

6.4.3 Expresión de GATA4, SF1 y WT1 en 1 día post partum

GATA4

En la figura 11A observamos que los niveles de expresión de GATA4 a 1 dpp en cuanto a la intensidad de las bandas se mantienen los niveles de expresión en los testículos CD1 y en los ovotestis, y menor intensidad en las demás muestras. Al realizar el análisis estadístico figura 11a encontramos diferencias significativas entre los ovarios CD1 y ovarios B6; además entre los ovarios B6 y los ovotestis, en ambos casos las hembra B6 presentaron niveles de expresión mayores. Finalmente encontramos diferencias significativas entre los ovotestis y los ovarios XY^{tir} debido a que las hembras XY^{tir} presenta mayores niveles de expresión de este gen.

SF1

En el gel de la figura 11B observamos que los niveles de expresión son casi semejantes en todas las muestras, a excepción de los testículos B6 donde se observa una banda de menor intensidad. Al realizar el análisis estadístico (figura 11b) no encontramos diferencias estadísticamente significativas; en los niveles de los transcritos de SF1 a esta edad, manteniendo niveles de expresión relativos alrededor de 1.

WT1

En el gel de la figura 11C se observó una intensidad de las bandas homogéneas en casi todas las muestras. En la gráfica 11c se vio una expresión relativa de los transcritos de WT1, muy similar en casi todas las muestras a excepción de los ovarios control B6, que presentan niveles de expresión ligeramente mayores en todos los casos, aunque este aumento no es estadísticamente significativo.

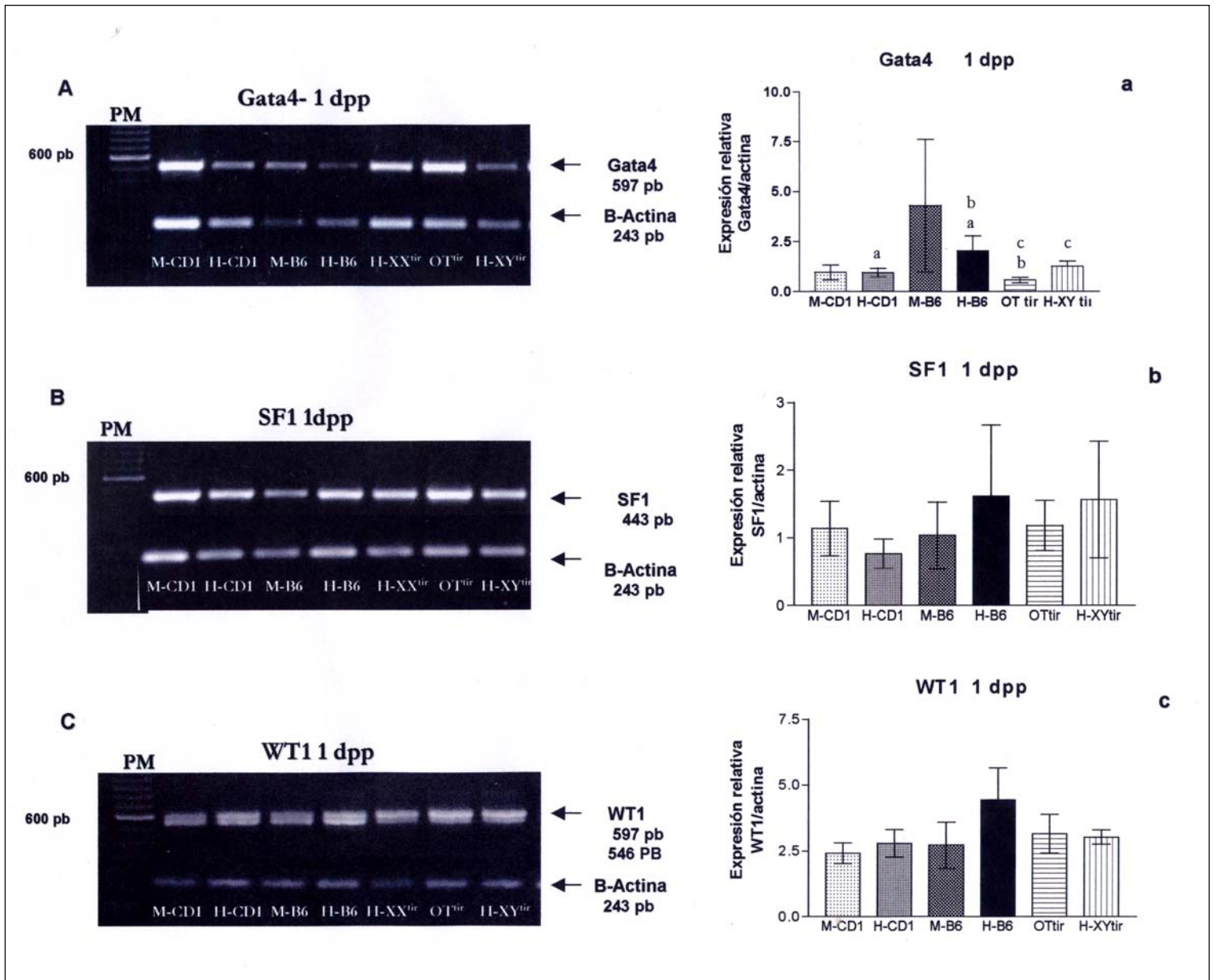


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del RT-PCR: GATA4 (A), SF1 (B) y WT1 (C); el carril PM corresponde al marcador de peso molecular (100 pb); en los siguientes carriles se encuentran las muestras: macho CD1 (M-CD1), hembra CD1 (H-CD1), macho B6 (M-B6), hembra B6 (H-B6), ovotestis XY^{tr} (OT^{tr}) y la hembra XY^{tr} (H-XY^{tr}). Patrón de expresión de los genes GATA4 (a), SF1 (b) y WT1 (c). A 1 dpp encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen GATA4 (a) entre: H-CD1 – H-B6 (a), H-B6 - OT^{tr} (b) y OT^{tr}-H-XY^{tr} (c). Los resultados son expresados como la media \pm ESM. $P \leq 0.05$.

