



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

T E S I S

**CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA DURANTE LA MORFOGÉNESIS DEL
TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO EN RATÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

MONICA RUIZ ROSARIO

MÉXICO, D.F.

2015





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA
VOCAL: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
SECRETARIO: DR. EN C. FERNANDO FERNÁNDEZ RAMÍREZ
1er. SUPLENTE: DRA. NANCY MONROY JARAMILLO
2° SUPLENTE: DR. IGNACIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, SSA

ASESOR DEL TEMA:

DR. FERNANDO FERNÁNDEZ RAMÍREZ

SUSTENTANTE:

MONICA RUIZ ROSARIO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Sistemas, Unidad de Genética, del Hospital General de México —“Dr. Eduardo Liceaga” bajo la dirección del **Dr. Fernando Fernández Ramírez**.

El presente trabajo forma parte del proyecto titulado —“Identificación y caracterización de genes implicados en la morfogénesis uterina”, beneficiario de los apoyos **CONACYT 133273** y **DGAPA-UNAM IN219912**, y con registro en el Hospital General de México **DIC/11/310/05/035**.

La autora agradece a la **Dra. Susana Kofman Epstein**, por facilitar espacios, insumos e instrumentos de laboratorio, así como por su contribución crítica al proyecto.

Al **Dr. Horacio Merchant** y **M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia** del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por su asesoría y colaboración en la obtención de muestras biológicas y sexado de embriones murinos.

El **Dr. Diego Julio Arenas Aranda** (†) y las Doctoras **Ana Claudia Velázquez** y **Ruth Ruiz**, de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Centro Médico Nacional —“Siglo XXI”, facilitaron los instrumentos para hibridación, lavado y cuantificación de microarreglos Affymetrix y contribuyeron con su operación.

La **Dra. Eva Martínez Peñafiel** participó en el diseño experimental, así como en la recolección de biopsias y los procedimientos experimentales.

ÍNDICE

RECONOCIMIENTOS.....	III
1. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
2. GLOSARIO.....	3
3. ABREVIATURAS	5
4. RESUMEN	7
5. ABSTRACT	8
6. INTRODUCCIÓN	9
7. ANTECEDENTES.....	13
7.1. DETERMINACIÓN SEXUAL.....	13
7.2. DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....	17
7.2.1. DIFERENCIACIÓN DEL TRACTO REPRODUCTOR.....	17
7.2.2. ASPECTOS GENÉTICOS Y MOLECULARES	18
7.2.3. ESTUDIOS EN HUMANOS	24
8. OBJETIVOS.....	30
8.1. OBJETIVO GENERAL.....	30
8.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
9. HIPÓTESIS.....	30
10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	31
10.1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL.....	31
10.2. CONDICIONES DE CRIANZA.....	32
10.3. OBTENCIÓN DE TEJIDOS	32
10.4. SEXADO DE EMBRIONES MURINOS.....	34
10.4.1. EXTRACCIÓN DE DNA.....	36
10.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	37
10.5. EXTRACCIÓN DE RNA	38
10.6. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA.....	39
10.7. MICROARREGLOS	39
10.8. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	44
10.9. ANALISIS BIOLÓGICO	46

11.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
11.1.1.	VENTANA DE DIFERENCIACIÓN DEL TRACTO REPRODUCTOR, SEXADO DE EMBRIONES Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDO MESONÉFRICO	49
11.1.2.	HIBRIDACIÓN DE MICROARREGLOS Y EVALUACIÓN DE SU CALIDAD	56
12.	CONCLUSIONES	91
13.	PERSPECTIVAS	93
14.	BIBLIOGRAFÍA	95
15.	APÉNDICE	101
15.1.	APÉNDICE I	101

1. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. GENES EXPRESADOS EN HEMBRAS DURANTE LA ETAPA EMBRIONARIA DE DIMORFISMO SEXUAL	16
TABLA 2. ESTUDIOS DE MAPEO GENÓMICO EN PACIENTES MRKH CON CARIOTIPO 46, XX.....	28
TABLA 3. NÚMERO DE EMBRIONES UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.....	33
TABLA 4. INFORMACIÓN DE LOS PRIMERS UTILIZADOS PARA EL MÉTODO DE SEXADO POR PCR...	35
TABLA 5. COBERTURA DEL MICROARREGLO GENECHIP MOUSE GENE 2.0 ST (AFFYMETRIX, INC.).	40
TABLA 6. CONCENTRACIONES FINALES DE LOS CONTROLES DE RNA POLIADENILADO EN LAS MUESTRAS DE RNA.....	41
TABLA 7. CALIDAD Y CANTIDAD DEL RNA EXTRAÍDO PARA EL ENSAYO	55
TABLA 8. PORCENTAJE DE COBERTURA DE LAS PRUEBAS DE ENRIQUECIMIENTO FUNCIONAL UTILIZANDO SÍMBOLOS DE LOS GENES COMO IDENTIFICADORES.....	66
TABLA 9. NÚMERO DE GENES Y PAJUSTADA PARA LAS CATEGORÍAS FUNCIONALES ENCONTRADAS EN EL GRUPO DE GENES ACTIVADOS EN HEMBRAS	69
TABLA 10. NÚMERO DE GENES Y PAJUSTADA PARA LAS CATEGORÍAS FUNCIONALES ENCONTRADAS EN EL GRUPO DE GENES ACTIVADOS EN MACHOS	72
TABLA 11. NÚMERO DE GENES Y PAJUSTADA PARA LAS CATEGORÍAS FUNCIONALES ENCONTRADAS EN EL GRUPO DE GENES REPRIMIDOS EN HEMBRAS.....	74
TABLA 12. NÚMERO DE GENES Y PAJUSTADA PARA LAS CATEGORÍAS FUNCIONALES ENCONTRADAS EN EL GRUPO DE GENES REPRIMIDOS EN MACHOS	75
TABLA 13. RESULTADOS INESPERADOS RECUPERADOS ESPECÍFICAMENTE A PARTIR DEL GRUPO A CON LA HERRAMIENTA BIOINFORMÁTICA WEBGESTALT.....	90
FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL.....	31
FIGURA 2. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE RNA TOTAL PARA SU ANÁLISIS EN MICROARREGLOS GENECHIP® MOUSE GENE 2.0 ST (AFFYMETRIX, INC.). MODIFICADO DE (AFFYMETRIX INC, WT Y REAGENT).	42
FIGURA 3. ESTRATEGIA GENERAL DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
FIGURA 4. ESTRATEGIA GENERAL DEL ANÁLISIS BIOLÓGICO.....	46
FIGURA 5. MESONEFROS MURINO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL (E13-E17).	52
FIGURA 6. COMPARACIÓN ENTRE LA GÓNADA FEMENINA Y MASCULINA DE RATÓN. AISLAMIENTO DEL MESONEFROS MURINO.....	53
FIGURA 7. PATRÓN DE PRODUCTOS DE PCR PARA EL SEXADO MOLECULAR MURINO.....	53
FIGURA 8. INTEGRIDAD DEL RNA EXTRAÍDO MEDIANTE LOS MÉTODOS DE PRECIPITACIÓN Y EXTRACCIÓN POR COLUMNA.....	54
FIGURA 9. INTEGRIDAD DE LAS MUESTRAS DE RNA UTILIZADAS EN EL ESTUDIO.....	55
FIGURA 10. IMÁGENES RESIDUALES DE LOS <i>CHIPS</i> ESCANEADOS.....	57

FIGURA 11. GRÁFICO DE CAJAS DE LA SEÑAL RELATIVA	58
FIGURA 12. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).....	59
FIGURA 13. COMPARACIÓN DE LAS RÉPLICAS TÉCNICAS.	60
FIGURA 14. PORCENTAJE DE GENES ACTIVADOS, REPRIMIDOS Y SIN CAMBIO PARA MACHOS Y HEMBRAS (E15 VS E13)..	61
FIGURA 15. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE GENES ACTIVADOS, REPRIMIDOS Y SIN CAMBIO ENTRE MACHOS Y HEMBRAS (E15 VS E13)..	62
FIGURA 16. PORCENTAJE DE GENES SOBREENPRESADOS, REPRIMIDOS Y SIN CAMBIO PARA LOS TIEMPOS E13 Y E15 (HEMBRAS VS MACHOS).	63
FIGURA 17. COMPARACIÓN DEL NÚMERO DE GENES ACTIVADOS, REPRIMIDOS Y SIN CAMBIO ENTRE LOS TIEMPOS E15 Y E13 (MACHOS VS HEMBRAS).	64
FIGURA 18. AGRUPAMIENTO AUTOMATIZADO CON LA HERRAMIENTA CLUSTER 3.0.	76
FIGURA 19. COMPARACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN MEDIANTE AGRUPAMIENTO MANUAL.	80
FIGURA 20. ILUSTRACIÓN DE LA CATEGORÍA FUNCIONAL DE REGULACIÓN NEGATIVA DE LA ACTIVIDAD PEPTIDASA OBTENIDA CON LA HERRAMIENTA GENE ONTOLOGY.....	83
FIGURA 21. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE WNT.....	85
FIGURA 22. VÍA DE SEÑALIZACIÓN TGF BETA.	88

