

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENES
INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO FOLICULAR OVÁRICO DE
MURINOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. ELSA VERÓNICA DE LA CHESNAYE CARAVEO

Director de tesis: Dr. Juan Pablo Méndez Blanco

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2008



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

A los Doctores: Juan Pablo Méndez Blanco, Horacio Merchant-Larios y Sergio R. Ojeda, por su apoyo, consejos y críticas tanto en la parte experimental como en la elaboración del manuscrito de esta tesis doctoral.

A mis compañeras de laboratorio, por su aliento y sugerencias en todo momento.

A mi familia, por su paciencia y cariño.

Los experimentos realizados en este trabajo de investigación fueron financiados en parte por el Fondo para el Fomento a la Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo el proyecto No. 2005/1/1/032.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Justificación	16
Objetivo	16
Hipótesis	16
Material y Métodos	17
Material	17
Métodos	18
Extracción de ARN	18
Microarreglos de ADN	19
RT-PCR	21
Northern blot	22
Clonación por PCR	25
Western blot	30
Análisis histológico	32
Hibridación <i>in situ</i>	32
Hibridación <i>in toto</i>	34
Análisis estadístico	36
Resultados	37
Desarrollo folicular en la cepa de ratones C57BL/6J	37
Análisis por microarreglos de ADN	37
Perfil de expresión del ARNm BG083112/AK087669	45
Expresión en el ovario murino del gen Fbxw15	47
Localización celular del ARNm de Fbxw15	47
Caracterización molecular del gen Fbxw15	51
Localización celular de la proteína FBXW15	55
Discusión	57
Conclusiones	63
Referencias	64

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1:	Histogénesis y desarrollo folicular temprano	6.
Figura 2:	Factores de transcripción y de crecimiento involucrados en la formación y el desarrollo folicular temprano del ovario murino	7.
Tabla 1:	Oligonucleótidos complementarios a la secuencia AK087669/Fbxw15	23.
Figura 3:	Histología ovárica en la cepa de ratones C57BL/6J	38.
Figura 4:	Conformación mediante el programa de computación J-Express de 49 grupos de secuencias de acuerdo a su perfil de expresión durante las 48 y 96 horas posnatales en el ensayo de microarreglos	40.
Figura 5:	Grupo conformado por 24 secuencias con un aumento consistente en su expresión durante las etapas de ensamble y crecimiento folicular en el ovario murino	42.
Figura 6:	Perfil de expresión del ARN mensajero correspondiente al gen Fbxw15 en el ovario murino feto-neonatal	46.
Figura 7:	Análisis mediante la técnica de northern blot del ARN mensajero correspondiente al gen Fbxw15	48.
Figura 8:	Localización celular mediante las técnicas de hibridación <i>in situ</i> e hibridación <i>in toto</i> del ARN mensajero del gen Fbxw15	50.
Tabla 2:	Homología entre las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los genes que se localizan en el locus 9F2	52.
Figura 9:	Esquema de la estructura del gen Fbxw15	53.

Figura 10: Homología entre los dominios de caja F de las proteínas FBXW15, FBXW12, FBXW14 y ciclina F. Esquema de la clasificación de la familia de proteínas con cajas F 54.

Figura 11: Localización celular por inmunohistofluorescencia de la proteína que codifica el gen Fbxw15 56.

RESUMEN

Recientemente, diversos factores implicados en la formación y crecimiento temprano del folículo ovárico han sido caracterizados; sin embargo, hasta este momento el conocimiento que se tiene acerca de los genes involucrados en el proceso de la foliculogénesis y sus mecanismos de acción e interacción con otros factores es limitado. Con el fin de identificar secuencias de ADN con expresión diferencial durante el ensamble y crecimiento folicular en el ovario murino, empleamos la técnica de microarreglos para comparar la expresión génica en ovarios colectados a las 48 y 96 horas posnatales (momento del ensamble y crecimiento folicular, respectivamente), con respecto de la expresión génica en ovarios colectados durante las primeras 16 horas después del nacimiento.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el programa de computación J-Express, el cual conformó 49 grupos de genes de acuerdo a su perfil de expresión durante las 48 y 96 horas. Se llevó a cabo el análisis molecular de la secuencia con mayor incremento de un grupo que incluyó 24 genes con un aumento consistente en su expresión.

Este gen, denominado Fbxw15, genera un transcrito de 1.5 kilobases (kb), cuya región codificante abarca 1,401 pares de bases (pb). El ARN mensajero (ARNm) correspondiente, presenta una expresión bifásica en el ovario murino feto-neonatal, específicamente en el ovocito. Esta expresión se observó a niveles elevados durante el décimo octavo día gestacional, momento en el que ocurre la muerte celular programada de un alto porcentaje de las células germinales, reduciéndose drásticamente al día siguiente, hasta aumentar de

nuevo a partir del segundo día posnatal, cuando en el ovario murino ocurre el ensamble y crecimiento folicular, independiente del estímulo gonadotrópico.

La proteína que traduce este gen, tiene un peso de 52.3 kilo Daltons (kDa), se localiza en el citoplasma del ovocito y se asocia con el retículo endoplásmico (RE). El análisis mediante la herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos (BLAST), así como el empleo del programa Pfam para el reconocimiento de regiones homólogas a dominios proteícos conocidos, mostraron que dicha proteína presenta en su extremo amino-terminal un dominio de caja F. Las proteínas con caja F, participan en la proteólisis mediante ubiquitinación.

Lo anterior, aunado a su perfil de expresión, sugiere que *Fbxw15* participa en la regulación de una o varias proteínas involucradas en procesos específicos de los ovocitos.

ABSTRACT

In recent years, several factors required for follicular assembly and/or early growth of newly formed primordial follicles have been characterized, but additional factors likely remain to be identified. We have used cDNA arrays to compare gene expression in the neonatal mouse ovary at 48 hours (when primordial follicles are being assembled) and at 96 hours (when early follicular growth is taking place) after birth to that of ovaries collected at 16 hours postpartum (when follicles have not yet been formed). Segregating genes according to their pattern of expression revealed the presence of one cluster of 24 genes for which expression consistently increased at 48 and 96 hours. The top increaser in this cluster encodes a 1.5-kb messenger RNA containing an open reading frame of 1401 base pair that encodes a protein of 466 amino acids. The predicted 52.3-kDa protein is a member of the F-box-only (FBXO) protein family, termed FBXW15. It has a cytoplasmic localization that includes the endoplasmic reticulum. Expression of *Fbxw15* messenger RNA is oocyte-specific; this RNA is first detected on gestational day 18, decreasing thereafter to minimal levels on the day of birth. The prevalence of *Fbxw15* messenger RNA increases again at 48 and 96 hours after birth, coinciding with the time of follicular assembly and the initiation of early follicular growth, respectively. The specific expression of *Fbxw15* in oocytes and its developmental pattern of expression suggest a role for this gene in the regulation of oocyte physiology.

INTRODUCCIÓN

En mamíferos, el desarrollo gonadal inicia con la formación de las crestas gonadales debido a la proliferación del epitelio celómico, la condensación del mesénquima en ambos lados de la línea media entre el mesonefros y el mesenterio dorsal y la migración hacia el primordio gonadal a través del mesenterio dorsal, de las células germinales primordiales (CGPs), localizadas en el endodermo posterior del saco vitelino (1, 2).

En ausencia del gen determinante del testículo, el primordio gonadal se desarrolla como ovario en el cual, las CGPs se diferencian en ovogonias, que en conjunción con las células epiteliales (células de la pregranulosa), formarán los denominados cordones ovígeros, delimitados por una delgada membrana basal rodeada en la parte externa por células del mesénquima (3). De esta forma, el ovario se organiza estructuralmente en dos compartimentos: el tejido intersticial y los cordones ovígeros. En estos últimos y por la acción del ácido retinoico sobre la expresión del gen *Stra8* (Stimulated by Retinoic Acid gene 8) (4), las ovogonias entran en la primera fase de división meiótica, diferenciándose en ovocitos primarios para luego detenerse en la etapa de diploteno hasta la pubertad, momento en el cual la hormona folículo estimulante continúa con la meiosis (5, 6).

La foliculogénesis ó histogénesis folicular, constituye la organización de los ovocitos y las células somáticas en unidades estructurales donde un ovocito en la fase de diploteno de la meiosis, se encuentra rodeado de una capa de células de la granulosa, delimitadas por la membrana basal (7).

Estudios realizados con microscopía de luz definen el desarrollo folicular en tres etapas: en la primera etapa, los ovocitos se localizan dentro de los

cordones ovígeros, conformando un sincicio debido a puentes citoplasmáticos entre ellos. En la segunda etapa, la comunicación intercelular desaparece y los ovocitos aún dentro de los cordones ovígeros, son separados entre sí por proyecciones citoplasmáticas de las células epiteliales (células de la pregranulosa) que los circundan. La tercera etapa comprende la individualización folicular a partir de la fragmentación de los cordones ovígeros (proceso que involucra la reestructuración de la membrana basal) y la inclusión de células del estroma, lo que separa entre sí a los folículos primordiales (8, 9) (Figura 1).

La individualización folicular, que en el ovario murino ocurre durante los primeros días de vida posnatal y el crecimiento temprano de los folículos, son eventos independientes del estímulo gonadotrópico (10). Ambos procesos requieren de una coordinación molecular precisa, orquestada por una serie de interacciones genéticas entre las células somáticas y las germinales (11, 12) (Figura 2).

Diversos estudios han propuesto el papel fundamental que tienen los ovocitos en la histogénesis folicular. De esta forma, se ha demostrado que los cordones ovígeros desprovistos de células germinales no se fragmentan en folículos individuales (13, 14); lo anterior sugiere que los ovocitos están involucrados en los eventos morfogenéticos que dan lugar a la formación de los folículos, al estimular tanto la fragmentación de los cordones ovígeros, como la proliferación y diferenciación de las células epiteliales circundantes (15, 16).

Experimentos llevados a cabo con ratones nulos para diversos factores de crecimiento o de transcripción, sugieren la participación de estos tanto en la

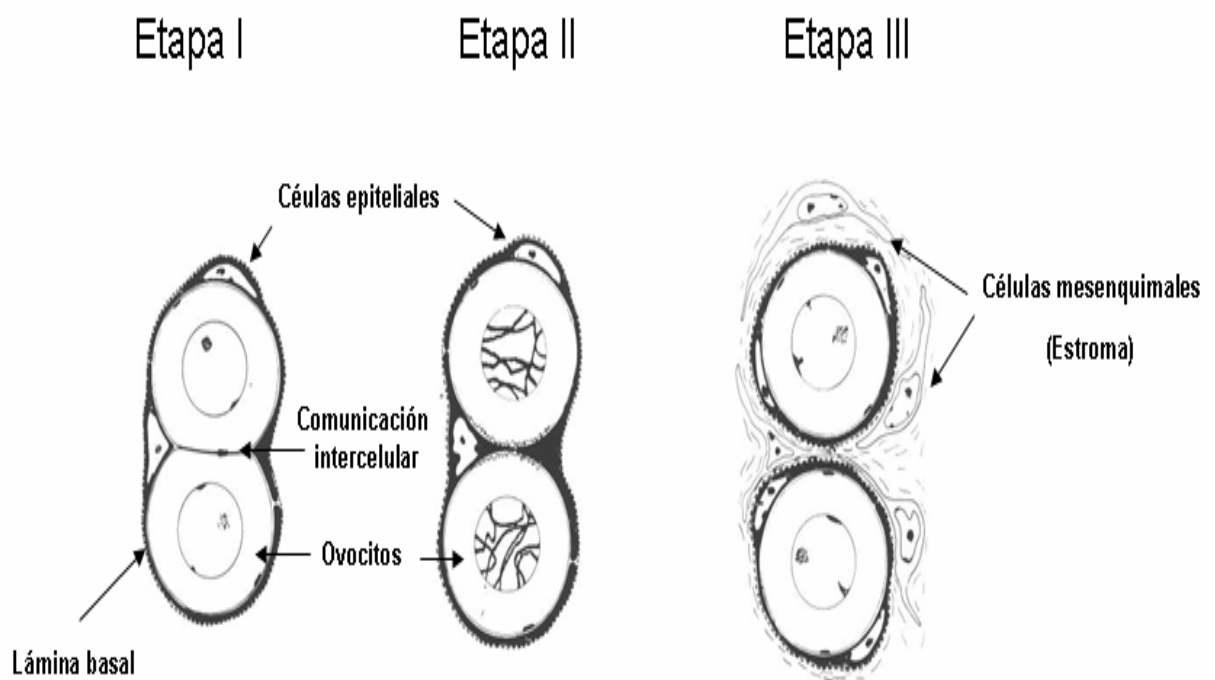


Figura 1. Diagrama que muestra el proceso de la foliculogénesis en mamíferos. En la primera etapa (13 a 15 días poscoito en el ovario murino), los ovocitos se encuentran dentro de los cordones ovíferos, comunicados entre sí mediante puentes citoplasmáticos. Los cordones ovíferos están rodeados por células epiteliales y separados del estroma por la lámina basal (línea punteada). En la segunda etapa, que ocurre a partir del décimo sexto día poscoito y hasta el nacimiento, la comunicación intercelular se pierde y los ovocitos se separan entre sí debido a proyecciones citoplasmáticas de las células epiteliales. La tercera etapa se presenta durante los primeros 3 días de vida posnatal y comprende la individualización folicular a causa de la inclusión del estroma entre los folículos conformados por un ovocito rodeado de células epiteliales (células de la granulosa) y la lámina basal.

Tomado de: Merchant-Larios H, Chimal Monroy J. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Developments in Ultrastructure of Reproduction* 1989: 55-63.

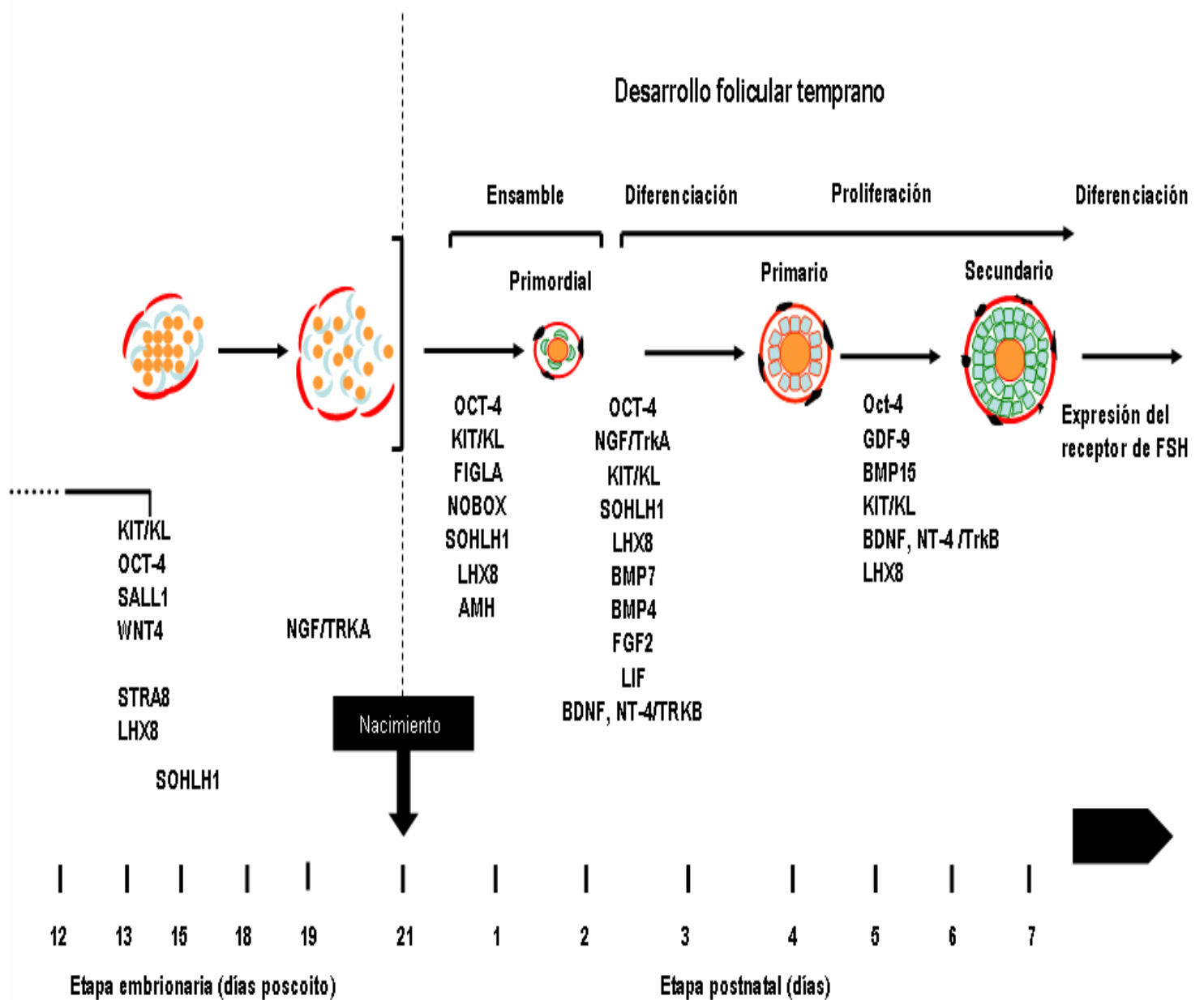


Figura 2. Representación esquemática de la participación de diversos factores de transcripción y crecimiento, en la formación y desarrollo folicular temprano del ovario murino.

proliferación de los ovocitos como en la formación de los folículos y su posterior desarrollo (17, 18).