6.4.4 Correlación de los niveles de expresión de GATA4, SF1 y WT1 entre las tres edades y diferenciación gonadal.

GATA4

A los 15 dpc los ovarios control y los ovarios XY^{tir} presentaron niveles de transcritos ligeramente mayores que los testículos control y los ovotestis con una expresión relativa alrededor de 1. Sin embargo, a los 17 dpc los testículos control mantienen esta expresión relativa de 1; mientras que en los ovarios CD1, B6 y XY^{tir} se observa una disminución en los niveles de los transcritos comparándolos con los 15 dpc. En 1 dpp los niveles de expresión se observan ligeramente mayores por arriba de 1, sin embargo se ve una disminución en los niveles de expresión en los ovotestis. Los testículos y ovarios B6 muestran un aumento significativo en los niveles de expresión.

SF1

A los 15 dpc los niveles de expresión relativa son cercanos a 1, en todas las muestras, mientras que para 1 dpp los niveles de expresión relativa de SF1 se encuentran por arriba de 1 en la mayoría; sin embargo a los 17 dpc se observa que los niveles de expresión relativa aumentan siendo más evidente este incremento en los ovarios XY^{tir}. Lo que sugiere que a los 17 dpc se presenta la mayor expresión de SF1.

WT1

En todas las edades la expresión relativa de WT1 se mantiene alrededor de 2.5, sin embargo a los 15 y 17 dpc los ovotestis presentaron mayores niveles de expresión con respecto a los testículos de las cepas CD1 y B6.

6.5 Secuenciación de WT1

Debido a que en nuestros geles se observaron dos bandas para la amplificación de WT1, se llevo a cabo la purificación de estas bandas con el fin de conocer su identidad. Se ha reportado el splicing alternativo 1 para WT1 (Haber et al 1991; Gene Bank: M55512), el cual se encuentra dentro de la región amplificada por nuestro par de oligonucleótidos. Para demostrar que las dos bandas obtenidas correspondían a WT1, reportado por Haber (1991), estas bandas se secuenciaron con el fin de comparar la homología entre ellas. Observamos que efectivamente se llevo a cabo el splicing

alternativo 1 en el nucleótido 238 al 288, previamente reportado, encontrando dos bandas con diferente peso molecular. La primera de ellas peso 597 pb la cual es la secuencia que abarca los primers que diseñamos que van del nucleótido 986 al nucleótido 1583, hay que recordar que esta secuencia completa contiene al splicing alternativo 1; sin embargo la segunda banda la cual denominamos WT1-B tiene un peso molecular de 546 pb en la cual si se lleva a cabo el splicing alternativo 1 de WT1. Este splicing alternativo 1, no es más que la pérdida de 51 nucleótidos motivo por el cual su tamaño es menor que el de WT1-A. La región del splicing alternativo 1 va del nucleótido 1224 al 1274.

En la figura de WT1(B) 546 pb, el fragmento secuenciado, del splicing alternativo 1, se da en el nucleótido 238 de la presente secuencia, en esta secuencia se muestra la pérdida de 51 nucleótidos lo cual coincide con lo reportado previamente (Haber et al 1991).

En esta parte se muestra la identidad del fragmento obtenido por RT-PCR para el gen WT1 546 pb; el cual se comprobó por medio de secuenciación:

WT1 (B)546 pb

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
CAG GGC TCG CTG GGC GAG CAG CAG TAC TCC GTG CCA CCT CCG GTG TAT GGC TGC CAC ACC
Q G S L G E Q Q Y S V P P P V Y G C H T

          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
CCT ACT GAC AGT TGC ACA GGC AGC CAG GCC CTG CTC CTG AGG ACG CCC TAC AGC AGT GAC
P T D S C T G S Q A L L L R T P Y S S D

          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
AAT TTA TAC CAA ATG ACC TCC CAG CTT GAA TGC ATG ACC TGG AAT CAG ATG AAC CTA GGA
N L Y Q M T S Q L E C M T W N Q M N L G

          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
GCT ACC TTA AAG GGC CAC GGN ACA GGG TAT GAG AGT GAG AAC CAC ACG GCC CCC ATC CTC TGT
A T L K G H G I G Y E S E N H T A P I L C
T

          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
GGT GCC CAG TAC AGA ATA CAC ACC CAC GGG GTC TTC CGA GGC ATT CAG GAT GTG CGG CGT GTT
G A Q Y R I H T H G V F R G I Q D V R R V

          310     320     330     340     350
          |      |      |      |      |
TCT GGA GTG GCC CCA ACT CTT GTC CGG TCA GCA TCT GAA ACC AGT GAG AAA CG
S G V A P T L V R S A S E T S E K

```

Esto corrobora la identidad del fragmento como parte del gen de WT1, donde se lleva a cabo el splicing 1. Se muestra solamente la región más legible del fragmento secuenciado.

Se muestra a continuación la secuencia obtenida del fragmento de RT-PCR purificado del gen WT1 597 pb:

WT1 (A)597 pb

```
      10      20      30      40      50      60
      |      |      |      |      |      |
CAG CAG GGC TCG CTG GGC GAG CAG CAG TAC TCC GTG CCA CCT CCG GTG TAT GGC TGC CAC
Q Q G S L G E Q Q Y S V P P P V Y G C H

      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
ACC CCT ACT GAC AGT TGC ACA GGC AGC CAG GCC CTG CTC CTG AGG ACG CCC TAC AGC AGT
T P T D S C T G S Q A L L L R T P Y S S