2. GLOSARIO

Ad líbitum: Expresión del latín que significa “a placer, a voluntad”.

Alelo: Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen que se diferencian en su secuencia y que se puede manifestar en modificaciones concretas de la función de ese gen.

Aplasia: Ausencia congénita de un órgano o tejido.

Displasia: Desarrollo defectuoso de un órgano o tejido.

Autosómico dominante: Patrón de herencia clásico que se caracteriza por presentar el fenómeno de dominancia genética para un determinado alelo, cuyo locus se encuentra en alguno de los cromosomas autosómicos.

Base: Cada una de las cuatro bases nitrogenadas (Adenina, Guanina, Citosina, Timina) que conforman los nucleósidos del DNA.

Cariotipo: Análisis sistemático de los cromosomas, que consiste en capturarlos durante la metafase y analizarlos al microscopio para identificar alteraciones numéricas o estructurales.

Congénito: Rasgo presente en el nacimiento, adquirido durante el desarrollo intrauterino.

Delección: Pérdida de un segmento de la molécula de DNA, que puede ser puntual o un cromosoma completo.

Dominancia genética: Relación entre alelos de un mismo gen, en el que uno enmascara el fenotipo de otro alelo en el mismo locus.

Duplicación: Ganancia de un segmento de la molécula de DNA, generalmente producto de errores de replicación.

Ectopia: Desplazamiento o mala ubicación de un órgano del cuerpo.

Etiología: Origen de una enfermedad.

Expresión variable: Intensidad variable de los signos fenotípicos en personas con un genotipo específico.

Factor de transcripción: Proteína que participa en la regulación de la transcripción del DNA, pero que no forma parte de la RNA polimerasa.

Fenotipo: Características observables de un organismo.

Gónadas: Glándulas mixtas que en su secreción externa producen células sexuales y en su secreción interna producen hormonas que ejercen su acción en los órganos que intervienen en la función reproductora.

Locus: Localización cromosómica única que define la posición de un gen o la secuencia específica de DNA.

Mapeo genómico: Proceso de elaborar modelos del DNA mostrando posiciones relativas de genes, marcadores y otros entes estructurales y/o informacionales en los cromosomas.

Microarreglos: Arreglos microscópicos de sondas fijas, sobre las que hibrida una muestra de DNA marcado.

Morfogénesis: Formación o génesis de órganos.

Mutación: Cambio puntual que altera la secuencia de nucleótidos del DNA.

Penetrancia: Frecuencia con la cual se manifiesta un genotipo en sí mismo en un fenotipo determinado.

RNA no codificante largo: Moléculas de RNA mayores a 200 nucleótidos que no se traducen en proteínas.

RNA no codificante: Molécula de RNA funcional que no se traduce en una proteína.

Transcriptoma: Conjunto de mRNAs resultante de la traducción del genoma bajo determinadas condiciones.

3. ABREVIATURAS

AMH: Hormona antimülleriana

APE I: Endonucleasa I apurinica/apurimidimica

BMP: Proteína morfogenética ósea

bp: Pares de bases (del inglés *base pairs*)

cDNA: DNA complementario

CNV: Variante en número de copias

cRNA: RNA complementario

DLR: Reactivo de marcaje de DNA

DNA: Ácido Desoxirribonucleico (del inglés *Deoxyribonucleic acid*)

dNTP: Desoxinucleósidos trifosfatados

E: Día embrionario

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GDF: Factor de crecimiento y diferenciación

GO: Ontología genética (del inglés *Gene Ontology*)

lncRNA: RNA no codificantes largo

MRKH: Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser

mRNA: RNA mensajero

PBS: Amortiguador de Fosfatos Salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