Entre las proteínas que participan en la proliferación de las células germinales primordiales que se diferenciarán posteriormente en ovocitos, se encuentran el complejo Kit-ligando, el cual mantiene la viabilidad de dichas células mientras migran hacia la cresta urogenital (19). Estudios en ratones que generaron una deficiencia espontánea tanto para la expresión del receptor tirosina-cinasa Kit como para su ligando, demostraron que la proliferación de las CGPs durante el proceso de migración hacia el primordio gonadal, depende de la interacción de las proteínas que conforman este complejo (12). En la etapa embrionaria, las CGPs expresan el receptor KIT a partir de los 7.5 días poscoito (dpc) y hasta los 13.5 dpc, mientras que el ligando para Kit (KL) se expresa en las células somáticas durante el transcurso de la ruta migratoria (20, 21).

El factor de transcripción OCT-4, perteneciente a la familia de factores POU, involucrado en el mantenimiento de la pluripotencialidad es un factor crítico en la biología de las células germinales primordiales (22), el cual se expresa exclusivamente en estas a partir de los 8.5 dpc y hasta que las CGPS entran en la primera fase de la meiosis, momento en el que el nivel de expresión de Oct-4 decrece, hasta el nacimiento donde la expresión aumenta nuevamente (23-25).

El factor de transcripción con dedos de zinc SALL4, es esencial en el mantenimiento de la pluripotencialidad y regula la expresión de Oct-4 (26, 27). Y el factor WNT-4, que mantiene la viabilidad de los ovocitos, una vez que han colonizado la gónada (28). De igual forma, se ha demostrado la participación

de diversos factores de transcripción y de crecimiento en la formación y desarrollo de los folículos (29).

Además de su participación en la proliferación de las CGPs, el complejo KIT/KL, juega un papel importante en el crecimiento de los ovocitos, en el ensamble folicular, en la proliferación de las células de la granulosa, en el reclutamiento de las células de la teca y en el mantenimiento del arresto meiótico (30). Las proteínas KL y KIT son codificadas por los loci Steel (Sl) y dominant white spotting (W), respectivamente (31). Estudios llevados a cabo por Besmer y cols. (1993) (32), demostraron que los ratones mutantes para ambos alelos, presentaban deficiencias en pigmentación, hematogénesis y en la formación de folículos primordiales.

Otro factor importante en el ensamble folicular lo constituye el factor en la línea germinal alfa (FIGLA). Este factor ovocito-específico, regula la expresión de genes pertenecientes a la familia NALP, involucrados en eventos de proliferación celular (33). Asimismo, FIGLA se une a dominios de cajas E, localizados en la región promotora de los genes Zp1 y Zp3, que codifican para dos de las proteínas que forman la zona pelucida (34). Los ratones nulos para este factor de transcripción, no desarrollan folículos primordiales y presentan ovocitos atrésicos, debido a que la fragmentación de los cordones ovígeros previa a la formación de los folículos no sucede (35, 36).

Lo mismo ocurre en los ratones knockout para el factor de transcripción con caja homeótica, NOBOX (Newborn Ovary Homeobox- encoding gene). La delección de dicho factor, afecta la supervivencia de los ovocitos y por consiguiente, la formación de los folículos primordiales (37). Estudios realizados por Pangas y cols. (2006) (38), sugieren que la actividad

transcripcional de Nobox es regulada en forma indirecta por el factor con estructura de hélice-asa-hélice SOHLH1; lo anterior fue postulado al identificar una reducción en los niveles de Nobox en los ovarios de ratones nulos para *Sohlh1*. Este último, se expresa a partir de los 15 dpc en los ovocitos que se encuentran en la profase de la primera meiosis y hasta la etapa de folículo primario. Los ratones deficientes de *Sohlh1* son infértiles, con ovarios atrésicos que presentan únicamente folículos primordiales. Asimismo, SOHLH1 ejerce una acción directa sobre la actividad transcripcional de *Lhx8*, un gen que codifica para una proteína con homeodominio LIM, presente en las CGPs a partir de los 13.5 dpc y hasta las etapas preantrales del desarrollo folicular. Los ratones nulos para *Lhx8*, desarrollan el mismo fenotipo que los *Sohlh1* deficientes. Más aún, los niveles de expresión de *Lhx8* se encuentran reducidos drásticamente en los ratones knockout para *Sohlh1*. Lo anterior indica que *Sohlh1* regula directamente la expresión de *Lhx8* cuya acción ocurre cascada arriba de *Figla* y *Nobox*.

A su vez, el factor NOBOX regula la actividad transcripcional de otros genes como: *Oct-4*, *Sall4*, el factor de crecimiento y diferenciación 9 (*Gdf9*) y la proteína morfogenética de hueso 15 (*Bmp15*). Todos ellos presentan en su región promotora, secuencias de unión a NOBOX (39). Los dos últimos codifican proteínas que pertenecen a la superfamilia TGF- β (Transforming Growth Factor β), la cual comprende aproximadamente a 35 miembros estructuralmente conservados. Dentro de esta familia, se incluyen factores identificados durante diferentes estadios de la foliculogénesis en los ovocitos y/o en las células somáticas, cuyo mecanismo de señalización ocurre a través de proteínas Smad principalmente (40, 41).

El factor de crecimiento y diferenciación 9, se expresa exclusivamente en los ovocitos y participa en la transición de la fase primaria a la secundaria del desarrollo folicular. Este factor de crecimiento promueve en forma parácrina el crecimiento y la diferenciación de las células de la granulosa circundantes (42). De igual forma, actúa en forma autócrina en la regulación del crecimiento y maduración del ovocito. Los ratones hembra que carecen del gen *Gdf9*, presentan únicamente folículos primarios (43). Más aún, los estudios histológicos mostraron desorganización en las células de la teca y una baja proliferación de las células de la granulosa (43, 44). Los mecanismos por medio de los cuales GDF9 participa en la organización de la teca no son claros, habiéndose sugerido que este factor de crecimiento regula otras moléculas que conforman una matriz extracelular a la que se adhieren las células de la teca, las cuales posteriormente ejercen disgregación de las células de la granulosa (45, 46).

Las proteínas morfogenéticas de hueso, también miembros de la superfamilia TGF- β , son factores de crecimiento identificados inicialmente en el tejido óseo, involucrados en el proceso de proliferación y diferenciación celular de diversos órganos, incluido el ovario (47). Entre ellas está la proteína morfogenética de hueso 15 (BMP15) que al igual que GDF9, se localiza solo en los ovocitos. BMP15 ejerce una acción sinérgica con GDF9 en la interacción entre los ovocitos y las células del cumulus de los folículos preantrales (48). Los ratones nulos para BMP15 son subfértiles con un índice de ovulación y fertilización disminuido y una histología ovárica relativamente normal (49). Estudios realizados por Otzuka y cols. (2002) (50) sugieren que BMP15 promueve la

expresión de las dos isoformas correspondientes a KL en las células de la granulosa de los folículos preantrales.

De igual forma, las proteínas BMP7 y BMP4 participan en el desarrollo folicular. Ambas están presentes en las células mesenquimales e interactúan con las células foliculares para mantener la supervivencia de los ovocitos y el desarrollo del folículo primordial hacia etapas subsecuentes (51, 52).

Existen otros factores de la superfamilia TGF- β , involucrados en el desarrollo folicular. Entre ellos: el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2), el cual se expresa selectivamente en los ovocitos y actúa sobre las células de la granulosa, de la teca y sobre las células del estroma, para promover la proliferación y la diferenciación folicular (53). El factor inhibidor de leucemia (LIF), el cual está presente en el fluido folicular y sus niveles de expresión incrementan conforme el folículo se desarrolla. Este factor promueve la transición del folículo primordial al primario, estimula el crecimiento del ovocito, así como el reclutamiento y proliferación de las células de la teca (54). La hormona anti-Mulleriana y su receptor, ejercen un efecto contrario al inhibir la diferenciación de los folículos primordiales. Lo anterior se demostró en los ratones nulos para el gen *Amh*, los cuales mostraron un incremento en el número de folículos preantrales y antrales (55). Las neurotrofinas también participan en el proceso de foliculogénesis (56), al interactuar con receptores transmembranales, conocidos como TrkA, TrkB y TrkC, cuyo mecanismo de señalización involucra a proteínas tirosina-cinasas (57). Además de estos receptores, existe otro denominado p75 NGFR, el cual se expresa de forma abundante en el tejido nervioso (58). p75 NGFR también denominado receptor de baja afinidad, difiere con respecto a los receptores Trk, en cuanto a su

dominio intracelular, ya que éste en lugar de estar acoplado a una proteína cinasa, presenta en la porción carboxilo terminal una secuencia consenso de acoplamiento a proteínas G (57). Se ha demostrado que este receptor forma dímeros con los receptores TrK, lo que conlleva a la amplificación de la respuesta generada por la unión ligando-receptor (59).

Estudios en los que se observó que los receptores TrK expresados ectópicamente tienen la capacidad de mediar la respuesta proliferativa dependiente de neurotrofinas en fibroblastos, confirmaron la participación de estas últimas en eventos de proliferación y diferenciación celular de tejidos no neuronales (60-63). La presencia de neurotrofinas y sus receptores ocurre en etapas previas a la folículoogénesis, durante ésta y en la etapa puberal (64). Los resultados de hibridación *in situ* en ratones silvestres, demostraron que la expresión en el ovario tanto del factor de crecimiento neuronal (NGF), como de su receptor (TrKA), se presenta en la etapa prenatal previa al ensamble folicular, lo cual sugiere que ambas proteínas están involucradas en procesos de proliferación celular (65). Se ha postulado que dichas proteínas intervienen en la proliferación de células epiteliales y del mesénquima dentro del ovario murino (66).

Por otro lado, el análisis histológico en ovarios de ratones nulos para el factor de crecimiento neuronal (NGF), demostró una disminución significativa en el número de células del mesénquima ovárico, así como un número reducido de folículos primarios. Cabe mencionar que en dichos estudios se observó una ligera disminución en cuanto al número de folículos primordiales, lo cual sugiere que la ausencia de NGF, no impide la formación del folículo, sino que promueve el desarrollo subsecuente del mismo (67).

De igual forma, estudios por hibridación *in situ* en ratones silvestres mostraron que la neurotrofina 4/5 se expresa en los ovocitos durante los dos primeros días postnatales. El receptor específico para la NT-4/5 (TrkB), se expresa predominantemente en las células de la granulosa. El fenotipo ovárico en los ratones nulos para la neurotrofina 4/5, no presentó alteraciones (64).

Se ha sugerido que NGF y NT-4/BDNF, así como sus receptores correspondientes, participan de forma complementaria en el desarrollo folicular temprano, postulándose que el complejo NGF/TrKA, promueve la proliferación de las células del mesénquima durante el ensamble del folículo primordial, mientras que el segundo complejo (NT-4/BDNF/TrKB), interviene en el crecimiento de los folículos primordiales para dar lugar a folículos primarios y secundarios (66).

Por otra parte, se ha demostrado que durante el desarrollo ovárico ocurre la muerte celular programada de aproximadamente el 70% de las células germinales (68), este evento mantiene una estrecha relación con los procesos que inducen la supervivencia folicular. Los mecanismos celulares que mantienen un equilibrio entre las señales proliferativas y las apoptóticas, aún no se han podido dilucidar completamente (67). El equilibrio entre la proliferación y la degradación celular es fundamental para evitar la eliminación excesiva de células germinales que conllevaría al desarrollo de disgenesias ováricas, o bien al desarrollo de falla ovárica prematura (36).

Diversos estudios sugieren la participación de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) en la supervivencia de las células germinales primordiales (69) y en la proliferación de las células de la granulosa (70). El aumento en la expresión de estas proteínas, conlleva a la fosforilación de la proteína cinasa B

(PKB). La activación de la PKB, suprime la muerte celular al fosforilar a BAD, una proteína pro-apoptótica perteneciente a la familia Bcl-2 (71).

Se ha demostrado, que las IAPs inhiben de manera directa a las caspasas 3, 7 y 9. La inactivación de caspasa 9 a su vez, inhibe la señal apoptótica de Bax/citocromo C (72). Por el contrario, tanto el Factor transformante del crecimiento-beta 1 (TGF- β 1) como el TGF- β 2, así como el ligando Fas, inducen la muerte de ovocitos al modular la expresión de genes mitocondriales pertenecientes a la familia Bcl-2 (73, 74). Mas aún, ratones homocigotos para una delección del gen bcl-2, presentaron una reducción importante de folículos primordiales (75). De igual forma, estudios en los que se utilizaron ratones que presentaban una expresión alterada del gen anti-apoptótico Bcl-x y del pro-apoptótico Bax, demostraron que se requiere de una concentración específica de la proteína codificada por Bcl-x y de una expresión nula de Bax, para suprimir la apoptosis folicular (76).

JUSTIFICACIÓN

No obstante lo anteriormente descrito, el conocimiento existente acerca de los factores que participan en el ensamble y en el crecimiento temprano de los folículos primordiales es limitado, ya que en muchos casos, la función específica de los factores involucrados en la foliculogénesis y/o en el desarrollo folicular, así como la interacción entre dichos factores, no han sido dilucidados completamente. Más aún, es probable que diversos genes aún no identificados, estén involucrados en la comunicación entre las células somáticas y las células germinales para dar lugar a la formación de los folículos ováricos y a su posterior crecimiento. Por tal motivo, nos propusimos llevar a cabo un análisis mediante microarreglos de ADN, el cual se utilizó como punto de partida para identificar nuevos genes con expresión durante la foliculogénesis y las etapas tempranas del crecimiento folicular en el ovario murino.

OBJETIVO

Identificar a partir de un ensayo de microarreglos de ADN y caracterizar molecularmente, genes que presenten una expresión diferencial en las etapas en las que ocurre el ensamble y el crecimiento folicular independiente del estímulo gonadotrópico en el ovario murino.

HIPÓTESIS

Los genes seleccionados por su perfil de expresión diferencial en el microarreglo, están presentes durante los primeras 48 y 96 horas posnatales en el ovario murino, momento en que ocurren el ensamble y el crecimiento folicular, independiente del estímulo gonadotrópico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Se utilizaron 30 ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6J, adquiridos del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, EUA) y 5 ratones CD1, procedentes del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (23-25°C) y luz (12 hrs de luz/12 hrs de oscuridad). A todos ellos se les dio acceso *ad libitum* al alimento Purina Lab chow (Purina Co., St Luis MO, EUA) y se manipularon conforme a los lineamientos específicos para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio tanto de los Institutos Nacionales de Salud (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), como los estipulados en la Norma Oficial Mexicana 062-200-1999, publicada el 22 de agosto de 2001 en el Diario Oficial de la Federación. Asimismo, el protocolo experimental para la obtención del tejido ovárico, fue aprobado por los comités de Bioética, respectivos.

Los ovarios de crías de la cepa C57BL/6J se colectaron a las 16, 48 y 96 horas posnatales y se procesaron en forma adecuada para experimentos histológicos, de análisis en microarreglo, PCR semicuantitativo y northern blot. Asimismo, se colectaron ovarios de crías con 6 y 12 días posnatales, para experimentos de hibridación *in situ*. De igual forma, ovarios de fetos procedentes de la cepa CD1, se colectaron a los 13, 15, 18 y 19 días poscoito para experimentos de RT-PCR, así como a los 4 días posnatales para experimentos de hibridación *in toto*.

Métodos

Extracción de ARN

El ARN total de los ovarios de ratones de ambas cepas, se aisló utilizando la técnica de fenol ácido (77), con algunas modificaciones (78). Un promedio de 6 a 10 ovarios de cada grupo de edad, fueron colectados en un tubo cónico y congelados en hielo seco. Posteriormente, a cada grupo de ovarios, se le agregó 1 ml de una solución compuesta por fenol-tiocianato de guanidina (TRI Reagent, Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, EUA) y 10 μ l de β -mercaptoetanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). El tejido se homogenizó utilizando un homogenizador eléctrico (PowerGen 70, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA) y se incubó en hielo durante 5 minutos.

Para realizar la separación de fases, a cada homogenizado se le agregaron 100 μ l de bromo-cloro-propano. Esta mezcla se agitó vigorosamente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12,000 revoluciones por minuto (rpm), durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a otro tubo, y se agregó un volumen igual de etanol al 70%. Para la purificación del ARN, se utilizó un estuche específico (RNeasy Mini Kit, Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). El ARN se eluyó en 30 μ l de agua previamente tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

La concentración y pureza del ARN se determinó por espectrofotometría, mediante lecturas a 260 y 280 nm, para lo cual de cada muestra de ARN, se tomaron 2 μ l que se diluyeron en 98 μ l de agua con DEPC (relación 1:50). Asimismo, se corroboró la integridad del ARN total, por medio de electroforesis en un gel de formaldehído y agarosa al 1%.