      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
GAC AAT TTA TAC CAA ATG ACC TCC CAG CTT GAA TGC ATG ACC TGG AAT CAG ATG AAC CTA
D N L Y Q M T S Q L E C M T W N Q M N L

      190     200     210
      |      |      |
GGA GCT ACC TTA AAG GGA ATG GGT GCT GGG
G A T L K G M G A G
```

En esta secuencia se corrobora la identidad del fragmento de WT1(A), en el cual, no se lleva a cabo el splicing alternativo 1. A partir de esta secuencia se diseñaron el par de oligonucleótidos para este gen. Solo se muestra la región más legible del fragmento secuenciado.

7. DISCUSION

En el presente estudio, la presencia o ausencia del cromosoma Y^{tir} se determinó empleando la técnica de PCR amplificando una región del gen Zfy , exclusiva del cromosoma Y (Nagamine et al 1989). De esta manera corroboramos que cuando machos $B6.Y^{tir}$ son cruzados con hembras C57 (B6), la mitad de la progenie XY desarrolla ovarios bilaterales con genitales internos y externos femeninos; mientras que la otra mitad desarrolla ovotestis con componentes testiculares en la región medular y desarrollo ovárico en la corteza de la gónada. El desarrollo de ovotestis se presenta de manera bilateral, y en algunos individuos conforme avanza el desarrollo una de las gónadas puede establecerse como testículo y la otra como ovario. De tal manera que la reversión sexual encontrada en nuestra cepa se sigue presentando y las anomalías descritas son consistentes con las reportadas previamente (Eicher y Washburn, 1983; Taketo et al 1989).

El estudio del desarrollo de las gónadas a nivel de campo claro, evidenció que el desarrollo de cordones testiculares en las gónadas B6 con respecto a las gónadas CD1 se lleva a cabo de forma similar; ya que en las tres edades analizadas se observa la formación de los cordones, que conforme avanza la edad se encuentran más separados del epitelio celómico, debido a la abundancia de vasos sanguíneos y células mesenquimáticas que los rodean. Sin embargo, en el caso de los ovotestis $B6.Y^{tir}$ la separación entre los cordones y el epitelio celómico solo se observa en la región medular mientras que en la corteza los cordones están aún continuos con el epitelio celómico; en estas regiones se observan células germinales en meiosis evidenciadas por la presencia de complejos sinaptonémicos característicos del tejido ovárico (datos no mostrados). Finalmente al término del desarrollo fetal el tejido medular prevalece sobre el tejido cortical, originando testículos pequeños pero funcionales.

Al comparar los ovarios XY^{tir} con los ovarios control B6 y CD1, se observa que el desarrollo morfológico es similar, ya que presentan una estructura compacta con gran cantidad de células germinales distribuidas en todo el ovario; conforme avanza la edad el número de células germinales disminuye en los ovarios XY^{tir} , donde se observan células picnóticas características de muerte celular en la región medular de estos ovarios. Estudios realizados por Taketo y col (1989) propusieron que la causa de la esterilidad de

las hembras XY^{tir} se debía a una muerte masiva de ovocitos entre los 16 y 18 dpc; sin embargo, en trabajos realizados previamente en el laboratorio demostramos que esta muerte masiva también se lleva a cabo en la región medular de ovarios XX, lo que nos hizo suponer que esta muerte celular en etapas fetales es un proceso natural que no afecta el pool de folículos primarios al inicio de la pubertad (Morales et al 2004).

Se ha sugerido que cuando el cromosoma Y^{tir} es introducido al genoma de la cepa B6, el inicio y progreso de la diferenciación testicular está retrazada en varios grados. De tal manera que, el retraso más allá de un punto crítico entre los 13 y 14 dpc permite la iniciación de la diferenciación ovárica (Taketo et al 1991). Sin embargo, el análisis de factores relacionados con la determinación y diferenciación sexual normal ha sido poco estudiado en el ratón B6.Y^{tir}. Se ha observado que la sustancia inhibidora de Muller (MIS) y la enzima 3 β -HSD no se expresan en los ovarios XY^{tir} (Lee y Taketo 1994). En un estudio reciente se observó que el gen Sox9 se expresa en todas las gónadas que acarrean el cromosoma Y^{tir} hasta los 12.5 dpc. Posteriormente, a partir de los 13 dpc, este gen es regulado negativamente en ambas gónadas en las hembras XX, o solo en una de ellas, en el ovario del hermafrodita XY^{tir}, lo que sugiere que al ser apagado Sox9 el desarrollo gonadal es dirigido hacia ovario independientemente del sexo cromosómico, y de la presencia del gen Sry, y por consiguiente MIS y la 3 β -HSD no pueden iniciar su expresión al ser Sox9 el gen promotor de MIS (Moreno et al 2003). En ratones, la diferenciación de las células de Sertoli se establece cuando se inicia la expresión de MIS alrededor del día 13 post coitum se continua hasta la vida adulta (Münsterberg et al 1991). Los genes Sox9, SF1, WT1 y GATA4 han sido implicados en la regulación del promotor de MIS. Arango et al (1999) mostraron la importancia de sitios de unión de Sox9 y SF1 en la regulación positiva del promotor de MIS in vivo. Por otro lado, Nachtigal et al (1998) reportaron que SF1 y WT1 sinérgicamente activan el promotor de MIS in vitro. Por lo tanto, la propuesta del presente trabajo fue que la reversión sexual en el ratón B6.Y^{tir} puede deberse también a una alteración en el patrón de expresión de los genes SF1, WT1 y GATA4, que en ausencia del gen Sox9, no promueven la diferenciación de las células de Sertoli, y por consiguiente no dirigirán la diferenciación morfológica del testículo.

Las proteínas de unión GATA son una familia de factores de transcripción con dedos de zinc que regulan la expresión de genes y la diferenciación y proliferación celular (Ketola et