PCA: Análisis de Componentes Principales

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

RIN: Número de Integridad del RNA (del inglés *RNA Integrity Number*)

RNA: Ácido ribonucleico

RNAasa: Ribonucleasa

rRNA: RNA ribosomal

RT: Transcriptasa Reversa

TDS: Trastornos de la diferenciación sexual

TdT: Deoxinucleotidil transferasa terminal

TRF: Tracto Reproductor Femenino

UDG: Uracil-DNA glicosilasa

4. RESUMEN

El tracto reproductor femenino (TRF) es el conjunto de órganos donde se recibe el óvulo fecundado, se desarrolla el feto y se abre paso para el nacimiento. A la fecha, no se conoce la base molecular de la diferenciación del TRF, y tampoco se ha establecido un modelo mecanístico de este proceso, ni las redes de regulación genética implicadas. En el presente trabajo se caracterizó mediante microarreglos la expresión global de genes en tejido mesonéfrico de ratones CD-1, durante los días embrionarios E13 y E15, que corresponden con la etapa de morfogénesis del TRF. Se identificaron genes que se activaron diferencialmente en hembras, y su análisis mediante pruebas de enriquecimiento funcional permitió identificar algunos procesos biológicos que podrían estar involucrados en la diferenciación del TRF. Uno de los más significativos fue la vía de señalización de Wnt; mutaciones en algunos genes de esta familia como *Wnt4*, *Wnt7a* y *Wnt5a* han sido asociadas previamente con malformaciones uterinas. Adicionalmente, se encontraron otros genes como *Wnt16* y *Sfrp5* que participan en la formación de extremidades y *Nkd2* que puede contribuir a la presencia de anomalías cardíacas. La asociación de defectos óseos y cardíacos con el síndrome de aplasia mulleriana en humanos, permite considerarlos como elementos funcionales para la diferenciación de derivados Mullerianos. También se recuperó, a partir de los genes activados en hembras, la vía de señalización de TGF-Beta. Los resultados de este trabajo permitirán priorizar genes humanos candidatos para aplasia Mulleriana y contribuirán al conocimiento de la base molecular de diferenciación del TRF.

5. ABSTRACT

The female reproductive tract (FRT) is where the fertilized egg is received; the fetus develops and makes its way to birth. To date, the molecular basis of TRF differentiation is not known, and neither is the mechanistic model of this process, including the genetic regulatory networks involved. In this paper the global expression of CD-1 mice during embryonic days E13 and E15, which correspond to TRF stage of morphogenesis, was characterized using expression microarrays. Some of the modulated genes during this stage were identified since they were differentially activated in females. The analysis of these genes by functional enrichment tests identified some biological processes that may be involved in the differentiation of FRT. Within these processes, one of the most significant is Wnt signaling pathway. Some genes of this family as *Wnt4*, *Wnt5a* and *Wnt7a* have been already implicated in the onset of uterine malformations. Besides these, some other genes like *Wnt16*, *Sfrp5* and *Nkd2* were identified. *Wnt16* and *Sfrp5* are involved in the formation of limbs and *Nkd2* may contribute to the presence of cardiac abnormalities. The association of bone and cardiac defects to Mullerian aplasia suggests that these genes may also be involved functionally in differentiating Mullerian derivatives. From the activated genes in females, the TGF-Beta signaling pathway was also recovered. The results of this work will enable prioritizing candidate human genes for Mullerian aplasia and will contribute to the knowledge of the molecular basis of TRF differentiation.

6. INTRODUCCIÓN

En el tracto reproductor femenino (TRF) ocurren procesos que son esenciales para la continuación de las especies (Kobayashi y Behringer, 2003). Anormalidades del TRF pueden resultar en infertilidad, ya que es en este conjunto de órganos donde se recibe el óvulo fecundado, se desarrolla el feto y se abre paso para el nacimiento (Kobayashi y Behringer, 2003).