Microarreglos de ADN

Con el fin de identificar ARN mensajeros con un perfil de expresión diferencial durante la formación y crecimiento folicular, empleamos un microarreglo de ADN que contenía 8,400 sondas (generadas a partir de una librería compuesta por 15,000 genes de ratón), las cuales fueron impresas por duplicado en portaobjetos de vidrio.

La síntesis del ADN complementario (ADNc) al ARN de ovarios colectados a las 16, 48 y 96 horas posnatales se llevó a cabo con el estuche comercial Micromax TSA labeling and detection kit (NEN Life Science Products, Inc., Boston, MA, EUA), siguiendo las instrucciones (79). Para ello, 5 µg del ARN total se desnaturalizaron a 65°C durante 10 minutos, después se realizó el alineamiento de los oligohexámeros(dT)₁₂₋₁₈ (0.1mM) a una temperatura de 25°C, durante 5 minutos. Posteriormente, a cada mezcla de reacción se agregó: deoxinucleótidos de uracilo marcados con conjugados de fluoresceína (para la síntesis del ADNc de ovarios colectados a las 16 horas posnatales) o con biotina (para la síntesis del ADNc de ovarios colectados a las 48 y 96 horas posnatales), a una concentración final de 10 mM, ditiotretitol (0.1M), una enzima inhibidora de ARNasas (40 U/µl) y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (Superscript II 200 U/µl) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Las reacciones se incubaron a 42°C durante una hora.

El ADNc sintetizado se purificó utilizando una columna con filtro (Microcon YM-100) (Milipore, Bedford, MA. EUA). Una alícuota de cada ADNc marcado con biotina, se combinó en un mismo tubo con una fracción del ADNc marcado con fluoresceína.

Los microarreglos se prehibridaron durante 30 minutos con conjugados de anti-fluoresceína/fosfatasa-alcalina y anti-streptavidina/fosfatasa-alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, EUA) en 600 µl de un amortiguador de bloqueo el cual contenía: Tris-HCl, 0.1 M (pH7.5), NaCl 0.15 M y suero de cabra al 10%. Luego se realizó la hibridación de los ADNc combinados contra los portaobjetos a una temperatura de 65°C por 16 horas. Al finalizar el proceso de hibridación, los portaobjetos se lavaron tres veces con un amortiguador de citrato y cloruro de sodio 20X y se agregó tiramida marcada con cianina en la posición tres (Cy3) y en la posición 5 (Cy5). La detección de la señal se logra mediante la precipitación de ambos colorantes. Esta reacción es catalizada por la fosfatasa alcalina conjugada a la anti-fluoresceína y a la anti-streptavidina, las cuales reconocen los conjugados de fluoresceína/biotina unidos a los ADNc. Dicha reacción enzimática indica de forma indirecta, la cantidad de ADNc presente en el portaobjetos.

Finalmente, los microarreglos se escanearon (ScanArray 4000XLs) (Perkin Elmer, Boston, MA, EUA) y las imágenes adquiridas se almacenaron en formato TIFF para su análisis. Las intensidades obtenidas se normalizaron, centralizaron y estandarizaron, utilizando el programa Genesight (ImaGene Biodiscovery, Marina del Rey, CA, EUA). Los genes con una expresión diferencial a las 48 y 96 horas 1.8 veces mayor con respecto a su expresión durante las primeras 16 horas posteriores al nacimiento, fueron procesados con el programa Omniviz (Maynard, MA, EUA). Por último, los genes con patrón de expresión temporal similar, se agruparon utilizando el algoritmo de promedios K del programa de computación J-Express 2.0 (De Nova, Vancouver, BC, Canada).

Los datos obtenidos a partir del microarreglo, se depositaron en el servidor Gene Expresión Ómnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) de la página electrónica del National Center for Biotechnology and Information (NCBI). El número para tener acceso a esta información es el GSE8528.

RT-PCR

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo empleando el estuche comercial Superscript-First-Strand kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme a las instrucciones descritas en el protocolo. Brevemente: 200 ng de ARN total (aislado de ovarios colectados en las etapas arriba mencionadas), se alinearon a 65°C durante 5 min con 0.5 µg de oligonucleótido poli-dT (0.5 µg/ µl) y 1 µl de una mezcla de dNTP's (10 mM). Posteriormente, la reacción se incubó durante 1 h a 42 °C con: amortiguador de reacción 10X, MgCl₂ (25 mM), 1 µl de una enzima inhibidora de ARNasas (40 U/µl), 2 µL de DTT (0,1M) y 50 unidades de la enzima transcriptasa reversa (Superscript II 50 U/µl) (Invitrogen, Life Technologies), en un volumen total de 20 µl. La reacción se terminó al incubarla a 70°C durante 15 minutos, seguido de 30 minutos a 37°C con dos unidades la enzima RNasa-H (2 U/µl).

Los experimentos de PCR semicuantitativo se realizaron utilizando el estuche QuantumRNA 18s Internal Standard Kit (Ambion, Austin, TX, EUA). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25 µl que contenía: 2.5 µl del amortiguador de reacción a una concentración final de 1X, dNTP's (0.1 mM) y 0.15 µl de *Taq* polimerasa (5 U/µl) (HotStar *Taq*, Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA), o bien 22 µl de PCR Supermix (Invitrogen Life Technologies), más 2.5 µl de la mezcla ARN ribosomal 18s/competidores en

una razón 3:7 y 1.0 μ l del producto de la transcripción reversa, alineado a 10 pmol de uno de 3 pares de oligonucleótidos específicos para la secuencia AK087669 (Tabla 1), cuyo nivel de expresión en el microarreglo mostró un incremento durante las 48 y 96 horas posnatales.

El protocolo de amplificación consistió de 5 minutos a 94°C (para activar a la polimerasa), seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, alineamiento a 58°C por 1 min, extensión de 1 min a 72°C y 10 min a esta última temperatura.

Finalmente, se realizó la electroforesis de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio, se tomó una fotografía del gel, se escaneó y la imagen obtenida se analizó por densitometría utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

Northern blot

Esta técnica se utilizó para analizar la expresión del ARNm correspondiente a la secuencia AK087669. Para ello, se aisló el ARN total de diferentes tejidos colectados de ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6J con dos días de edad. Posteriormente, el ARN poliadenilado se obtuvo con un estuche comercial (Micropoly A pure, Ambion, Austin, TX, EUA), siguiendo las instrucciones descritas por la compañía. Se realizó la electroforesis de 750 ng del ARN poliadenilado en un gel de formaldehído y agarosa al 1%, en amortiguador MOPS 1X (Acido N-morfolinopropanosulfónico) y se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond XL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) previamente humedecida en solución de sales y citratos (10X SSC). Luego se fijó a la membrana por exposición a rayos ultravioleta (120,000

Tabla 1. Oligonucleótidos complementarios a la secuencia del gen Fbxw15

Posición del oligonucleótido	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño del amplicon (pb)	Par
507 a 530 667 a 689 -6 a + 17	Sentido 5'-ATC-AAC-TAT-CAA-ACT-GTG-GGA-CTG-3', Antisentido 5'-AAT-ATG-GAG-TAA-AGG-TGT-CTG-TT-3' Sentido 5'-CTG-AAG-ATG-GCG-ATC-CAT-TTA-CC-3'	182	A
1413 a 1435 507 a 530	Antisentido 5'-CTT-TGA-GGA-AGA-GGA-TAC-ACA-AC-3' Sentido 5'-ATC-AAC-TAT-CAA-ACT-GTG-GGA-CTG-3'	1441	B
830 a 853	Antisentido 5'-AGG-ATA-ATT-TGA-GAA-CGG-TAG-ACA-3'	347	C

μ Joules durante 35 seg), empleando un aparato para entrecruzamiento (Stratagene, San Diego, CA, EUA) y se prehibridó durante dos horas a 60°C en un amortiguador compuesto por 7.5 ml de formamida, 2.25 ml de solución Denhardt (50X), 1.5 ml de EDTA 10 mM, 0.15 ml de SDS al 10%, 3.0 ml de SSC 20X y 1.5 ml de ADN de esperma de salmón (1 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

La sonda de ARN se sintetizó a partir de la transcripción *in vitro* de 500 ng de un fragmento linearizado de 346 pb correspondiente al ADNc de AK087669 (Tabla 1), subclonado en el plásmido pGEM-T Easy (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para lo cual, el templado se incubó durante 45 min a 37°C con: 2 μ l de amortiguador de transcripción 5X, 1 μ l de DTT (1M), 2 μ l de rNTP's, 1 μ l de UTP (100 mM), 0.5 μ l de una enzima inhibidora de ARNasas (40 U/ μ l), 1 μ l de una enzima polimerasa T7 (Invitrogen Life Technologies) y 100 μ Ci de 32 P-UTP. Una vez sintetizada la sonda, ésta se filtró a través de una columna de Sefadex (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). Posteriormente, la membrana se incubó con 33.14 μ l (15×10^6 cpm/ml) de la sonda purificada, durante 16 horas a 65°C. Luego se lavó con amortiguador 0.1 X SSC y SDS al 0.1%, con agitación a 65°C, cuatro veces, 15 min cada vez. Finalmente, la membrana se expuso a una placa auto radiografica (Kodak, Rochester, NJ, EUA) a -85°C durante una semana. Una vez detectada la señal y con el fin de remover todo rastro de radioactividad, la membrana se lavó con amortiguador de SDS al 0.1% durante 5 min a 90°C y se hibridó contra una ribosonda para ciclofilina de ratón (1.5×10^6 cpm/ml), como control interno.

Clonación por PCR

Se amplificó la región codificante correspondiente al gen AK087669 a partir del ADNc de ovarios de ratones hembra con dos días posnatales. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 25 µl que contenía: 1 µl del templado, 22 µl de PCR supermix (Invitrogen Life Technologies) y 10 pmol del par B de oligonucleótidos (Tabla 1), utilizándose las condiciones de PCR arriba descritas. Posteriormente, se llevó a cabo la electroforesis de los productos de la PCR en un gel de agarosa al 2% y las bandas correspondientes se purificaron utilizando el estuche comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA, EUA). Los productos purificados se analizaron en un secuenciador automático Applied Biosystems DNA Sequencer modelo 377, empleando el estuche comercial Big Dye Terminator Sequencing Reaction Kit version 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación automática se compararon contra el banco de datos GenBank del NCBI por medio de BLAST. Asimismo, la secuencia de aminoácidos correspondiente se analizó con el programa Pfam (<http://pfam.janelia.org/>) (80) y el programa de alineamientos múltiples Clustal W (81).

De igual forma, se generaron por medio de la PCR, un epítotope de reconocimiento en la porción carboxilo terminal de la región codificante y sitios para las enzimas de restricción Nhe I en el extremo 5' y Xba I en el extremo 3'. Para ello se mezclaron en un volumen final de 25 µl: 2.0 µl del producto de la transcripción reversa, 25 pmoles de los oligonucleótidos sentido y antisentido, cuyas secuencias son:

5'(ACGCTGCTAGCACTGAAGATGGCGATCCATTTAC)3' y

5'(CGGTCTAGATCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCAGAGCAGATGTTC AAGGCATAT)3', respectivamente, dNTP's (0.1mM), 2.5 µl de amortiguador de reacción a una concentración final de 1X y 0.15 µl de la enzima *Taq* polimerasa (5 U/µl) (HotStar Taq, Qiagen, Inc., Valencia, CA, EUA). Se utilizaron 35 ciclos de amplificación y una temperatura de 60°C en la etapa de alineamiento. El producto de la PCR se ligó dentro del vector pGEM-T (Promega, Madison, WI, EUA) al mezclar 5 µl del primero con 7 µl de amortiguador de reacción 2X, 1 µl del vector (50ng/µl) y 1 µl de una enzima T4 ADN ligasa (3 U/µl) (Promega). Esta reacción se incubó durante 17 horas a 14°C. Por otro lado, se incubaron células competentes (100 µl) (SCS 110 Dam⁻) en hielo durante 10 minutos con 1.7 µl de β-mercaptoetanol (25 mM) (Stratagene, La Joya, CA, EUA). Posteriormente, a la mezcla anterior, se agregaron 10 µl del producto de ligación y la solución se incubó en hielo por 30 min, después a 42°C por 45 segundos y de nuevo en hielo por 2 min. Se agregaron 900 µl de medio de cultivo SOC (Invitrogen Life Technologies) y el tubo se agitó durante una hora a 37°C; 200 µl de la solución anterior, se sembraron en una placa de agar cubierta previamente con 20 µl de ampicilina (25 mg/ml), 25 µl de isopropil-beta-D-tiogalactopiranosida (IPTG) y 125 µl de X-galactosidasa al 2% (Sigma). La placa se incubó durante 24 horas a 37°C. Las colonias se seleccionaron utilizando el método cromogénico (82); 10 de ellas se incluyeron en 6 ml de medio de cultivo LB con 20 µl de ampicilina (25 mg/ml) y se incubaron con agitación a 37°C por 16 horas. El ADN plasmídico de los 10 cultivos se purificó utilizando una solución compuesta por NaOH 1N, amortiguador de Tris-EDTA, SDS al 2% y acetato de sodio 3 M (pH 5.2). La identificación del inserto se realizó por medio de análisis con enzimas de restricción. Para ello, se llevó a

cabo la digestión con las enzimas pertinentes (Nhe I y Xba I), de 1 μ l de cada uno de los plásmidos purificados en una reacción que contenía: 2 μ l de amortiguador 10X, 1 μ l de cada enzima (10 U/ μ l) (Promega) y 15 μ l de agua estéril para completar un volumen final de 20 μ l. La reacción se incubó a 37°C durante 2 horas.

Posteriormente, se realizó la electroforesis de los productos de la digestión en un gel de agarosa al 1%. El ADN de cuatro de los 10 plásmidos se purificó utilizando un estuche específico (QIAGEN miniprep). La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotometría mediante lecturas a 260 y 280 nm, para lo cual de cada producto purificado, se tomaron 5 μ l que se diluyeron en 195 μ l de agua estéril (relación 1:40). Finalmente, la secuencia de los insertos se confirmó por medio de secuenciación automática. Uno de ellos se subclonó en el vector de expresión pcDNA 3.1/zeo (Invitrogen Life Technologies); para ello se mezclaron 20 μ g de la construcción molecular pGEM-T/AK087669 se mezclaron con 5 μ l de las enzimas Nhe I y Xba I (10 U/ μ l), 10 μ l de amortiguador de reacción a una concentración final 1X (Promega) y agua estéril para completar un volumen final de 100 μ l. De igual forma, 2.0 μ g del vector de expresión pcDNA 3.1/zeo + se mezclaron con 5 μ l de cada una de las enzimas mencionadas anteriormente, 10 μ l de amortiguador de reacción 10X y agua estéril para completar un volumen final de 100 μ l. Ambas reacciones se incubaron a 37°C durante 2 horas. Posteriormente, el vector que incluía al ADNc de AK087669, se fosforiló con 10 U de una enzima T4 polinucleótido-cinasa (10 U/ μ l), 2 μ l de riboadenosina trifosfatada (10mM) y 10 μ l de amortiguador de reacción 10X (Promega). El producto fosforilado se incubó a 37°C durante media hora y posteriormente, se llevó a cabo la

electroforesis de los 113 μl de reacción en un gel de agarosa al 1%. El fragmento correspondiente al ADNc se separó del gel y se purificó utilizando el estuche GENE CLEAN turbo (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA). La concentración del ADNc se determinó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%, al comparar la intensidad de la banda correspondiente al producto purificado contra una escalera de masa.

Por otro lado, el vector de expresión pcDNA 3.1/ zeo + se desfosforiló al incubarlo a 37°C durante media hora con 10 μl de una enzima fosfatasa alcalina (1 U/ μl) y 10 μl de amortiguador de reacción 10X (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, EUA). Posteriormente, el vector se purificó con 100 μl de fenol y 100 μl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Esta mezcla se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min, el sobrenadante se transfirió a microtubos de 1.5 ml y se repitió el proceso. Con el fin de precipitar el ADN, se añadieron 50 μl de acetato de amonio (7.5 M), 375 μl de alcohol absoluto, 0.5 μl de glicógeno y se almacenó a -20°C durante 16 horas. El ADN precipitado se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C, se lavó con 1 ml de alcohol al 70%, se secó en una centrífuga al vacío y se disolvió en 12 μl de agua estéril.

La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotometría mediante lecturas a 260 y 280 nm, para lo cual de cada producto purificado, se tomaron 2 μl que se diluyeron en 100 μl de agua estéril (relación 1:50).