al 1999). Aunque el papel exacto que juegan las proteínas GATA en el desarrollo gonadal no ha sido bien establecido, se sabe que GATA4 parece ser el único miembro de la familia GATA que esta presente en las células somáticas de la cresta genital (Viger et al 1998). Estudios realizados en ratones muestran que este factor se expresa en las células somáticas de la gónada en etapa indiferenciada (11.5 dpc) en ambos sexos. En el inicio del dimorfismo sexual de la gónada, la expresión de GATA4 se empieza a detectar de manera dimórfica: en gónadas XY la expresión es sobre regulada en las células de Sertoli y regulada negativamente en las células intersticiales, mientras que en las gónadas XX, la expresión es regulada negativamente en todas las células. La expresión de GATA4 persiste en las células somáticas del testículo postnatal y es reactivada en el ovario adulto con predominio en las células de la granulosa (Heikinheimo et al 1997).

En nuestro estudio, la expresión de la proteína de GATA4 en los testículos controles (CD1 y B6) se observó de manera similar a lo reportado previamente, es decir, la proteína se localizó dentro de los cordones testiculares específicamente en el núcleo de las células de Sertoli, no se detectó señal en las células germinales y células del estroma (Holly et al 2003; Viger et al 1998; Tevosian, et al 2002). En el caso de los ovotestis, el patrón de expresión de la proteína de GATA4 nos muestra claramente la diferenciación de un compartimiento testicular y una región ovárica en el mismo órgano. En la región medular, la proteína está localizada en el núcleo de las células de Sertoli adyacentes a la membrana basal que forman los cordones testiculares, mientras que en la región ovárica el número de células positivas a GATA4 es considerablemente menor. Este hecho podría estar relacionado directamente con la expresión del gen Sox9, donde se ha establecido que en la región cortical de los ovotestis dicho gen es regulado negativamente y el número de células que no lo expresan se incrementa conforme se avanza hacia el epitelio de la gónada. De tal manera que Sox9 podría estar regulando positivamente la expresión de GATA4 en una ola de expresión medulo-cortical; que en el caso de los ovotestis solo se expresa en la región medular (Moreno et al 2003).

Tanto en los ovarios controles como en los ovarios XY^{tir} no se encontraron diferencias en el patrón de expresión la proteína de GATA4. En todos los casos las células positivas a la proteína se observaron distribuidas en toda el área ovárica, específicamente en el núcleo de las células epiteliales o de la granulosa, que rodean a los ovocitos; coincidiendo con lo

previamente reportado en la literatura (Heikinheimo et al 1997; Holly et al 2003; Salmón et al 2005.).

Reportes previos de los niveles de ARNm del gen GATA4 detectan la expresión en ambos sexos (11.5 dpc) La expresión de GATA4 en gónadas XY es sobre-regulada en células de Sertoli y regulada negativamente en las gónadas XX (13.5 dpc), momento en el que la expresión de GATA4 comienza a ser sexualmente dimórfica (Heikinheimo et al 1997; Viger et al 1998; Ketola et al 2000). Contrario a lo anteriormente reportado, durante este trabajo se observó que los niveles de los transcritos en los ovarios control y los ovarios XY^{tr} son mayores con respecto a los testículos control y los ovotestis detectando niveles de transcritos menores (15 dpc). Sin embargo, conforme avanza la edad los testículos control mantienen los niveles de transcritos; mientras que en los ovarios control y ovarios XY^{tr} los niveles de transcritos presentes disminuyen con respecto a los ovarios de 15 dpc. Al término del desarrollo fetal detectamos que los niveles de expresión son mayores en los testículos control y ovarios B6, mientras que se detectó una disminución en los niveles de expresión en los ovotestis. En conclusión, podemos decir que el ARNm de GATA4 y la proteína persiste en el testículo en desarrollo (13.5 dpc) hasta la vida adulta, localizado su expresión en las células de Sertoli; mientras que en los ovarios la expresión de GATA4, es reactivada en ovarios adultos con expresión predominante en las células de la granulosa (Heikinheimo et al 1997; Viger et al 1998)

Con respecto al patrón de expresión de la proteína de los genes SF1 y Wt1 observamos un patrón similar al presentado por GATA4 en el testículo. Ambas proteínas fueron localizadas en el núcleo de las células de Sertoli, sin embargo, contrario a lo observado con GATA4, las proteínas de SF1 y WT1 si se detectan en algunas células localizadas en el compartimiento estromático.

La proteína de WT1 en los ovotestis se localizó en las células de Sertoli de los cordones seminíferos localizados en la médula, lo cual concuerda con lo previamente reportado en la literatura en cepas control. (Discenza y Pelletier 2004; Wagner et al 2003), también se detectaron células positivas en el compartimiento intersticial en todas las edades analizadas, siendo más evidentes a los 17 dpc. Estas células positivas en el compartimiento intersticial, podrían ser células apoptóticas. Mayo y col en 1999 observaron un patrón similar en ratones knockout para WT1 los cuales presentaron un fenotipo apoptótico debido a la carencia de la expresión de SF1. Se cree que WT1 puede

activar una vía independiente a SF1 el cual también es requerido para la sobrevivencia adrenogenital. Además observo que el factor anti-apoptótico Bcl2, puede ser directamente activado por WT1. (Mayo et al 1999). Richard y col (2001) reportaron que la isoforma – KTS de WT1 junto con el factor de respuesta prostático son importantes para la sobrevivencia celular. Datos igualmente observados en humanos con el síndrome Frasier y en el modelo de ratón Frasier. En la región ovárica del ovotestis se observaron células positivas a la proteína de WT1 pero en menor cantidad.