Aproximadamente una de cada 4,500 mujeres padecen el síndrome Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) (Jabeen, 2011), el cual se caracteriza por la aplasia congénita del útero y del tercio superior de la vagina. Estas mujeres presentan gónadas normales y características sexuales secundarias normales (Jabeen, 2011). El síndrome MRKH se puede acompañar de otros defectos congénitos, generalmente renales, vertebrales, auditivos o cardíacos (Morcel et al., 2007). Dado que el cariotipo de estas pacientes generalmente es normal (46,XX), se han realizado estudios de mapeo genómico con el fin identificar alteraciones sub-microscópicas, como microdeleciones o microduplicaciones. Los resultados de los pocos estudios realizados a la fecha indican que las regiones cromosómicas con alteraciones relativamente recurrentes son: 1q21.1, 16p11.2, 17q12, 22q11.22, 22q11.21 y Xq21.31. Entre éstas, la delección de una región del cromosoma 17q12 presenta la mayor frecuencia (~6%) (Ledig et al., 2012); esta región incluye los genes *LHX1* y *HNF1B*, los cuales codifican para factores de transcripción y se han propuesto como posibles genes responsables de la aplasia Mülleriana. Por otro lado, el análisis de mutaciones puntuales en pacientes MRKH

ha permitido confirmar la participación de los genes *HNF1B* y *LHX1*, y proponer otros genes candidatos como *SHOX*, *TBX6* e *ITIH5*. Sin embargo, hasta el momento la recurrencia de estas alteraciones es baja, lo que fortalece la teoría de que se trata de un síndrome con etiología genética compleja (Sandbacka et al., 2013). Considerando que el resto de los casos MRKH estudiados no presentan mutaciones puntuales ni alteraciones en número de copia de estos genes, los resultados indican que la aplasia Mülleriana es una patología multifactorial y poligénica.

A pesar de la importancia que tiene el desarrollo de tratamientos más eficaces para mujeres con MRKH, esta área de estudio se encuentra limitada por la falta de conocimiento sobre la etiología del síndrome y, de manera general, sobre el mecanismo básico de morfogénesis del TRF.

Los diferentes estudios realizados en modelos animales, principalmente en ratón, han permitido identificar algunos de los genes que participan en el desarrollo sexual. De manera general, la diferenciación testicular se regula principalmente por los genes *Sry* y *Sox9*, mientras que la diferenciación del ovario se promueve por la expresión de los genes *Wnt4*, *Foxl2* y *Rspo1*. La diferenciación sexual femenina se divide en la formación y diferenciación de los conductos de Müller. Durante la formación, la iniciación se regula por *Lhx1*, la invaginación por *Wnt4* y la elongación principalmente por *Pax2*, *Emx2*, *Wnt9b*, la vía PI3K/AKT y la señalización producida por el ácido retinoico. La diferenciación finalmente

depende de una compleja red de genes *Hox* y *Wnt*. Además, mutaciones en *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Wnt7a* y *Wnt5a* pueden provocar malformaciones uterinas.

Cabe señalar que la mayoría de los genes identificados a la fecha, codifican para factores de transcripción o proteínas de señalización. Esto sugiere que dichos genes constituyen el componente regulador de un sistema, que probablemente involucra también genes efectores de menor jerarquía. A la fecha, no se ha esclarecido la base molecular de la diferenciación del tracto reproductor femenino, no se ha establecido un modelo mecanístico de este proceso, ni las redes de regulación genética implicadas.

La tecnología de microarreglos es una plataforma poderosa para la investigación biológica (Kim, Ph, Kang, y Park, 2004), ya que proporciona información cuantitativa sobre la abundancia de todas las especies de RNA presentes en células y tejidos (Lovén et al., 2013). Los microarreglos han sido utilizados para la investigación básica, el diagnóstico de enfermedades, el desarrollo y descubrimiento de fármacos, la generación de terapias personalizadas para diferentes patologías y la generación de bases de datos con información acerca de los procesos que se llevan a cabo en los seres vivos (Lovén et al., 2013). A pesar de los avances que se tienen en el conocimiento de algunas de las interacciones génicas involucradas en la diferenciación sexual femenina, a la fecha no hay una descripción de los cambios transcripcionales que suceden en el tejido Mülleriano durante la embriogénesis. Es por esto que la caracterización del transcriptoma durante la diferenciación de los conductos mesonéfricos en ratón, permitirá

identificar aquellos genes que, por su perfil diferencial de expresión, estén potencialmente involucrados en el desarrollo del TRF.