Con el fin de realizar la subclonación del ADNc del gen AK087669 en el vector de expresión pcDNA 3.1/zeo+, ambos productos purificados se mezclaron en una reacción que contenía: la cantidad necesaria tanto del ADNc correspondiente al gen AK087669, como del vector de expresión para una relación molecular de 10 a 1, 1.5 μl de amortiguador de reacción 2X, 1.5 μl de

riboadenosina trifosfatada (10mM), 1.5 μ l de DTT (0.1M) y 1 μ l de una enzima T4 ADN ligasa (3U/ μ l) (Promega). Esta reacción se incubó durante 24 horas a 4°C. Las células competentes (100 μ l) (XL-Blue, Stratagene), se transformaron con 7.5 μ l del producto de ligación al incubar esta mezcla en hielo por 30 min, después a 42°C por 2 min y de nuevo en hielo durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 300 μ l de medio de cultivo; el tubo se agitó durante una hora a 37°C y se centrifugó a 1,000 rpm por un tiempo de 10 min.

El sobrenadante se desechó y el botón celular se resuspendió en 200 μ l de medio de cultivo fresco. La suspensión anterior, se sembró en una placa de agar cubierta previamente con 50 μ l de ampicilina (25 mg/ml), 25 μ l de IPTG y 125 μ l de X-galactosidasa al 2%. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C. Las colonias se seleccionaron utilizando el método cromogénico, 20 de ellas se incluyeron en 6 ml de medio de cultivo con 20 μ l de ampicilina (25 mg/ml) y se incubaron con agitación a 37°C por 16 horas. Posteriormente, se llevó a cabo la digestión de 1 μ l de cada uno de los cultivos, con 10 U de las enzimas Nhe I y Apa I, 2 μ l de amortiguador 10X, (Promega) y 15 μ l de agua estéril para completar un volumen final de 20 μ l. Los tubos se incubaron a 37°C durante 2 horas.

La identificación del inserto se realizó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN de uno de los 20 plásmidos analizados, se purificó utilizando un estuche específico (QIAGEN maxiprep). La concentración y pureza del ADN se determinó por espectrofotometría mediante lecturas a 260 y 280 nm, para lo cual del producto purificado, se tomaron 2 μ l que se diluyeron en 100 μ l de agua estéril (relación 1:50).

Finalmente, la secuencia del inserto se confirmó mediante secuenciación automática.

Western blot

Para determinar si la región codificante del gen AK087669 traduce una proteína, células COS-7 se transfectaron en forma transitoria con la construcción molecular pcDNA 3.1/zeo/AK087669. Para ello, las células (2.5×10^6 células por placa) se sembraron en placas de poliestireno de 10 cm (Falcon, Becton Dickinson, Franklin lakes, NJ, EUA) a un 80% de confluencia, en 10 ml de medio esencial mínimo Dulbecco (DME-F12) sin antibiótico, enriquecido con suero fetal bovino al 10% (Hi Clone, Logan, UT, EUA). Posteriormente, se transfectaron con 500 ng de la construcción pcDNA 3.1/zeo/AK087669, o bien con el vector vacío (pcDNA 3.1 Zeo), utilizando un agente de transfección lipofílico (Lipofectamine 2000, Invitrogen Life Technologies) y se incubaron a 37°C durante 48 horas. La mezcla de transfección se removió por succión y las células se desprendieron de la placa con la ayuda de una espátula plástica. Después, se centrifugaron y el botón celular se lisó con un amortiguador de baja fuerza iónica que contenía: HEPES 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM, KCl 10 mM, aprotinina 10 μ l /ml, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil 10X (PMSF), DTT 0.5 mM, un inhibidor de proteasas (10 mM) (Sigma) y agua para completar un volumen final de 10 ml. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (83) (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA, EUA). Se realizó la electroforesis de 30 μ g por pozo del homogenizado proteico en un gel desnaturizante de triglicina 4-20% (Invitrogen, Life Technologies), el cual se colocó dentro de una

cámara vertical que contenía 700 ml de amortiguador SDS/PAGE 1X. La electroforesis se interrumpió 5 hrs después y las proteínas se transfirieron durante 4 hrs a una membrana PVDF (Immobilon-P) (Millipore, Billerica, MA, EUA), previamente activada con metanol y equilibrada en amortiguador de triglicina y metanol al 20%. Con el fin de bloquear las uniones no específicas, la membrana se sumergió durante una hora y media, en leche sin grasa, disuelta al 5% en amortiguador TBS-T (Tris 10 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 0.05%).

Posteriormente, la membrana se incubó durante 16 hrs a 4°C con el anticuerpo monoclonal específico para el epítoto de reconocimiento (M2 Sigma), diluído 1:1,000 en 10 ml de TBS-T y leche al 5%. Luego se lavó en amortiguador TBS-T, 15 veces durante 15 min cada vez. Posteriormente, se incubó durante 1 hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón-HRP (Invitrogen Life Technologies), el cual se utilizó a una dilución de 1:25,000.

La membrana se colocó sobre una hoja de acetato y se agregaron 5 ml de una solución de peróxido y luminol. Para detectar la reacción quimioluminiscente, la membrana se expuso a una placa autoradiográfica durante 5 min. Finalmente y para llevar a cabo el inmunoblot del control positivo, se removió el anticuerpo secundario al lavar la membrana durante 2 hrs a 55°C en un amortiguador de Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, que contenía 2-Mercaptoetanol (100mM) y SDS al 2%. Posteriormente, se bloqueo y se incubó con el anticuerpo monoclonal contra GAPDH (AbCAM, Cambridge, MA, EUA) a una dilución 1:40,000 y después con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón-HRP, a una dilución de 1:25,000 durante dos horas a temperatura ambiente.

Las reacciones se visualizaron empleando el reactivo ECL (Perkin Elmer, Life Science, Boston, MA, EUA).

Análisis histológico

Los ovarios colectados a las 16, 48 y 96 horas posnatales (tres pares de ovarios por edad), se fijaron durante dos horas, en una solución de Kahle compuesta por formaldehído, ácido acético glacial (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, EUA) y alcohol en una proporción 18:1:1, más glicerol al 5%. Posteriormente, el tejido se lavó tres veces con un amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M (pH 6.8) (Sigma) y se transfirió a una solución de etanol al 70%. Previo a la cobertura con parafina, el tejido se deshidrató en diferentes concentraciones de alcohol (70-100%). Una vez embebido en parafina, se realizaron cortes (6 μ m), los cuales se montaron en portaobjetos. Con el fin de desparafinar el tejido, éste se sumergió en xileno durante dos minutos, posteriormente en alcohol absoluto y finalmente en agua bidestilada. Para la tinción del tejido, se utilizó hematoxilina férrica (Sigma). Los cortes procesados se analizaron mediante microscopía de luz.

Hibridación *in situ*

Se empleó la técnica descrita por Simmons y cols. (84), con algunas modificaciones (85). Las ribosondas específicas marcadas con ^{35}S -UTP (hibridación en secciones de tejido), o bien con digoxigenina (DIG) (hibridación *in toto*), se sintetizaron conforme a lo descrito en párrafos anteriores, empleando 500 ng de ADNc, marcado con 250 μ Ci de ^{35}S -UTP (Perkin Elmer

Life Science) y 750 ng de ADNc marcado con DIG-UTP (Roche Diagnostics, Indiana, IN, EUA), respectivamente.

La hibridación con sonda radioactiva se realizó en cortes de tejido ovárico (14 μm de espesor), colectado a las 16, 48, 96, 144 horas y 12 días postnatales, fijado previamente durante 16 hrs a 4°C, en una solución de formaldehído al 4% disuelto en amortiguador de borato sódico 0.1M, pH 9.5 (Sigma) y posteriormente a 4°C durante 16 horas en un amortiguador de fosfatos y sacarosa al 10%. Previo a la hibridación, los cortes se incubaron con una solución de proteinasa K al 0.001% en un amortiguador de Tris (1M) pH 8.0 y EDTA (0.5M), durante 30 minutos a 37°C, lavándose con 250 ml del mismo amortiguador y luego pre-equilibrándose con 25 ml de Trietanolamina (TEA) (0.1M) pH 8.0, disuelta en 225 ml de agua con DEPC (Sigma). Con el fin de bloquear cargas eléctricas positivas, el tejido se incubó con ácido acético anhidro (0.0025%), disuelto en amortiguador TEA. Posteriormente se lavó dos veces durante 2 minutos, en solución de sales y citratos (SSC) a una concentración 2X y se deshidrató en concentraciones crecientes de alcohol.

Los cortes de ovario se secaron al vacío dentro de una cámara durante 24 horas y posteriormente, a cada serie se le agregó 70 μl de amortiguador de hibridación, el cual contenía la sonda marcada con el isótopo radioactivo y se incubaron dentro de una cámara húmeda a 55°C, durante 24 horas. La poshibridación consistió en una serie de lavados en concentraciones decrecientes del amortiguador de sales y citratos y concentraciones crecientes de alcohol. De nuevo, los cortes de tejido se secaron al vacío durante 30 min y por último, se expusieron a la emulsión NTB2 (Roche, Indianápolis, IN, EUA). La señal de hibridación se reveló tres semanas después. Finalmente, los cortes

fueron contrateñidos con hematoxilina (Sigma), deshidratados en concentraciones crecientes de alcohol y cubiertos con vidrio. Los portaobjetos con los cortes de tejidos se observaron en un microscopio con contraste de fases (Zeiss Axioplan, Carl Zeiss, Jenna, Alemania).

Hibridación *in toto*

Se empleó la técnica descrita por Wilkison y cols. (86), con algunas modificaciones. Para llevar a cabo este ensayo, se extrajeron ovarios de ratones pertenecientes a la cepa CD1 con cuatro días de edad. El tejido colectado se lavó con un amortiguador de fosfatos (PBS) frío, preparado con agua tratada previamente con DEPC. Inmediatamente después, se fijó en una solución de paraformaldehído al 4%, disuelto en el mismo amortiguador (Sigma) y se almacenó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, los ovarios fijados se lavaron con PBS frío durante 5 minutos y después con PBS-Tween 20 (PBT) (Sigma) por 5 minutos. La deshidratación se llevó a cabo con concentraciones crecientes (25-100%) de metanol-PBT y los ovarios se almacenaron a -20°C. Posteriormente, los ovarios se rehidrataron con concentraciones decrecientes de metanol-PBT, finalizando con dos lavados en PBT durante 5 minutos cada uno. Previo a la permeabilización, los ovarios se colocaron durante una hora, en una solución de peróxido de hidrógeno al 6% en PBT, seguido de un lavado en PBT por 5 minutos. Después, el tejido se incubó con una solución de proteinasa K (60 µg/ml) (Promega) en PBT, durante 10 minutos a 20°C. Luego se fijó durante 20 minutos en una solución de paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 0.2% (Sigma). El exceso de fijador en el tejido, se removió con dos lavados en PBT durante 5 minutos. Los ovarios

se prehibridaron durante 3 horas a 65°C, con un amortiguador compuesto de: formamida al 50%, solución SSC a una concentración 5X y pH 7.0, sulfato dodecil sódico (SDS) al 1%, ARN de transferencia (50 µg/ml) y heparina (10 mg/ml) (Sigma). Posteriormente, al tejido ovárico se le agregaron 5 ml del amortiguador de hibridación, el cual contenía la ribsonda marcada con digoxigenina y se incubó dentro de una cámara seca a 68°C, durante 24 horas.

La poshibridación consistió en una serie de lavados e incubación con el anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics). Brevemente: el tejido se incubó durante dos horas a 67°C con una solución (solución 1), precalentada a la misma temperatura, compuesta de formamida al 50%, SSC 4X y SDS al 1%. Después se añadió una mezcla de la solución mencionada anteriormente y la solución 2 compuesta por NaCl 0.5M, Tris 10 mM, pH 7.4 y Tween-20 0.1% y se incubó durante 10 min a 70°C. Posteriormente tres veces en la solución 2, durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente y después durante una hora y 10 minutos a 37°C. Luego, se agregó al tejido durante 40 minutos a 65°C, la solución 3 compuesta de: formamida al 50% y SSC 2X.

Previo a la incubación con el anticuerpo, el tejido se lavó tres veces, durante 10 minutos cada vez, con TBST (Tris-HCl, 50 mM, pH7.4, NaCl 150mM, KCl 10mM y tritón 1%) y levamisol al 2mM. Después se llevó a cabo el bloqueo de uniones inespecíficas al añadir al tejido, suero fetal bovino al 10%, disuelto en TBST y levamisol. El proceso de bloqueo, se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente y agitación horizontal.

Finalmente, el tejido se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina, a una concentración 1:2,000 a 4°C, durante toda la noche.

Posteriormente, el tejido se lavó con TBST y levamisol (Solución que inhibe las fosfatasa endógenas), durante 10 minutos, 16 veces. Después dos veces durante 15 minutos cada vez, con NTMT (Tris-HCl 50 mM, pH 9.5, MgCl₂ 50 mM, NaCl 20 mM, Tween-20) y levamisol 1mM. Con el fin de observar la reacción, se añadió al tejido el substrato de la fosfatasa alcalina, denominado BM-púrpura (Roche). La reacción fue monitorizada durante tres días hasta que se observó el precipitado color púrpura en el tejido. Finalmente, al tejido le fue añadido NTMT dos veces durante 15 minutos cada vez y posteriormente, PBS durante 1 minuto, tres veces. El tejido se almacenó con glicerol y PBS 1:1 (v/v) a 4°C.

La reacción de hibridación se observó con la ayuda de un microscopio de luz (Carl Zeiss, Alemania) y la precipitación de la señal a nivel celular se detectó en cortes del tejido embebido en parafina.

Análisis estadístico

La expresión del ARNm correspondiente al gen AK087669 se cuantificó por densitometría. Los resultados obtenidos a partir de la razón entre la expresión relativa del gen de estudio y la expresión relativa del gen constitutivo 18s, se analizaron empleando ANOVA de una vía y prueba de Student-Neuman-Keuls. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

Desarrollo folicular en la cepa de ratones C57BL/6J

Inicialmente y debido a que estudios realizados por Canning y cols. (2003), indican que el ensamble y desarrollo folicular, difiere entre cepas murinas (87), llevamos a cabo el análisis histológico de ovarios de ratones C57BL/6J con 16, 48 y 96 horas de edad. Como se muestra en la Figura 3, los ovarios de esta cepa colectados durante las primeras 16 horas posnatales, sólo presentaron ovocitos en cordones ovígeros distribuidos en la región interna del ovario (flechas en panel A, imagen en aumento en panel D). A las 48 horas posnatales, se pudo distinguir ya la presencia de folículos primordiales (panel B, flechas largas; imagen en aumento en panel E) y a las 96 horas, se observaron folículos primarios conformados por células de la granulosa cuboides circundantes a un ovocito (flechas cortas, panel C, imagen en aumento en panel F).

Análisis por microarreglos de ADN

Con base en lo anterior, se aisló el ARN de ovarios de ratones C57BL/6J, colectados durante las primeras 16 horas después del nacimiento, cuando los folículos aún no se han formado, a las 48 horas (inicio del ensamble folicular) y a las 96 horas, cuando los folículos primarios y secundarios ya están presentes.

El ARN de tres grupos de 6 a 10 ovarios cada uno, colectados en las etapas arriba descritas, se hibridó contra un microarreglo de ADN conformado por 8,400 sondas impresas en duplicado; empleándose un total de 12 microarreglos.

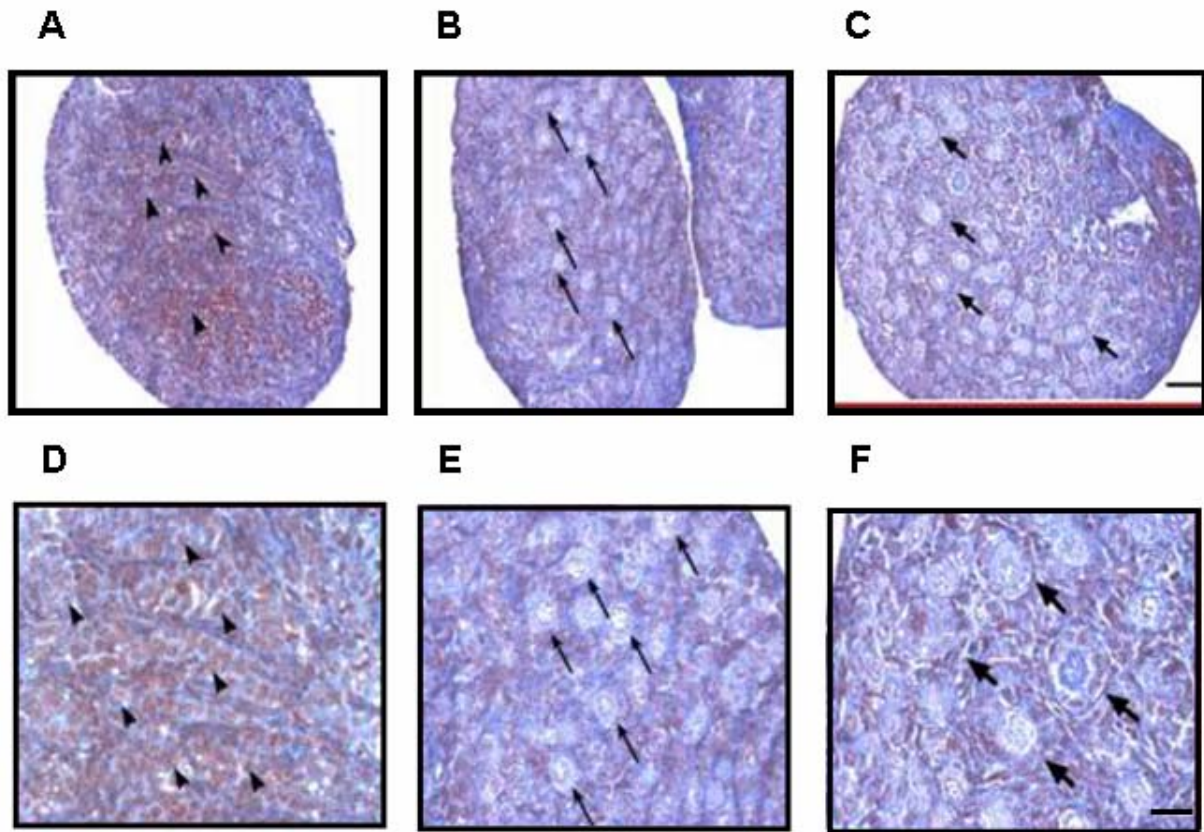


Figura 3. Imágenes representativas del análisis histológico de ovarios de ratones C57BL/6J colectados a las 16, 48 y 96 horas posnatales. A) Durante las primeras 16 hrs posteriores al nacimiento, se observó únicamente la presencia de ovocitos incluidos en los cordones ovígeros conformados por las células mesenquimales circundantes (cabezas de flechas). B) En los ovarios de ratones C57BL/6J colectados a las 48 horas posnatales, se encontró la presencia de folículos primordiales (flechas largas). En el panel C se evidencia el crecimiento folicular temprano al presentarse a las 96 horas folículos primarios (flechas cortas). D), E), F) Imágenes representativas en mayor aumento de los paneles A, B y C. Barra en C= 100 μ m; en F= 20 μ m.