En los ovarios control (CD1 y B6) la expresión de la proteína de WT1 se encuentra presente en el núcleo de las células epiteliales o de la granulosa, lo cual concuerda con datos reportados previamente (Vidal et al 2000), mientras que en los ovarios XY^{flr} la distribución de la proteína solo se observó en una región del ovario (1 dpp), la cual nos reveló que en el ovario XY^{flr} no mostró algún patrón de diferenciación ovárica.

Datos reportados previamente muestran que WT1 es expresado en animales XX y XY en etapas tempranas del desarrollo urogenital (9.5 dpc) y su expresión es mantenida hasta la vida adulta. En todas las edades estudiadas los niveles de expresión de WT1 fueron altos posiblemente debido a que WT1 está involucrado en la proliferación y diferenciación celular (Gurates et al 2003); si comparamos los niveles de transcritos obtenidos de GATA4 y SF1 observamos que son menores; sin embargo los ovotestis presentaron mayores niveles de transcritos con respecto a los testículos de las cepas CD1 y B6, en todas las edades estudiadas. Se ha sugerido, que WT1 actúa positivamente para la diferenciación celular de las células de Sertoli, pero aún no está claro si son al nivel de iniciación o mantenimiento. SF1 y WT1 parecen ser requeridos para la sobrevivencia celular, y la proliferación, pudiendo tener un papel más crítico en el desarrollo del testículo que en el ovario.

Con respecto a la secuenciación realizada para el splicing alternativo 1 que corresponde al exon 5 de WT1, correlacionó perfectamente con la secuencia previamente reportada por Haber y col (1991) en el riñón; sin embargo, esta secuencia no se le ha determinado alguna función durante la determinación sexual al menos en mamíferos, se hace referencia a está solo durante el desarrollo del riñón (Haber et al 1991). Sin embargo, se ha propuesto que sobre-regula el sitio de implantación embrionario en el útero (Zhou et al 1993), y que se expresa en las glándulas mamarias adultas (Silberstein et al 1997);

sugiriendo que esta isoforma tiene un papel importante en las funciones específicas de los mamíferos (es decir en la implantación embrionaria y lactación). Se ha reportado que la presencia/ ausencia del exon 5 puede modificar la función de la proteína de WT1 cuando existen mutaciones adicionales. Ratones que acarrean una delección en el exon 5 no tiene defectos en el desarrollo y son fértiles (Natioli et al 2002b). Hasta el momento solo se pude concluir que el exon 5 no parece representar una mejor modificación en la función de WT1, aunque faltaría mucho por investigar a cerca del papel que tiene el splicing alternativo 1 en el desarrollo gonadal.

La expresión de la proteína de SF1 en los testículos control (CD1 y B6) además de ser positiva en las células de Sertoli, se observaron células localizadas por fuera de los cordones en el estroma, las cuales correspondieron a las células de Leydig (Hatano et al 1994; Ikeda et al 1994, 2001; Ozisik et al 2003; Morohashi et al 1996). En los ovotestis se observa la proteína en las células de Sertoli y se vio una mayor expresión de la proteína fuera de los cordones seminíferos (17 dpc) al compararlas con las cepas control; mientras que en el tejido ovárico la detección de la proteína es menos evidente, observándose solo algunos núcleos positivos.

En los ovarios control (CD1 y B6) la proteína se vio distribuida en toda el área ovárica, en el interior de los cordones ováricos mostrando un patrón de expresión regular, además se observó que los cordones ováricos se encuentran continuos con el epitelio celómico. En los ovarios XY^{tir} la distribución de la proteína es semejante a los controles, observándose en algunas regiones que la proteína se encuentra delimitando los cordones ováricos y en otras de manera aleatoria.

Reportes previos en la literatura mencionan que los transcritos de SF1 se expresan en ambos sexos (9 dpc). En los machos, SF1 es sobre-expresado debido a que es esteroideogénicamente más activo que en el ovario en etapas tempranas del desarrollo. En el caso del desarrollo del ovario, existe mayor discrepancia en la literatura ya que se reporta que SF1 es regulado negativamente (Ikeda et al 1994; Swain et al 1996, 1998), y por otro lado se reporta, que SF1 es regulado positivamente hasta los 12.5 dpc, disminuyen sus niveles hasta los 18.5 dpc, en donde vuelve a aumentar su expresión (Pierre et al 2003 Ikeda et al 2001). En el presente reporte, detectamos transcritos de SF1 en los ovarios de las tres edades estudiadas, presentando niveles de transcritos muy

similares al de los machos. Un aumento evidente en los niveles de transcritos de SF1 fue detectado tanto en los ovarios como en los testículos control a los 17 dpc, lo cual resulta normal en los testículos, ya que la expresión de SF1 permanece elevada durante la gestación, localizándose la expresión de la proteína en las células de Sertoli y Leydig ambos tipos celulares con función esteroideogénica; sin embargo la razón por la que en nuestro estudio detectamos un aumento en los niveles de transcritos de SF1 en las hembras a los 17 dpc principalmente, es debido, a que se está llevando a cabo la formación del tejido esteroideogénico en el mismo a esta edad.

Aunque se observaron algunas diferencias significativas en los niveles de expresión del ARNm en el caso de los genes GATA4 y SF1, tanto la proteína como el ARNm están presentes en los ovarios XY^{tir} y ovotestis XY^{tir}. Esto nos permite sugerir que la reversión sexual en el ratón B6.Y^{tir} no se debe a la ausencia y/o alteración en el patrón de expresión de estos genes autosómicos. Además, que la expresión prolongada del gen Sry y la presencia y/o regulación negativa de Sox9 en el B6.Y^{tir} no altera la expresión de los genes autosómicos GATA4, WT1 y SF1 durante la diferenciación gonadal del ratón B6.Y^{tir}. Por lo tanto, es factible postular que el camino de diferenciación testicular está regulado exclusivamente por la expresión del gen Sox9 que dirige el papel que los genes autosómicos están desempeñando en un contexto de diferenciación testicular. En ausencia de Sox9, el papel que estarán jugando GATA4, SF1 y WT1 será en el mantenimiento del desarrollo ovárico.

8. CONCLUSIONES.

1. La expresión de la proteína de GATA4, WT1 y SF1 se detecta en ovotestis y ovarios XY^{flr}. En los ovotestis el patrón de expresión en la región medular es similar al observado en los testículos control; detectándose específicamente en el núcleo de las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares. Mientras que en la región cortical, estas se localiza en los núcleos de células distribuidas aleatoriamente.
2. En los ovarios XY^{flr} la expresión de las proteínas es similar a la detectada en los ovarios controles. Células positivas a los tres genes se localizaron distribuidas en todo el ovario (15 dpc). A los 17 dpc y 1 dpp, la señal se observó más específica dentro de los cordones ováricos.
3. Los niveles de los transcritos de los genes autosómicos GATA4 y SF1 (15 y 17 dpc) no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, WT1 mostró diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión. En 1 dpp GATA4 mostró diferencias estadísticamente significativas mientras que para SF1 y WT1 los niveles son similares.
4. Concluimos que en el ratón B6.Y^{flr} la expresión prolongada del Sry y la presencia y/o regulación negativa de Sox9 no altera el patrón de expresión de los genes autosómicos GATA4, WT1 y SF1 durante la diferenciación testicular. Por lo que sugerimos que la diferenciación gonadal en el ratón B6.Y^{flr} esta regulada principalmente por la expresión del gen Sox9, dirigiendo el papel que los genes autosómicos desempeñen.
5. En ausencia de Sox9 el papel que juegan GATA4, WT1 y SF1 será en el mantenimiento del desarrollo ovárico.

9. BIBLIOGRAFIA

Albrecht K.H, Eicher E.M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulose cells have a common precursor. *Developmental Biology*. 240:92-107.

Arango N.A, Lovell-Badge R, Behringer R.R. (1999). Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99: 409-419.

Barboux S, Niaudet P, Gubler M.C, Grunfeld J.P, Jaubert F, Kuttenn F. (1997). Donor splice-site mutations in *WT1* are responsible for Frasier syndrome. *Nature Genetics*. 17:467-470.

Berta P, Hawskins, J.R., Sinclair, A. H., Taylor, A., Griffiths, B. L., Googfellow, P.N. & M. Fellous. (1990). Genetics evidence equating *SRY* and the testis-determining factor. *Nature*, 348: 448-450.

Bishop Colin E, Whitworth Deanne J, Yanjun Qin, Alexander I. Agoulnik, Irina U. Agoulnik, Wilbur R. Harrison, Richard R. Behringer and Paul A. Overbeek. (2000). A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nature Genetics* 26 490-493.

Bullejos M, Koopman P. (2001). Spatially dynamic expression of *Sry* in mouse genital ridges. *Developmental Dynamics* 221:201-205.

Bullejos M, and Koopman P. (2005). Delayed *Sry* and *Sox9* expression in developing mouse gonads underlies B6- Y^{DOM} sex reversal. *Developmental Biology* 278:473-481.

Carlisle C, Winking H, Weichenhan D, Nagamine C. (1996). Absence of correlation between *Sry* polymorphisms and XY sex reversal caused by *M.m. domesticus* Y Chromosomes. *Genomics* 33:32-45.

Chaboissier M.C, A. Kobayashi V. I. Vidal. (2004). Functional analysis of SOX8 and SOX9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891-1901.

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

Da Silva S.M, Hacker A. Harley V, Goodfellow P, Swain A. and Lovell-Badge R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics* 14: 61-68.

De Santa Barbara P, Brigitte Moniot, Francis Poulat, and Philippe Berta. (2000). Expression and Subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins During Early Human Testicular development. *Developmental Dynamics* 217:293-298.

Discenza M.T and Pelletier J. (2004). Insights into the physiological role of WT1 from studies of genetically modified mice. *Physiol Genomics* 16:287-300.

Eicher E.M, Washburn L.L, Whitney J.B III, Morrish K.E. (1982). Mus musculus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome cause sex reversal. *Science*, 217: 535-537.

Eicher, E.M, Washburn L.L. (1983). Inherited sex reversal in mice: Identification of a new primary sex-determining gene. *J. Exp. Zool* 228: 297-304.

Eicher E.M, Washburn L.L (1986). Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu. Rev. Genet.* 20: 327-360.

Eicher E.M, Shown E.P and Washburn L.L. (1995). Sex reversal in C57BL/6J-Y^{POS} mice corrected by Sry transgene. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* 350:263-269.

Eicher E.M, Washburn L.L, Schork N.J, Lee B.K, Shown E.P, Xu X, Dredg R.D, Pringle M.J, Page D.C. (1996). Sex determining gene on mouse identified by linkage analysis of C57BL/6J-Y^{POS} sex reversal. *Nature Genet* 14:206-209.

Gurates, B, Amsterdam A, Tamura M, Yang S, Zhou J, Fang Z, Awin S, Sebastian S, Bulun S.E. (2003). WT1 and Dax-1 regulate SF1 mediated human P450 arom gene expression in gonadal cells. *Mol. Endocrinol.* 208 (1-2): 61-75.

Haber, A.D, Sohn R.L, Buckler A.J, Pelletier, J, Call K.M, and Housman D.E. (1991). Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumors gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 9618-9622.