El análisis por medio del programa de computación J-Express, conformó 49 grupos de acuerdo al patrón de expresión de los genes durante el desarrollo folicular (Figura 4), de los cuales, uno incluyó secuencias que presentaron una disminución consistente en su expresión a las 48 y 96 horas posnatales y 3 grupos incluyeron secuencias que presentaron un aumento consistente en su expresión durante estas dos etapas.

El grupo 6-5, contenía 62 genes que mostraron una disminución en su expresión menor o igual a 1.8 veces con respecto a su expresión durante las primeras horas posnatales. En este grupo se identificaron 19 secuencias correspondientes a genes con funciones conocidas, cuyas proteínas están involucradas en el metabolismo celular y el transporte iónico. Entre ellas se encontraron: la sintrofina 1, la centrina 4, la proteína con dedos de zinc 42, la proteína inhibidora de serina-proteasas 1-5, la proteína con caja F y repetidos de leucina 10, una GTPasa específica de células T, el receptor para el ácido hialurónico CD44, presente en las células del cumulus, involucrado en la maduración del ovocito (88) y el factor de crecimiento 2 similar a la insulina, cuyo perfil de expresión durante el ensamble y desarrollo folicular, ha sido reportado previamente (89).

Por el contrario, el grupo 1-7, incluyó 58 genes cuya expresión se incremento en forma moderada (<1.8-3 veces) a las 48 horas y 1.9 a 5.7 veces, a las 96 horas posnatales. La mayoría de los genes presentes en este grupo, constituyeron ESTs (expressed sequence tags) y ADNs complementarios con función desconocida. Entre los genes con función conocida se encontraron dos secuencias que codifican para las ubiquitinas B y C, respectivamente, involucradas en la proteólisis (90) y varios genes con expresión selectiva en los

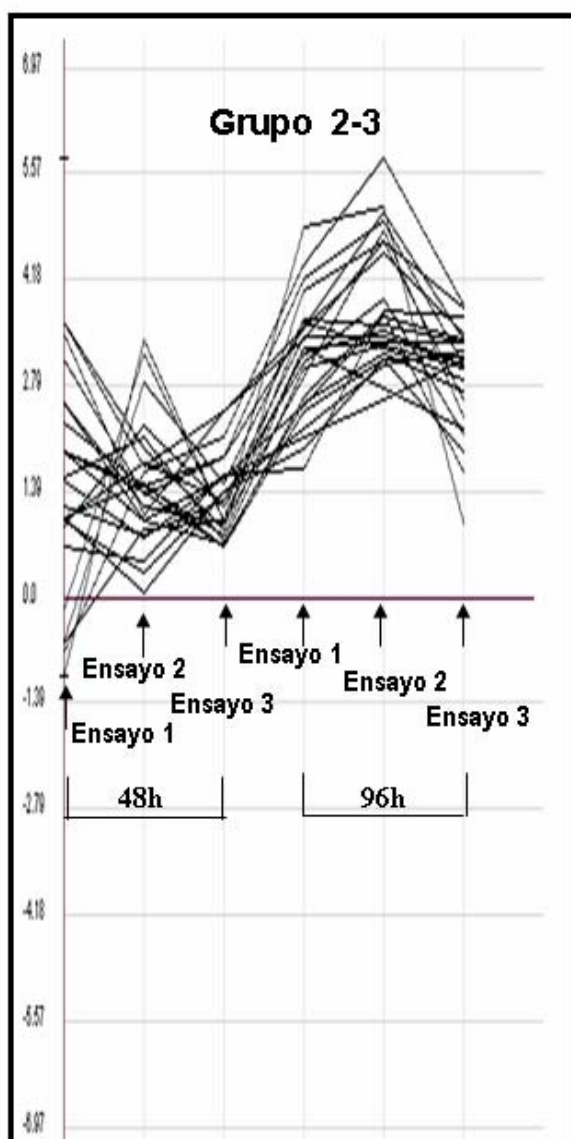


Figura 4. Conformación mediante el programa de computación J-Express de 49 grupos de genes, con base en patrones de expresión temporal similares durante las 48 y 96 horas posnatales, representados por las líneas azules horizontales en cada cuadro. Las líneas azules verticales representan el error estándar en cada microarreglo (las primeras tres corresponden a la comparación de los niveles de expresión de las secuencias a las 48 horas vs los niveles de expresión a las 16 horas posnatales y las siguientes líneas indican el triplicado para la comparación de los niveles de expresión a las 96 horas vs la expresión a las 16 horas posnatales). La línea roja esquematiza la expresión de todas las secuencias, durante las primeras 16 horas después del nacimiento. Los dos grupos enmarcados en rojo, incluyen secuencias que presentaron un aumento en su expresión 1.8 veces mayor a las 48 y 96 horas posnatales. El grupo enmarcado en amarillo incluye 24 secuencias, entre ellas el gen caracterizado molecularmente Fbxw15, cuyos niveles de expresión aumentaron más de 1.8 veces. El grupo enmarcado en verde incluye a 64 secuencias con niveles de expresión 1.8 veces menor con respecto al detectado durante las primeras 16 horas posnatales. ID= número del grupo, n= número de genes incluidos en el grupo.

ovocitos como el gen 4 de translocación de las células B (91) y 4 secuencias (Nlrp4a, Nlrp4f, Nlrp9a y Nlrp9b) que codifican miembros de la familia de proteínas NACH con repetidos de leucina y dominios pirínicos homólogos a MATER, un factor de transcripción presente en etapas tempranas del desarrollo embrionario (92). De igual forma, el grupo 2-7 también incluyó 58 genes con expresión elevada a las 48 y 96 horas posnatales; al igual que en el grupo anterior, la mayoría de las secuencias constituyeron ESTs y ADNs complementarios, con excepción de seis genes correspondientes a: la proteína ovocito- específica BMP15, una peptidilarginina deiminasa denominada ePAD, posiblemente involucrada en la reorganización del citoesqueleto de ovocitos y embriones en edad temprana (93), la proteína cinasa 1, la proteína antiapoptótica Bcl2-L-10 (94) y la 2'-5' oligoadenilato sintetasa 1C, que se incluyó en este grupo y en el que se describe a continuación.

El grupo 2-3 (Figura 5), contenía 24 secuencias cuya expresión también incrementó en forma consistente a las 48 y 96 horas posnatales, en comparación con su expresión durante las primeras horas después del nacimiento. De las 24 secuencias, 5 estaban repetidas dos o tres veces dentro del grupo, lo que indica que los resultados obtenidos en los duplicados para cada ensayo fueron consistentes.

A diferencia de los grupos anteriores, la mayoría de los genes representados dentro del grupo 2-3 constituyeron genes con función conocida. Dentro de ellos se identificó Gdf9, el cual como ya se mencionó anteriormente, participa en la transición del folículo primario al secundario (42). Asimismo, se identificaron tres genes que codifican para miembros de la familia de las oligoadenilato sintetisas (OAS 1C, 1D y 1E), enzimas que participan en la

A**B****Proteínas**

BG083112: ESTs
 BG080498: M. musculus Riken cDNA 1700124P09 transcript variant 3
 BG068427: M. musculus NLR family, pyrin domain containing protein 14
 BG068530: M. musculus NLR family, pyrin domain containing protein 14
 BG067465: M. musculus NLR family, pyrin domain containing protein 14
 BG080810: M. musculus 2'-5' oligoadenylate synthase 1E
 BG067959: Expressed sequence AU014713
 BG069167: M. musculus expressed sequence AU024076
 BG067640: M. musculus Gdf9
 BG081269: Predicted: M. musculus Riken cDNA 1700124P09 transcript variant 3
 BG068909: M. musculus 2'-5' oligoadenylate synthase 1D
 BG080903: M. musculus 2'-5' oligoadenylate synthase 1C
 BG067464: Predicted: M. musculus cDNA sequence BC063263
 C85331: Predicted: M. musculus AU024076
 BG081034: M. musculus phospholipase A2 (Pla2g4C)
 BG080261: M. musculus Gdf9
 C86021: M. musculus Gdf9
 BG067915: M. musculus in vitro fertilized eggs cDNA, H1 histone, oocyte specific
 BG080607: 98% similar to lpr1 o intracellular pathogen resistance 1
 BG068104: Predicted: M. musculus expressed sequence AU024076
 BG068435: 93% identical to oogenesis 1, mRNA
 BG067232: M. musculus Riken cDNA E330034G19 gene
 BG068334: M. musculus Riken cDNA E330034G19 gene
 BG067812: M. musculus Riken cDNA E330034G19 gene

Figura 5. A) Representación esquemática del grupo conformado por 24 secuencias cuyos niveles de expresión aumentaron 1.8 veces durante las 48 y 96 horas posnatales, en comparación con sus respectivos niveles en las primeras 16 horas posteriores al nacimiento. La línea recta horizontal representa el nivel de expresión de todas las secuencias durante las primeras 16 horas. El grupo de líneas arriba de la línea horizontal representa los niveles de expresión durante las 48 y 96 horas posnatales de cada una de las secuencias que conforman este grupo. Las flechas indican los vértices representativos de los tres microarreglos para cada comparación; i.e. expresión a las 48 horas vs expresión a las 16 horas posnatales y expresión a las 96 horas vs expresión a las 16 horas posnatales. B) Listado de los genes que incluye el grupo esquematizado en panel A.

cascada de señalización que induce el interferon gama (95); una histona específica de las células germinales, la histona H1oo1 que regula la transcripción génica en los ovocitos y esta asociada al inicio del crecimiento de los mismos (96) y una fosfolipasa A2, ovario-específica, posiblemente involucrada en la remodelación de la membrana nuclear (97).

De igual forma, este grupo incluía 7 genes que hasta el momento no han sido caracterizados; entre ellos, una secuencia con número de identificación BG068427, idéntica a una proteína NTPasa con repetidos de leucina, específica de las células germinales, perteneciente a la familia NACHT (98); otra secuencia (BG067959) 100% homóloga al gen Ndg1, el cual codifica para una proteína corriente abajo de NUR77, esta última involucrada en la activación de caspasas y en la inducción de apoptosis (99); otra más con número BG068435, la cual presentó un 93% de homología con Oog1, gen que se expresa específicamente en los ovocitos y en embriones en etapa de blástula (100). Asimismo, se identificaron otras tres secuencias, que no presentaron homología con genes conocidos. Finalmente, se identificó la secuencia BG083112, cuyo nivel de expresión representó el de mayor incremento en el grupo, la cual mostró 100% de homología con un ADNc (número de acceso AK087669), identificado en una librería procedente de un ratón hembra gestante.

El análisis por medio del programa de computación Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>), indicó que la secuencia de aminoácidos, correspondiente al gen AK087669, codifica una proteína con un dominio de caja F. Aún cuando la proteína putativa, se designó inicialmente como una proteína FBXW; es decir una proteína con dominio de caja F en el

extremo amino-terminal y repetidos de ácido aspártico (D) y triptófano (W) en su porción carboxilo terminal (101). Un estudio realizado por Paillisson y cols. (2005) (102), clasificó a dicha proteína como una FBX0, nomenclatura específica para proteínas con dominio de caja F en el extremo amino-terminal y ausencia de dominios conocidos en el extremo carboxilo-terminal. El gen que traduce dicha proteína se localizó dentro de un grupo de genes que codifican para proteínas con clasificación de FBXOs. Este grupo de genes se localiza en el cromosoma 9F2 del genoma del ratón, todos ellos con expresión exclusiva en el ovario y con un alto índice de homología entre ellos.

El dominio de caja F característico de estas proteínas se identificó inicialmente en la ciclina F, comprende aproximadamente 40 amino ácidos del extremo amino-terminal, cuya función es unir a dicha proteína con otro de los miembros (la proteína Skp1), del complejo E3 ubiquitina ligasa, el cual participa en el proceso proteolítico mediante ubiquitinación (103). El extremo carboxilo-terminal, es el responsable de la identificación del sustrato, siendo la composición de residuos dentro de la porción carboxilo-terminal variable. Con base en la estructura del extremo carboxilo-terminal, la familia de proteínas con caja F se divide en tres subfamilias: la primera incluye a las proteínas que presentan repetidos de triptófano y ácido aspártico; en la segunda, se incluyen las proteínas con repetidos de leucina y la tercera, comprende proteínas con caja F cuyo dominio en el extremo carboxilo-terminal no incluye dominios específicos (104).

Perfil de expresión del ARNm BG083112/AK087669

El aumento en la expresión de este gen durante los primeros cuatro días posnatales se corroboró por medio de PCR semicuantitativo. Para ello, se utilizó como templado el ADNc al ARN de ovarios colectados en las tres etapas de estudio y el par A de oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Como se muestra en la Figura 6A, la expresión relativa del ARNm correspondiente a la secuencia BG083112, aumentó en forma significativa ($p < 0.05$) durante los primeros dos días posnatales y aún más ($p < 0.01$) a las 96 horas. Este resultado nos llevó a analizar el perfil de expresión de BG083112 en las etapas del desarrollo ovárico embrionario. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos (par B, tabla 1) que amplificaron la región codificante correspondiente al ADNc de AK087669. El experimento reveló que dicho ADNc, no se expresa en el ovario entre los 13 y 15 dpc (Figura 6B), momento en el cual algunas ovogonias todavía se dividen mitóticamente, pero la mayoría de estas células ya han iniciado la meiosis (105). En contraste, la expresión de este gen se presentó en forma elevada a los 18 dpc, disminuyendo drásticamente al día siguiente (19 dpc, Fig 6B). Esta expresión se mantuvo reducida al momento del nacimiento y como se observó previamente, aumentó de nuevo a las 48 horas posnatales.