Hammes A, Guo J.K, Lutsch G, Leheste J.R, Landrock D, Ziegler U, Gubler M.C, Schedl A. (2001). Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106:319-329.

Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman, M.R, Takakusu A, Omura, T, Morohashi K. (1994). Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120: 2787-2797.

Holly A, La Voie. (2003). The role of GATA in Mammalian. *Reproduction Society for Experimental Biology and Medicine.* 1282-1290.

Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, Rahuman N.A, Narita N, Huhtaniemi I.T, Tapanainen J.S, Wilson D.B. (1997). Expression and hormonal regulation of transcription factor GATA 4 and GATA 6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138:3505-3514.

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb A.N, Bartley J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J. Med. Genet.* 87:349-353.

Ikeda Y, Lala D.S, Luo X, Kim E, Moisan M.P, Parker K.L. (1993). Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol. Endocrinol.* 7:852-860.

Ikeda Y, Shen W.H, Ingraham H.A, and Parker K.I. (1994). Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1 an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol* 8: 654-662.

Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi K.I. (2001). Comparative localization of Dax1 and Ad4BP/SF1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Developmental Dynamics*. 220: 363-376.

Josso W, Picard J.Y, and Trand D. (1977). The antimullerian hormone. *Recent. Prog. Horm. Res*, 33:117-163.

Jost A, Vigier B, Prepin J and Perchellet J.P. (1973). Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Progr. Horm. Res*. 29: 1-35.

Jost A. (1974). Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp*. 36:271-315.

Karnovsky M.J. (1965). *J. Cell. Biol.*27: 137 A.

Karpova T, Maran, R.R, Presley J, Scherrer SP, Tejada L, Heckert L.L. (2005). Transgenic rescue of SF-1 null mice. *Ann N.Y. Acad. Sci*. 1061:55-64

Kent J, Wheatley, S.C., Andrews, J.E, Sinclair A.H, and Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122: 2813-2822

Ketola I, Rahman N, Toppari J, Bielinska M, Susan B, Porter-Tinge P, S. B, Tapanainen, J.S., Huhtaneimi I.T., Wilson D.B and Heikinheimo M. (1999). Expression and Regulation of Transcription Factors GATA-4 and GATA-6 in Developing Mouse Testis. *Endocrinology* 140: 1470-1480.

Ketola I, Pentikainen, V, Vaskivuo T, Ilvesmaki V, Herva, R, Dunkel, L, Tapanainen, J. S, Toppari J and Heikinheimo M. (2000). Expression transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 85: 3925-3931.

Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian, N & R. Lovell-Badge. (1990). Expression of candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 148: 450-452.

Kobayashi A, Hao Chang, Marie-Christine Chaboissier, Andreas Schedl and Richard R. Behringer. (2005). Sox9 in Testis Determination. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1061:9-171.

Kuo C.T, Morrisey E.E, Anandappa R, Sigrist K, Lu M.M, Parmacek M.S, Soudais C and Leiden J.M. (1997). GATA 4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev.* 11:1048-1060.

Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P, et al. (1998). Frasier syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/- KTS splice isoforms. *Hum. Mol. Genet.* 7:709-714.

Kreidberg J.A, Sariola H, Loring J.M, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. (1993). WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74:679-691.

Lee C.H and Taketo T.(1994). Normal onset, but prolonged expression, of Sry gene in the B6 Y^{DOM} sex-reversed mouse ganad. *Developmental Biology.* 165: 442-452.

Lee C.H, Taketo T. (2001). Low levels of Sry transcripts cannot be the sole caused of B6.Y^{TIR} sex reversal. *Genesis* 30:7-11.

Lillie F. (1916). The theory of Freemartin. *Science* 43:611-613.

Luo X, Ikeda Y, Parker K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.

Marmolejo A, Nishioka Y, Moreno N, Merchant H. (1999). Fertility of Y^{tir}. B6 sex reversal females with XX orthotopic ovarian transplants. *Biol Reprod.* 61:1426-1430.

Mayo M.W, Wang C.Y, Drouin, S.S, Madrid L.V, Marshall A.F, Reed J.C, Weissman B.E, and Baldwin A.S. (1999). WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J.*18: 3990-4003.

Merchant and Taketo. (1991). Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *Journal of electron microscopy technique.* 19: 158-171.

Merchant L.H, Hugu J.C and Teruko T. (1994). Developmental arrest of fertilized eggs from the B6 Y^{DOM} sex-reversed female mouse. *Developmental Genetics* 15: 435-442.

Molketin J.D, Lin Q, Duncan S.A and Olson E.N. (1997). Requirement of the transcription factor GATA 4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 11:1061-1072.

Moreno, M. N., Harley V, and Merchant, L. H. (2003). A cell aggregation pattern precedes Sox9 expressing pre-Sertoli cells in the genital ridge in of mouse. *Cytogenet Genome Res.*101(3-4): 219-23.

Moreno M. N, Torres- Maldonado L, Chimal Monroy J, Harley V, Merchant Larios H. (2004). Disturbed expression of Sox9 in pre-Sertoli cells underlies sex reversal in mice B6.Y^{tir}. *Biol. Reprod.* 70:114-122.

Morais da Silva S, Haker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. (1996). Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nature Genetics* 14: 62-68.

Morales S.E. (2004). Apoptosis y diferenciación celular durante el desarrollo del ovario del ratón B6.Y^{tir} con reversión sexual. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.

Morohashi K, Omura T. (1996). Ad4BP/SF1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 gene and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J.* 10: 1569-1577.

Münsterberg A and Lovell-Badge R. (1991). Expression of the mouse anti-Müllerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113: 613-624.

Nachtigal M.W, Hirosaka Y, Enyeart- VanHouten D.L, Flanagan J.N, Hammer G.D, Ingraham H.A. (1998). Wilms' tumors 1 and Dax 1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex specific gene expression. *Cell* 93:445-454.

Nagamine C. M, Taketo T, Koo GC. (1987a). Morphological development of the mouse gonad in tda-1 XY sex reversal. *Differentiation* 33: 214-222.

Nagamine, C. M, Chan, K. K and Lau Y F. (1989). Chromosome mapping and expression of a putative testis determining gene in mouse. *Science* 243: 80-83.

Nagamine C, Morohashi K, Carlisle C, Chang D. (1999). Sex reversal caused by *Mus musculus domesticus* Y chromosomes linked to variant expression of the testis-determining gene Sry. *Developmental Biology*. 216:182-194.

Natoli T.A, Alberta J.A, Bortvin A, Taglienti M.E, Menke D.B, Loring Jaenisch R, Page D.C, Housman D.E and Kreidberg J.A. (2004). Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. *Developmental Biology* 268:429-440.

Natoli T.A, McDonald A, Alberta J.A, Taglienti M.E, Housman D.E, and Kreidberg J.A. (2002b). A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Mol. Cell. Biol.* 22: 4433-4438.

Ninomiya Y, Okada M, Kotomura N, Suzuki K, Tsukiyama T, Niwa O. (1995). Genomic organization and isoforms of the mouse ELP gene. *J. Biochem (tokio)*. 118(2): 380-389.

Ozisik G, Achermann C.J, Meek J.J, Jameson L.J. (2003). SF1 in the Development of the Adrenal Gland and Gonads. *Horm Res. Suppl.* 1 94-98.

- Pelletier J, Schalling M**, Buckler A.J, Roger A, Haber D.A, Housman D. (1991). Expression of the Wilms' tumors gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev.* 5:1345-1356.
- Richard D.J**, Schumacher V, Royer-Pokora B, and Roberts S.G. (2001). Par4 is a coactivator for a splicing isoform-specific transcriptional activation domain WT1. *Gene Dev.* 15: 328-339.
- Rossi J.M**, Dunn N.R, Hogan B.L and Zaret K.S. (2001). Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev.* 15:1998-2009
- Salmon N.A**, Handyside H.A and Joyce M.I. (2005). Expression of Sox8, Sf1, Gata4, Wt1, Dax1, and Fog2 in the Mouse Ovarian Follicle: Implications for the Regulation of Amh Expression. *Molecular Reproduction and Development.* 70: 271-277
- Sambrook S**, Fritsch E.F, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, New York.
- Sekido R**, I. Bar V. Narváez, Penny G, Lovell-Badge R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* 274:271-279.
- Silbrstein G.B**, Van Horn K, Strickland P, Roberts C.T, Jr and Daniel C.W. (1997). Altered expression of the WT1 wilms tumors suppressor gene in the human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8132-8137.
- Singh L**, Jones K.W. (1982). Sex reversal in the mouse (*Mus musculus*) is caused by a recurrent nonreciprocal crossover involving the x and aberrant y chromosome. *Cell* 28 (2): 205-16.
- Scharnhorst V**, Van der Eb A.J, and Jochemsen A.G. (2001). WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene* 273: 141-161.

Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R. (1998). Dax 1 antagonizes Sry action mammalian sex determination. *Nature* 391: 761-767.

Swain A, Zanaria E, Hacker, A, Lovell-Badge, R and Camerino, G. (1996). Mouse DAX1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal hypothalamus function. *Nature Genet.* 12: 404-409.

Taketo H.T, Nishioka Y, Nagamine C, Villalpando I, Merchant L.H. (1989). Development and fertility of ovaries en the B6. Y^{DOM} sex-reversed female mouse. *Development.* 107: 95-105.

Taketo T.H, Saeed, J Nishioka, Y and P.K Donahoe. (1991). Delay of testicular differentiation in the B6. Y^{DOM} ovotestis demonstrated by immunocytochemical staining for Mullerian inhibiting substance. *Developmental Biology.* 146: 386-395.

Taketo T, Chung Hae Lee, Jianqing Zhang, Yunmin Li, Chi- Yu Gregory Lee, and Yun-Fai Chris Lau. (2005). Expression of SRY Proteins in Both Normal and Sex- Reversal XY Fetal Mouse Gonads. *Developmental Dynamics.* 233:612-622.

Tevosian G S, Kenneth H, Albrecht, Jonh D, Crispino, Yuko Fujiwara, Eva M. Eicher and Stuart H. Orkin. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129: 4627-4634

Vidal V, Schedl A. (2000). Requirement of WT1 for ganad and adrenal development: insights from transgenic animals. *Endocr. Res.* 26 (4): 1075-82.

Vidal Valerie P.I, Chaboissier Marie-Christine, Dirk G. de Rooji and Schedl Adreas. (2001). Sox9 induce testis development in XX trasgenic mice. *Nature Genetics* 216-217.

Viger R.S, Mertineit C, Trasler J.M, Nemer M. (1998). Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 125:2665-2675.

Villalpando, F.I, Nishioka Y, Taketo T. (1993). Endocrine differentiation of the XY sex-reversed mouse ovary during postnatal development. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*45: 265-273.

Wagner T.J, Wirth J. Meyer. (1994). Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79: 1111-1120

Wagner D.K, Wagner N and Schedl A. (2003). The complex life of WT1. *Journal of Cell Science* 116: 1653-1658.

Wylie C.C and Heasman, J. (1993). Migration, proliferation, and potency of primordial germ cells. *Seminars in Dev Biol.* 4: 161-170

Yang H, Lu M.M, Zhang L, Whitsett J.A and Morrisey E.E. (2002). GATA 6 regulates differentiation of distal lung epithelium. *Development* 129:2233-2246.

Zetterqvist H. (1956). The ultrastructural organization of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. Ph.D. Tesis Karolinska Institute, Stockholm.

Zhou, J, Rausher, F.J, and Bondy, C. (1993). Wilms' tumors (WT1) gene expression in rat decidua differentiation. *Differentiation* 54: 109-114.