Asimismo, y para determinar si AK087669 se expresa en otros tejidos, empleamos la técnica de RT-PCR y un par de oligonucleótidos que amplifican un segmento de la región codificante (par C, tabla 1). Este experimento en el cual se utilizaron como templado los productos de transcripción reversa de nueve tejidos diferentes (hígado, corazón, riñón, pulmón, corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo basal medio, testículo y ovario), indicó que este gen se expresa exclusivamente en el ovario (Fig 6C). Sin embargo, el análisis *in silico*

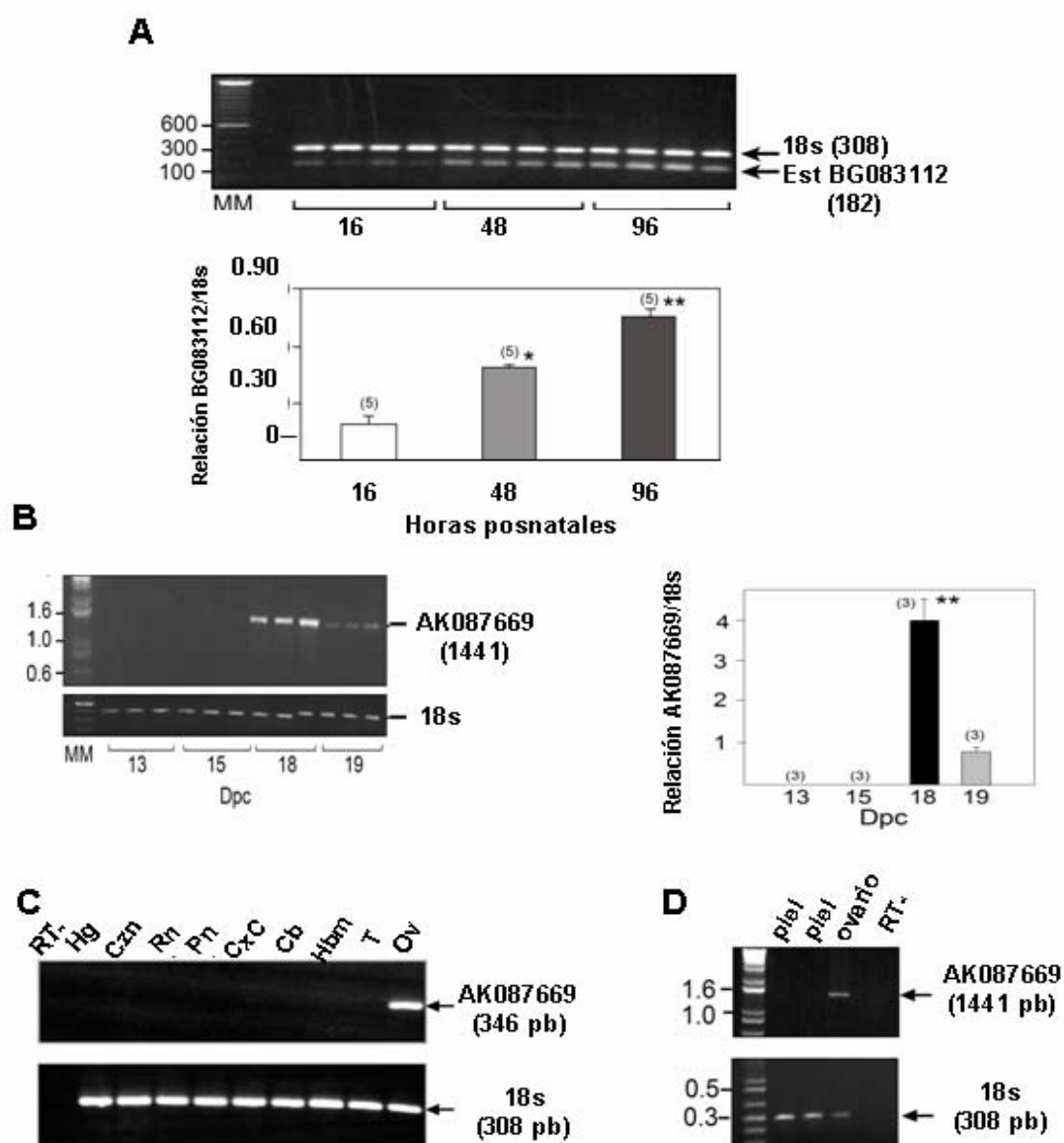


Figura 6. Expresión en el ovario murino feto-neonatal del ARN mensajero correspondiente a la secuencia BG083112/AK087669. A) Imagen representativa del aumento en la expresión del ARNm de BG083112 durante los primeros cuatro días de vida. La expresión constitutiva del ARN ribosomal 18s, se utilizó para normalizar las reacciones. Las gráficas representan el análisis densitométrico de la relación entre BG083112/AK087669 y 18s. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$ vs 16 horas después del nacimiento (A) o 19 dpc (B), barras verticales= media, barras horizontales= error estándar. B) Panel superior, aumento transitorio de la expresión de la secuencia AK087669 durante los 18 dpc. Panel inferior, expresión constitutiva del ARN ribosomal 18s. C) La expresión del ARNm de AK087669 es ovario-específica. D) AK087669 no se expresa en la piel del ratón neonatal. -RT= control sin transcriptasa reversa; Hg= hígado; Czn= corazón; Rn= riñón; Pn= pulmón; CxC= corteza cerebral; Cb= cerebelo; Hbm= hipotálamo basal medio; T= testículo; ov= ovario. MM= marcadores moleculares.

del servidor Unigene del NCBI, determinó que este gen se expresa en ovario y en piel. Con el fin de corroborar esto último, llevamos a cabo un RT-PCR, empleándose como templado los productos de la transcripción reversa del ARN aislado de la piel y de los ovarios de un ratón con dos días de edad. No obstante lo reportado en el servidor Unigene, en nuestro experimento no hubo amplificación del ADNc de AK087669 en muestras de piel, sólo se observó la banda correspondiente en la muestra de ovario (Figura 6D). Lo anterior sugiere que al menos en el ratón neonatal, la expresión de AK087669 (referida de aquí en adelante como Fbxw15 de acuerdo con la nomenclatura oficial), se restringe al ovario específicamente.

Expresión en el ovario murino del gen Fbxw15

Para determinar el tamaño aproximado del (los) ARNm correspondiente(s) a Fbxw15 y corroborar su expresión en el ovario, llevamos a cabo un análisis por northern blot, empleando ARNm aislado de diferentes tejidos disectados de un ratón C57BL/6J de dos días de edad. El resultado que se muestra en la Figura 7, indicó la presencia de un solo transcrito con un tamaño de 1.5 kb, lo que concuerda con el tamaño estimado *in silico* para dicho ARNm. Asimismo y conforme a lo reportado tanto en análisis previos sobre el perfil de expresión de diferentes ESTs (102), como en nuestros experimentos mediante la PCR, el transcrito que genera Fbxw15 solo se presentó en el ovario.

Localización celular del ARNm del gen Fbxw15

El estudio por hibridación *in situ* en el cual se utilizó una ribosonda marcada con el isótopo radioactivo ^{35}S , mostró que Fbxw15 se expresa específicamente

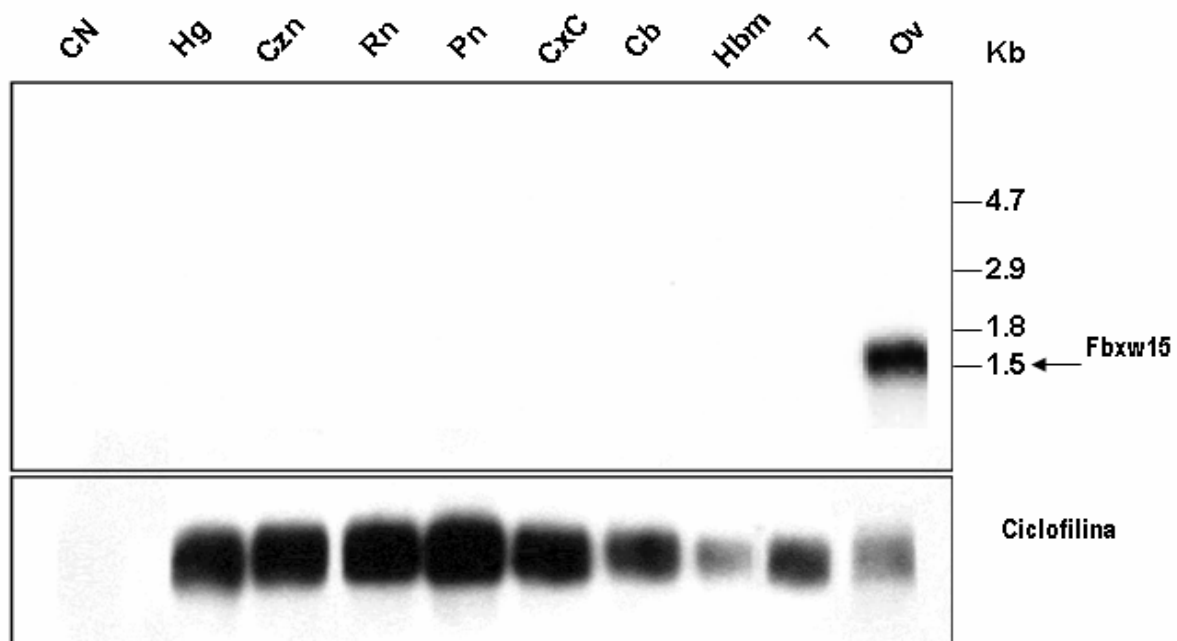


Figura 7. Análisis mediante northern blot del ARN poliadenilado aislado de diferentes tejidos (hígado, corazón, riñón, pulmón, corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo basal medio, testículo y ovario) de ratones con 2 días de edad. Panel superior, expresión ovario-específica del ARNm de Fbxw15 cuyo tamaño es de 1.5 kb (flecha). Panel inferior, detección del ARNm correspondiente al gen de la ciclofilina, el cual se empleó como control de la variabilidad en el experimento.

en los ovocitos de los folículos en crecimiento. En el panel A de la Figura 8, se observa que la señal de hibridación en secciones de ovarios colectados durante las primeras 16 horas posnatales, fue poco perceptible. En las secciones correspondientes a ovarios colectados a las 48 horas posnatales, la señal se observó de forma tenue en varios folículos primordiales (flechas en Fig. 8A). Más aún, dicha señal se detectó claramente en los folículos en crecimiento presentes en ovarios aislados a las 96 horas y aumentó en los ovarios de ratones con 144 horas de vida posnatal, permaneciendo elevada en los ovarios colectados durante el décimo segundo día posnatal (Fig. 8B).

El panel C de la figura muestra a un mayor aumento que la expresión del ARNm de Fbxw15 se presentó solo en los ovocitos (flechas en los tres cuadros correspondientes), ya que en ninguno de los dos experimentos de hibridación se detectó la señal en las células somáticas (Fig. 8A-D). De igual forma, no se detectó señal de hibridación en los cortes de tejido incubados con las sondas sentido.

Los experimentos mediante hibridación *in toto* en ovarios de ratones CD1 con 96 horas de vida, mostraron que el ARNm de Fbxw15 se expresa en forma abundante en folículos de la región medular del ovario (Fig. 8D). Durante esta etapa, la región cortical incluye folículos primordiales y primarios, mientras que en la región medular se presenta el primer grupo de folículos secundarios. Con base en lo anterior, la expresión de Fbxw15 durante esta etapa ocurre predominantemente en los folículos secundarios.

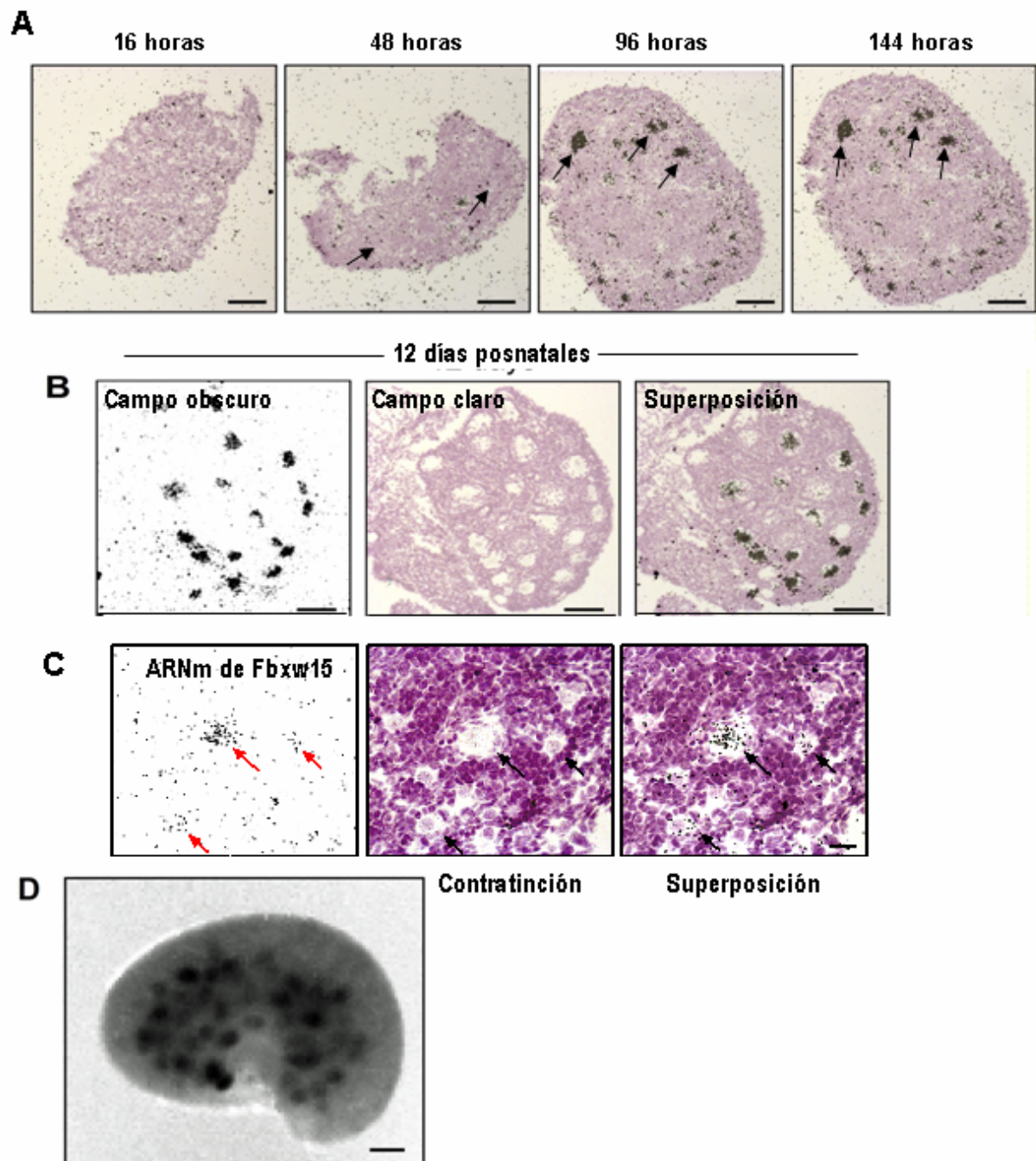


Figura 8. Localización celular mediante hibridación *in situ* e hibridación *in toto* del ARNm del gen *Fbxw15* en ovarios de ratones con 16, 48, 96, 144 horas y 12 días posnatales. A) La señal de hibridación es poco perceptible en los ovarios colectados durante las primeras 16 y 48 horas después del nacimiento; sin embargo, se detectó claramente en los ovarios colectados a las 96 y 144 horas posnatales (flechas). B) Señal de hibridación en cortes de ovarios colectados a los 12 días posnatales. En las imágenes de campo claro y superposición se observó que la señal se presenta únicamente en los ovocitos. C) Imagen a mayor aumento (40X) en la que se encontró la señal de hibridación, de forma intensa en los ovocitos de los folículos secundarios (flechas largas) y más tenue en los ovocitos de folículos primarios (flechas cortas). D) Imagen representativa de la hibridación *in toto* en un ovario colectado de un ratón con 96 horas de edad, en la que se observó una señal intensa en los folículos de la zona medular del ovario. Barras en A y B= 100 μ m; en C= 20 μ m; en D= 50 μ m.

Caracterización molecular del gen Fbxw15

Como ya se mencionó anteriormente, Fbxw15 se localiza en un locus del cromosoma 9, en el cual se encuentran varios genes cuyos transcritos codifican proteínas con cajas F. La homología de Fbxw15 con las secuencias de nucleótidos de estos genes fue de 86% y 99% y de 64% a 77% con las secuencias de aminoácidos correspondientes (Tabla 2).

El análisis por secuenciación automática del producto amplificado por la técnica de RT-PCR indicó que la región codificante de Fbxw15, comprende 1,401 pb. La comparación de la secuencia obtenida con la secuencia genómica NT_095756.1, donde se localiza Fbxw15, reveló que dicha región codificante abarca 16,452 kb del genoma y comprende 10 exones con un intervalo de longitud entre 37 y 210 pb (Figura 9).

Asimismo, la búsqueda de dominios proteicos conocidos mediante el programa Pfam, indicó que el dominio de caja F se extiende desde el aminoácido 3 hasta el 46 (Figura 10A). Esta caja es similar a las que presentan las proteínas con cajas F y repetidos de ácido aspártico y triptófano FBXW12 y FBXW14 en un 84 y 89%, respectivamente. No obstante esta similitud, los resultados del análisis para la región carboxilo terminal, no indicaron la presencia de otro dominio característico en esta porción, como ocurre en las proteínas FBXW12 y FBXW14; razón por la cual, el gen Fbxw15 se sometió a registro (DQ067445) como un gen que codifica a una proteína perteneciente a la subfamilia FBXO (Figura 10B). Nuestra clasificación concordó con la propuesta por Paillisson y cols (2005) (102); sin embargo, diferimos con su clasificación oficial como una proteína con caja F y repetidos de ácido aspártico y triptófano.

Tabla 2. Secuencias en el locus 9F2 con homología al gen Fbxw15

Número de acceso	Descripción	% de homología en secuencia de nucleótidos con Fbxw15	% de nucleótidos comparados	% de homología en secuencia de amino ácidos con FBXW15
AK087669/ NM_199036.1	Fbxw 15/Fbxo 12J ^a	99%	100%	100%
NM_0015793/ AK087709	Fbxw 14/Fbxo 12	93%	74%	64%
AK054339/ NM_177598.3	Fbxw13/Fbxo 12 ^a	86%	79%	64%
*NM_177069.2/ AK087710	Fbxo 12B	87%	80%	69%
NM_177703/ AK087808.1	Fbxw 19/Fbxo 12C	89%	78%	67%
NM_001008428.1/ XM_486263	Fbxw 12/Fbxo12F	90%	85%	69%
AK054298	Fbxo 12I	99%	24%	68%
NM_001013776.1/ XM_356191	Fbxo 12K	87%	92%	73%
XM_884388.2/ AK007274	Fbxo 12L	96%	94%	77%

a= Nomenclatura otorgada por Paillison A, Dade S, Callebaut I, y cols. Identification, characterization and metagenome análisis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. BMC Genomics, 2005; 6: 76-86.

*= Evidencia experimental de la expresión del ARN mensajero.

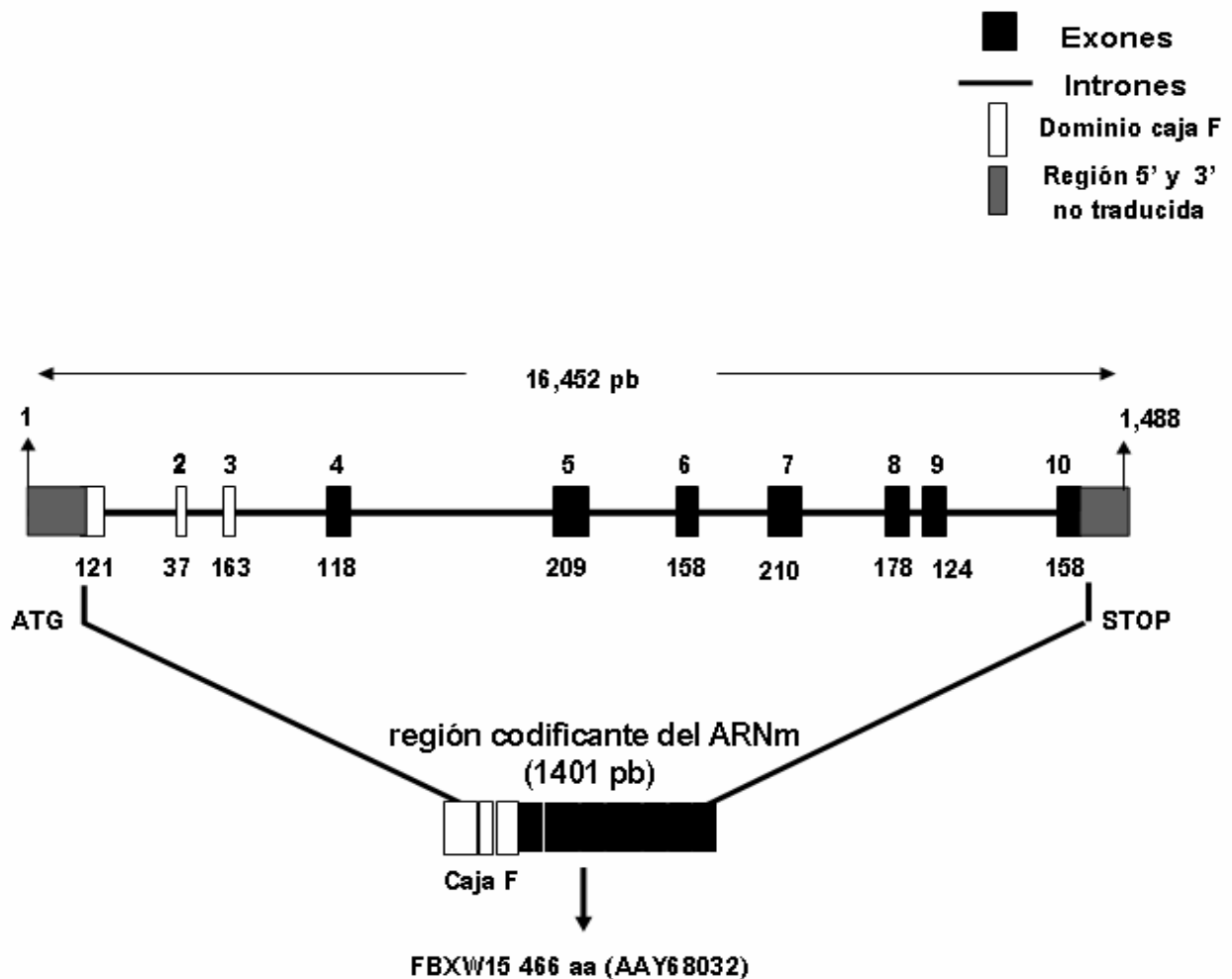


Figura 9. Representación esquemática de la organización genómica de Fbxw15. La región codificante abarca 1,401 pb que traducen una proteína de 466 aminoácidos. Las cajas negras representan los exones correspondientes y las líneas entre ellas a los intrones. Las cajas grises denotan las regiones 5' y 3' no traducidas. Las cajas blancas esquematizan la localización del dominio de caja F en los primeros 3 exones. Los números arriba de las cajas, corresponden al número de exón y los números inferiores el tamaño respectivo.

Localización celular de la proteína FBXW15

Para determinar si la región codificante del gen Fbxw15 traduce una proteína, se empleó la técnica de western blot, utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo bandera presente en la construcción molecular pcDNA 3.1 Zeo+/AK087669 (Fbxw15). La figura 11A, muestra una banda con un peso molecular aproximado de 52-54 kDa en el carril donde se llevó a cabo la electroforesis de las proteínas aisladas de las células COS-7 transfectadas con el vector recombinante. El peso molecular de la banda correspondiente, concordó con el peso molecular estimado para la proteína codificada por este gen.

Más aún, el análisis de la secuencia peptídica (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP>) indicó que FBXW15, no es una proteína de secreción, ya que carece de un péptido señal. Asimismo y con el fin de identificar la localización celular de la misma, se llevó a cabo una inmunohistofluorescencia, para la cual se utilizaron los anticuerpos anti-epítipo y anti-PDI, este último reconoce una proteína disulfuro-isomerasa (en inglés protein disulfide isomerase), específica del RE (106). Los resultados obtenidos mediante microscopia confocal (Figura 11B), mostraron que la inmunoreactividad correspondiente a FBXW15, se presenta en el citoplasma celular (Figura 11C) y se colocaliza con PDI (Figura 11D), lo que sugiere que FBXW15 está asociada con el RE.

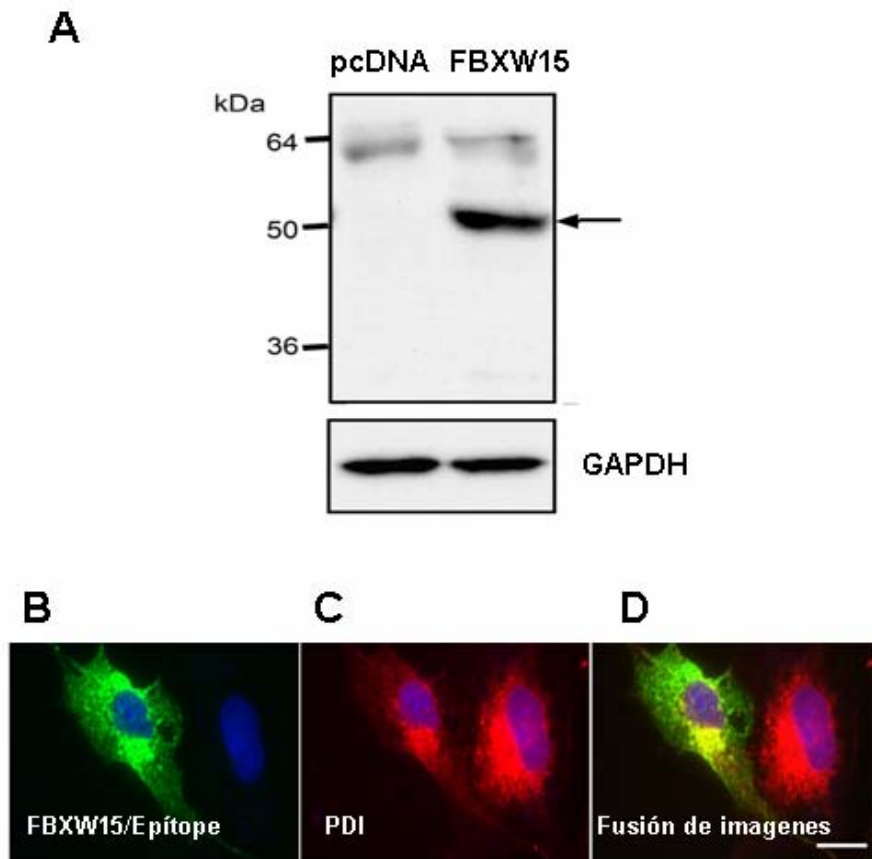


Figura 11. Análisis mediante western blot e inmunohistofluorescencia de la expresión y localización celular de la proteína que traduce el gen Fbxw15. A) Panel superior, las Células COS7 transfectadas con el plásmido que incluye la región codificante de Fbxw15 y la secuencia correspondiente a un epítipo de reconocimiento, expresan una proteína con un peso aproximado de 52-53 kDa, lo cual concuerda con el peso estimado mediante el análisis *in silico*. Panel inferior, banda correspondiente a la proteína GAPDH, empleada como control interno. B) Imagen representativa mediante microscopía confocal de la inmunohistofluorescencia en células COS7, empleando el anticuerpo anti-epítipo. C) Imagen representativa mediante microscopía confocal de la inmunohistofluorescencia en células COS7, empleando el anticuerpo contra la proteína disulfuro isomerasa (PDI), una proteína específica del retículo endoplásmico. D) Se observa la colocalización en el citoplasma celular de la proteína FBXW15 con la PDI.

DISCUSION

Este trabajo demuestra el perfil de expresión bifásico de un gen cuyo ARNm fue identificado a partir de un ensayo de microarreglos de ADN, el cual se llevo a cabo para identificar genes con expresión diferencial durante el ensamble y crecimiento folicular independiente del estímulo gonadotrópico en el ovario murino.

El análisis molecular de la secuencia BG083112, presente en un grupo que incluyó 24 genes con niveles de expresión elevados a partir del segundo día posnatal, demostró que dicha secuencia formaba parte de un ADNc (AK087669) proveniente de una librería obtenida de un ratón hembra con dos días de gestación. El gen correspondiente, denominado Fbxw15, se expresa en niveles elevados durante el décimo octavo día gestacional, disminuyendo drásticamente al día siguiente, hasta incrementarse de nuevo a partir de los primeros dos días de vida.

Más aún, nuestros experimentos demostraron que el ARNm de Fbxw15, es ovocito-específico y genera un transcrito que codifica una proteína perteneciente la familia de proteínas con caja F. Lo anterior concuerda con lo reportado por Paillisson y cols. (2005) (102); sin embargo, difiere con respecto a lo reportado por otros grupos, en cuanto a su clasificación como una proteína FBXWD, ya que nuestros resultados indican que FBXW15 carece en su porción carboxilo-terminal de dominios de interacción con otras proteínas (101, 107).

El perfil de expresión de Fbxw15 en el ovario posnatal, es similar al que presentan los 23 genes que conformaron el grupo 2-3. Cabe destacar, que todos los genes con función conocida dentro de este grupo, presentan una expresión ovocito-específica. Lo anterior enfatiza la importancia del papel que

tiene el ovocito en el control del desarrollo folicular temprano. Estudios metagenómicos en los que se analizó el perfil de expresión del ADNc tanto de cigotos como de embriones en etapas previas a la implantación, demostraron la existencia de cohortes de genes con patrones de expresión similares, lo que sugiere que estos genes presentan una función coordinada en etapas específicas del desarrollo (108). La sincronía en la regulación hacia arriba de varios genes específicos de las células germinales de ovarios procedentes de ratones neonatales, confirma lo anterior (109) y conlleva a la hipótesis de que algunos de los miembros identificados en el grupo 2-3, participan de forma complementaria en la formación de los folículos primordiales, o bien, en la diferenciación y crecimiento temprano de los mismos.

La localización del gen *Fbxw15*, en un locus conformado por varias secuencias con un alto grado de homología entre ellas, constituye un aspecto relevante que fundamenta dicha hipótesis. Más aún, estudios por hibridación *in situ* demostraron que dos de los genes (*Fbxo12B* y *Fbxo12D*), presentes en el locus del cromosoma 9F2, se expresan selectivamente en los ovocitos de los folículos primordiales (102).

Se ha hipotetizado que la agrupación en un locus específico de genes con un alto grado de homología, es consecuencia de la duplicación de un gen ancestral (110), por lo que es posible que la actividad transcripcional de los genes que conforman el grupo 2-3, ocurra gracias a los mismos elementos reguladores *en cis*. El locus 9F2 se localiza en la región subtelomérica del cromosoma, regiones genómicas que se caracterizan por contener secuencias con un alto índice evolutivo (111). Como tal, cada uno de los genes presentes en el locus 9F2 podría desempeñar una función específica, pero a la vez

complementaria y redundante dentro del ovario murino, propiciando así el correcto desarrollo del mismo. El hecho que la expresión de los genes con dominios de caja F presentes en el cromosoma 9F2, sea silenciada en la mayoría de los tejidos del ratón, con excepción de los ovocitos, sugiere que dichos genes participan de manera determinante en funciones ovocito-específicas, que aún no se han dilucidado.

Las proteínas con caja F participan en procesos proteolíticos mediante ubiquitinación. Estos se llevan a cabo gracias a un conjunto de proteínas que conforman el proteosoma 26s, el cual reconoce un sustrato previamente unido al complejo ubiquitina-ligasa E3, conformado por cuatro proteínas: SKP1, Cul1, Rbx1/Roc1 y una proteína con caja E; esta última reconoce específicamente a la proteína destinada a degradación (112). A su vez, este complejo se une a otras dos enzimas, la primera denominada E1, la cual activa de manera ATP dependiente a la ubiquitina al unirse con esta última por medio de un enlace tioéster entre el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y una cisteína presente en el sitio activo de la enzima. Posteriormente, la ubiquitina se enlaza con la enzima que la conjuga (E2). Este enlace ocasiona la transferencia de la ubiquitina hacia el complejo E3 en donde se une al sustrato por medio de un enlace isopeptídico entre el extremo carboxilo terminal de la ubiquitina y residuos de lisina presentes en la proteína que sufrirá proteólisis (113). Usualmente, el proceso proteolítico involucra el enlace de cincuenta ó más moléculas de ubiquitina con el sustrato (103, 112).

Diversos estudios han demostrado la participación del complejo SCF en la regulación por proteólisis tanto del ciclo celular, como de la transducción de

señales (114). De igual forma, se ha demostrado que diversas proteínas inhibitoras de la apoptosis son reguladas via ubiquitinación-26s (115).

Los experimentos mediante inmunohistofluorescencia, indicaron que la proteína que traduce Fbxw15 se co-localiza con un marcador específico del retículo endoplásmico, lo cual resulta sorprendente, ya que la secuencia peptídica de FBXW15, carece del péptido señal característico de las proteínas membranales o de secreción. No obstante, Yoshida y cols. (2005) (116), demostraron la asociación entre proteínas con caja F y el retículo endoplásmico, en la degradación mediante ubiquitinación de proteínas presentes en el último, la cual ocurre cuando las proteínas a degradar, son retrotranslocadas del lumen del RE hacia el citosol.

El perfil de expresión bifásico que presenta Fbxw15 en el ovario fetoneonatal, sugiere que la proteína correspondiente participa en procesos diferentes, regulados en momentos específicos durante el desarrollo ovárico. El incremento en los niveles de expresión de Fbxw15 durante el décimo octavo día gestacional, coincide con el momento en que la mayoría de los ovocitos se encuentran en las etapas de zigoteno o paquiteno de la profase I, permaneciendo en esta última etapa hasta el nacimiento, cuando los ovocitos entran en la fase de diploteno, deteniéndose en ella hasta la ovulación (117), y con la degeneración masiva de células germinales mediante apoptosis (118). Lo anterior sugiere que a los 18 dpc, FBXW15 pudiese regular a proteínas que impiden que los ovocitos progresen de la fase de paquiteno hacia la fase de diploteno antes del nacimiento, evitando así la finalización prematura de la profase I; o bien pudiese estar involucrada en la regulación de proteínas que

intervienen en procesos apoptóticos, durante esta etapa del desarrollo ovárico feto-neonatal.

El incremento prevalente en la expresión de Fbxw15 a partir del segundo día postnatal, contrasta con la expresión transitoria observada a los 18 dpc. Es posible que la presencia del ARN mensajero de Fbxw15 en forma abundante a partir del segundo día posnatal, contribuya a la regulación de proteínas que impiden la progresión de los ovocitos arrestados en dictioteno hacia las etapas subsecuentes de la meiosis. Suzumori y cols. (2003) (119), demostraron la interacción de una proteína (RFLP4) (siglas en inglés para Ret Finger Protein Like 4), específica de las células germinales, con una enzima E2 y con la ciclina B1. Este estudio sugiere que Rfpl4 actúa como una proteína E3 ubiquitina-ligasa, que degrada mediante ubiquitinación proteínas que regulan la meiosis en el ciclo celular del ovocito murino. Con base en esto último, se podría postular que al igual que RFPL4, la proteína FBXW15 pudiese participar en la proteólisis mediante ubiquitinación de proteínas pertinentes al ciclo celular.

Alternativamente, FBXW15 pudiese regular procesos de señalización requeridos en la interacción entre el ovocito y las células de la granulosa de los folículos secundarios presentes en la región medular del ovario. Esto último con base en los resultados obtenidos mediante la hibridación *in toto* en los que la señal específica para el ARN mensajero correspondiente, sólo se detecta en dichos folículos, lo cual coincide con los resultados obtenidos a partir del microarreglo en donde la expresión del gen es significativa a partir del segundo día posnatal, etapa en la que los estudios histológicos demostraron la presencia de folículos secundarios.

Para dilucidar lo anterior se requieren estudios que involucren el desarrollo de anticuerpos específicos para esta proteína, así como el empleo de ARNs de interferencia o microARNs que abatan la expresión del ARN mensajero, cuyo efecto pudiese proporcionar información sobre el papel que desempeña Fbxw15 en el desarrollo del ovario murino.

CONCLUSIONES

1. La secuencia identificada a partir del microarreglo, forma parte de un gen, denominado Fbxw15, que hasta el momento no había sido caracterizado.
2. El ARN mensajero del mismo, se expresa selectivamente en el ovario, específicamente en el ovocito. Dicha expresión se observa en niveles altos durante el décimo octavo día gestacional, cuando aproximadamente el 70% de las células germinales degeneran por apoptosis y a partir del segundo día posnatal, cuando en el ovario murino, ocurre el ensamble y crecimiento folicular, independiente del estímulo gonadotrópico.
3. Fbxw15 genera un transcrito de 1.5 kb que traduce una proteína de 52 kDa.
4. Esta nueva proteína contiene en su porción amino-terminal un dominio de caja F. Este tipo de proteínas participan en eventos proteolíticos mediante ubiquitinación. Lo anterior, aunado al perfil de expresión bifásico del ARN mensajero de Fbxw15, sugiere que su proteína participa en la regulación mediante proteólisis, de uno o varios procesos celulares en el ovario murino.

REFERENCIAS

- 1.- Grumbach MM, Conte FA. Disorders of sex differentiation. En: Watson JD, Foster DW (eds). Williams Textbook of Endocrinology. WB Saunders, Filadelfia, EUA, 1992: 853.
- 2.- Wassarman PM, Albertini DF. The mammalian ovum. En: Knobil E, Neill JD. (eds). The Physiology of Reproduction. 2ª ed. Raven Press, EUA, 1994: 79-122.
- 3.- Odor DL, Blandau RJ. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. Am J Anat 1969; 124: 163-186.
- 4.- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, y cols. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc Natl Acad Sci 2006; 103: 2474-2479.
- 5.- George F. Sexual differentiation En: Griffin D, Ojeda S. (eds.) Textbook of Endocrine Physiology. 2ª ed. Oxford University Press, EUA, 1992; 117.
- 6.- McLaren A. Development of the mammalian gonad: the fate of the supporting cell lineage. Bioessays 1991;13: 151-156.
- 7.- Pepling ME, Spradling AC. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. Development 1998; 125: 3323-3328.
- 8.- Merchant-Larios H, Chimal-Monroy J. The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. Developments in Ultrastructure of Reproduction, Alan R. Liss, Inc. 1989; 55-63.
- 9.- Mazaud S, Guyot R, Guigon CJ, y cols. Basal Membrane remodeling during follicle histogenesis in the rat ovary: contribution of proteinases of the MMP and PA families. Dev Biol 2005; 277: 403-416.

- 10.- Kezel P, Nilsson E, Skinner MK. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci* 2002; 7: d1990-d1996.
- 11.- Epifano O, Dean J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 169-173.
- 12.- Vanderhyden B. Molecular basis of ovarian development and function. *Front Biosci* 2002; 7: 2006-2022.
- 13.- Merchant H. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol* 1975; 44: 1-21.
- 14.- Merchant-Larios H, Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog Clin Biol Res* 1981; 59B: 383-392.
- 15.- El-Fouly MA, Cook B, Nekola M, Nalbandov AV. Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 1970; 87: 286-293.
- 16.- Nekola MV, Nalbandov AV. Morphological changes of rat follicular cells as influenced by oocytes. *Biol Reprod* 1971; 4: 154-160.
- 17.- Matzuk MM, Burns KH, Viveiros MM, Eppig JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: Oocytes carry the conversation. *Science* 2002; 296: 2178-2180.

- 18.- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL. The mammalian oocyte orchestrates the rate of follicular development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2890-2894.
- 19.- Godin I, Deed R, Cooke J, y cols. Effects of the *steel* gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1991; 352: 807-809.
- 20.- Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BLM. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for *c-kit*. *Nature* 1990; 347: 667-669.
- 21.- Keshet E, Lyman SD, Williams DE, y cols. Embryonic RNA expression patterns of the *c-kit* receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J* 1991; 10: 2425-2435.
- 22.- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, y cols. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 1998 ; 95: 379-391.
- 23.- Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H. Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 1998; 71: 89-98.
- 24.- Pesce M, Scholer HR. Oct-4: Control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 452-457.
- 25.- Monti M, Garagna S, Redi C, Zuccotti M. Gonadotropins affect Oct-4 gene expression during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 685-691.
- 26.- Su AL, Cooke MP, Ching KA, y cols. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4465-4470.

- 27.- Zhang J, Tam WL, Tong CQ, y cols. *Sall4* modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of *Pou5f1*. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1114-1123.
- 28.- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, y cols. Female development in mammals is regulated by *Wnt-4* signalling. *Nature* 1999; 397: 405-409.
- 29.- Choi Y, Rajkovic A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 579-590.
- 30.- Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. *Kit* ligand and *c-kit* have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006; 2: 61-69.
- 31.- Huang EJ, Manova K, Packer AI, y cols. The murine steel panda mutation affects *kit* ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; 157: 100-109.
- 32.- Besmer P, Manova K, Duttlinger R, y cols. The *Kit*-ligand (steel factor) and its receptor *c-kit/W*: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl* 1993 125-137.
- 33.- Joshi S, Davies H, Porter Sims L, y cols. Ovarian gene expression in the absence of *FIGLA* and oocyte-specific transcription factor. *BMC Dev Biol* 2007; 7:67-79.

- 34.- Liang LF, Soyal SM, Dean J. FIGa a germ-cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 1997; 124: 4939-4949.
- 35.- Soyal SM, Amleh A, Dean J. FIG-alpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000; 127: 4645-4654.
- 36.- Guigon CJ, Magre S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod* 2006; 74: 450-458.
- 37.- Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, y cols. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte specific gene expression. *Science* 2004; 305: 1157-1159.
- 38.- Pangas SA, Choi Y, Ballow DJ, y cols. Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8090-8095.
- 39.- Choi Y, Qin Y, Berger MF, y cols. Microarray analyses of newborn mouse ovaries lacking *Nobox*. *Biol Reprod* 2007; 77: 312-319.
- 40.- Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191-206.

- 41.- Kaivo-oja N, Jeffery LA, Ritvos O, Mottershead DG. Smad signalling in the ovary. *Rep Biol Endocrinol* 2006;4: 21-33.
- 42.- Dong J, Albertini DF, Nishimori TR, y cols. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531-535.
- 43.- Elvin JA, Yan C, Wang P, y cols. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor-9-deficient ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1018-1034.
- 44.- Richards JS. The ovarian follicle-A perspective in 2001. *Endocrinology* 2001; 142: 2184-2193.
- 45.- Elvin JA, Clark AT, Wang P, y cols. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1035-1048.
- 46.- Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJW. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cell from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod* 2000; 62: 370-377.
- 47.- Xiao YT, Xiang LX, Shao JZ. Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 550-553.

- 48.- Su YQ, Wu X, O'Brien MJ, y cols. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus-cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol* 2004; 276: 64-73.
- 49.- Yan C, Wang P, De Mayo J, y cols. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 854-866.
- 50.- Otsuka F, Shimasaki S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis, *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8060-8065.
- 51.- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 461-471.
- 52.- Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 2003; 69: 1265-1272.
- 53.- Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 214: 19-25.

- 54.- Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 65-73.
- 55.- Durlinger AL, Kramer P, Karels B, y cols. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789-5796.
- 56.- Tessarollo L. Pleiotrophic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 125-137.
- 57.- Raffioni S, Bradshaw RA. The receptors for nerve growth factor and other neurotrophins. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 823-850.
- 58.- Bothwell M. Keeping track of neurotrophin receptors. *Cell* 1991; 65: 915-918.
- 59.- Hantzopoulos PA, Suri C, Glass DJ, y cols. The low affinity NGF receptor, p75 can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron* 1994; 13: 187-201.
- 60.- Lara He, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rato ovary: effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 1990; 126: 357-363.

- 61.- Cordon-Cardo C, Tapley P, Jing S, y cols. The trk tyrosine protein kinase mediates the mitogenic properties of nerve growth factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991; 66: 173-183.
- 62.- Glass DJ, Nye SH, Hantzopoulos P, y cols. TrkB mediates BDNF/NT-3-dependent survival and proliferation in fibroblasts lacking the low affinity NGF receptor. *Cell* 1991; 66: 405-413.
- 63.- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Ojeda SR. A role for trkA nerve growth factor receptor in mammalian ovulation. *Endocrinology* 1996; 137: 198-209.
- 64.- Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 1995; 136: 4681-4692.
- 65.- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124: 43-101.
- 66.- Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 163: 67-71.
- 67.- McClellan KA, Gosden R, Taketo T. Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol* 2003; 258: 334-348.

- 68.- Jiang JY, Cheung CK, Wang Y, Tsang BK. Regulation of Cell death and Cell survival gene expression during ovarian follicular development and atresia. *Front Biosci* 2003; 8: d222-d237.
- 69.- Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev Biol* 1999; 213: 1-17.
- 70.- Li J, Kim JM, Liston P, y cols. Expression of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in rat granulosa cells during ovarian follicular development and atresia. *Endocrinology* 1998; 139: 1321-1328.
- 71.- Kandel ES, Hay N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 1999; 253: 210-229.
- 72.- Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, y cols. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; 17: 2215-2223.
- 73.- Olaso R, Pairault C, Boulogne B, y cols. Transforming growth factor β 1 and β 2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. *Endocrinology* 1998; 139: 733-740.
- 74.- Guo MW, Mori E, Xu JP, Mori T. Identification of Fas antigen associated with apoptotic cel death in murine ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1438-1446.

- 75.- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, y cols. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995; 136: 3665-3668.
- 76.- Rucker EB 3rd, Dierisseau P, Wagner KU, y cols. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1038-1052.
- 77.- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-159.
- 78.- Molecular Research Center, Inc. Tri-Reagent-RNA/DNA/Protein isolation protocol, 2002.
- 79.- NEN Life Science Products, Inc. Micromax-TSA labeling and detection kit. User Manual, 2002.
- 80.- Bateman A, Coin L, Durbin R, y cols. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 2004; 32:D138-D141.
- 81.- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4673-4680.

- 82.- Seidman JG. Screening of Recombinant DNA libraries. En: Ausubel FM, y cols. (eds). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & sons, Inc., EUA. 1991; 1: 6-7.4.
- 83.- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principals of protein dye binding. Anal Biochem 1976; 16: 248.
- 84.- Simmons DM, Arriza JL, Swanson LW. A complete method for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radiolabeled single-stranded RNA probes. J Histotechnol 1989; 12: 169-181.
- 85.- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, y cols. Nerve growth factor receptors in the peripubertal ovary. Mol Endocrinol 1991; 5: 1642-1650.
- 86.- Wilkinson DG. Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos. En: DG Wilkinson (ed.), In Situ Hybridization: A Practical Approach. Oxford: IRL Press; 1992: 75-83.
- 87.- Canning J, Takai Y, Tilly JL. Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. Endocrinology 2003; 144: 9-12.
- 88.- Yokoo M, Shimizu T, Kimura N, y cols. Role of hyaluronan receptor CD44 during porcine maturation. J Reprod Dev 2007; 53: 263-270.

- 89.- Kezele PR, Ague JM, Nilsson E, Skinner MK. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. *Biol Reprod* 2005; 72: 241-255.
- 90.- Hurley JH, Lee S, Prag G. Ubiquitin-binding domains. *Biochem J* 2006; 399: 361-372.
- 91.- Valeé M, Gravel C, Palin MF, y cols. Identification of novel and known oocyte-specific genes using complementary DNA subtraction and microarray analysis in three different species. *Biol Reprod* 2005; 73: 63-71.
- 92.- Dadé S, Callebaut I, Paillisson A, y cols. In silico identification and structural features of six new genes similar to MATER specifically expressed in the oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 547-553.
- 93.- Wright PW, Bolling LC, Calvert ME, y cols. ePAD an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Dev Biol* 2003; 256: 73-88.
- 94.- Zhang H, Holzgreve W, De GC. Bcl2-L-10, a novel anti-apoptotic member of the Bcl-2 family, blocks apoptosis in the mitochondria death pathway but not in the death receptor pathway. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2329-2339.
- 95.- Yan W, Ma L, Stein P, y cols. Mice deficient in oocyte-specific oligoadenylate synthetase-like protein OAS 1D display reduced fertility. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 4615-4624.

- 96.- Tanaka M, Kihara M, Mieczekalski B, y cols. H1oo: a pre-embryonic H1 linker histone in search of a function. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 5-9.
- 97.- Vitale A, Perlin J, Leonelli L, y cols. Mouse cPLA2 gamma, a novel oocyte and early embryo-abundant phospholipase A2 gamma-like protein, is targeted to the nuclear envelope during germinal vesicle breakdown. *Dev Biol* 2005; 282: 374-384.
- 98.- Horikawa M, Kirkman NJ, Mayo KE, y cols. The mouse germ-cell specific leucine-rich repeat protein NALP14: a member of the NACHT nucleoside triphosphatase family. *Biol Reprod* 2005; 72: 879-889.
- 99.- Rajpal A, Cho YA, Yelent B, y cols. Transcriptional activation of known and novel apoptotic pathways by nur77 orphan steroid receptor. *EMBO J* 2003; 22: 6526-6536.
- 100.- Tsukamoto S, Ihara R, Aizawa A, y cols. Oog1, an oocyte-specific protein, interacts with Ras and Ras-signaling proteins during early embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 1105-1112.
- 101.- Jin J, Cardozo T, Lovering RC, y cols. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes Dev* 2004; 18: 2573-2580.
- 102.- Paillison A, Dade S, Callebaut I, y cols. Identification, characterization and metagenome analysis of oocyte-specific genes organized in clusters in the mouse genome. *BMC Genomics* 2005; 6: 76-86.

- 103.- Skowyra D, Craig KL, Tyers M, y cols. F-Box Proteins are Receptors that recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell*, 1997; 91: 209-219.
- 104.- Cenciarelli C, Chiaur DS, Guardavaccaro, y cols. Identification of a family of human F-box proteins. *Curr Biol* 1999;9: 1177-1179.
- 105.- Snow MHL, Monk M. Emergence and migration of mouse primordial germ cells. En: McLaren A, Wylie CC (eds.) *Current problems in Germ Cell Differentiation*. Cambridge: Cambridge University Press; 1983: 115-135.
- 106.- Noiva R, Lennarz WJ. Protein Disulfide Isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1992; 267: 3553-3556.
- 107.- Winston JT, Koepf DM, Zhu C, y cols. A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biology* 1999; 9: 1180-1182.
- 108.- Ko MS, Kitchen JR, Wang X, y cols. Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development. *Development* 2000; 127: 1737-1749.
- 109.- Herrera L, Ottolenghi C, García-Ortíz JE, y cols. Mouse ovary developmental RNA and protein markers from gene expresión profiling. *Dev Biol* 2005; 279: 271-290.
- 110.- Ohno S. Gene duplication and the uniqueness of vertebrate genomes circa 1970-1999. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 517-522.
- 111.- Der-Sarkissian H, Vergnaud G, Borde YM, y cols. Segmental polymorphisms in the proterminal regions of a subset of human chromosomes. *Genome Res* 2002; 12: 1673-1678.

- 112.- Hershko A, Ciechanover A. The Ubiquitin System. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-479.
- 113.- Wu G, Xu G, Schulman BA, y cols. Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-Catenin Complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF (beta-TrCP1) Ubiquitin Ligase. *Mol Cell* 2003; 11: 1445-1456.
- 114.- Craig KL, Tyers M. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog Biophys Mol Biol*, 1999; 72: 299-328.
- 115.- Kipreos ET, Pagano M. The F-box family. *Genome Biol* 2000; 1: 3002.1-3002.7.
- 116.- Yoshida Y, Adachi E, Fukiya K, Iwai K, Tanaka K. Glycoprotein-specific ubiquitin ligases recognize N-glycans in unfolded substrates. *EMBO Rep* 2005; 6: 239-244.
- 117.- Cohen PE, Pollard JW. Regulation of meiotic recombination and prophase I progression in mammals. *BioEssays* 2001; 23: 996-1009.
- 118.- McClellan KA, Gosden R, Taketo T. Continuous loss of oocytes throughout meiotic prophase in the normal mouse ovary. *Dev Biol* 2003; 258: 334-348.
- 119.- Suzumori N, Burns KH, Yan W, Matzuk M. RFPL4 interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteosome degradation pathway. *PNAS*, 2003; 100: 550-555.