7. ANTECEDENTES

Hay dos procesos involucrados en el desarrollo sexual: la determinación sexual y la diferenciación sexual. La determinación sexual consiste en la diferenciación de las gónadas en testículos u ovarios. Una vez diferenciadas las gónadas, sus productos inducen la diferenciación sexual, que origina la formación de los órganos sexuales (Eggers y Sinclair, 2012), así como otras características fenotípicas secundarias. El desarrollo del tracto urogenital comienza después del periodo de gastrulación durante la diferenciación del mesodermo intermedio (Kobayashi y Behringer, 2003), y es posterior a la diferenciación gonadal.

7.1. DETERMINACIÓN SEXUAL

La determinación sexual en mamíferos depende de la constitución genética establecida durante la fecundación (Crews, 1993). Al inicio de la gestación los embriones de ambos sexos difieren únicamente en sus cromosomas sexuales. Los individuos femeninos poseen dos cromosomas X, mientras que los individuos masculinos poseen un cromosoma X y un cromosoma Y. Son los cromosomas sexuales los que normalmente definirán el destino sexual del individuo.

A nivel histológico, la formación de las gónadas en ratones comienza sobre la superficie ventromedial del mesonefros alrededor del día embrionario E10. Una vez formadas las gónadas, la diferenciación de éstas hacia testículos u ovarios tiene inicio en E10.5 en ratón y a las 6 semanas de gestación en humanos. En los

embriones XY, las células somáticas de la gónada se diferencian en células de Sertoli que, al fusionarse con las células germinales, dan origen a los cordones testiculares (presuntos túbulos seminíferos). Por otro lado, las células esteroideogénicas, se diferencian en células de Leydig, que producirán testosterona (Ono y Harley, 2013). En los embriones XX, las células de soporte de la gónada se convierten en células de la granulosa, mientras que las células esteroideogénicas se diferencian en células theca en el estroma ovárico. La síntesis de esteroides sexuales se lleva a cabo en el ovario, y comienza con la síntesis de androstenediona en las células theca, para posteriormente ser convertida en estrona o estradiol por las células de la granulosa (Ono y Harley, 2013).

A nivel molecular, las interacciones génicas involucradas en la determinación sexual han sido difíciles de establecer. El modelo murino ha sido el modelo mamífero más ampliamente estudiado para entender los mecanismos involucrados en el desarrollo sexual (Ono y Harley, 2013). Asimismo, los estudios de trastornos de la diferenciación sexual (TDS) en humanos, así como experimentos de inducción de reversión sexual en ratones, han permitido descubrir la relación de algunos genes en la determinación sexual (Knower, Kelly, y Harley, 2003).

Para los machos, el dimorfismo sexual comienza con la expresión del gen *Sry* (del inglés *sex-determining region Y*) en las células somáticas de la gónada. *SRY* es el primer miembro descrito de la familia de factores de transcripción SOX (*SRY-Related HMG-Box Gene*) y se encuentra codificado en el cromosoma Y. La familia

SOX contiene 20 proteínas, tanto en humano como en ratón, y cada una tiene diferentes funciones en la embriogénesis y el desarrollo de varios órganos. Típicamente los genes SOX actúan como interruptores de la diferenciación celular. En ratón, se ha demostrado que la actividad de *Sry* regula positivamente la transcripción de *Sox9* en los precursores de las células de Sertoli, lo que a su vez activa a otros genes involucrados en la diferenciación de las mismas. Aunque no se conoce cabalmente, algunos genes han sido involucrados en la regulación de *Sry*, como son los factores de transcripción: *Wt1*, *Cbx2*, *Gata4* y *Fog2*; así como el gen codificante de la cinasa *Map3k4* y los genes codificantes de los receptores de membrana: *Ir*, *Irr* y *Igf1r*. Además de la importancia de la expresión de *Sry*, existen distintos mecanismos que refuerzan y aseguran la activación de la vía masculina de diferenciación gonadal: estudios recientes de desarrollo testicular normal en ratón han demostrado la existencia de células precursoras de células de Sertoli capaces de expresar a *Sox9* sin la necesidad de que *Sry* se exprese previamente (Wilhelm et al., 2005). También se ha reportado que la presencia de prostaglandina D2 (*Pgd2*) activa la expresión de *Sox9*. Finalmente, aunque no se ha probado que *Fgf9* (Factor de crecimiento fibroblástico 9) sea un blanco de *Sox9*, se sabe que *Fgf9* es necesario para el mantenimiento de su expresión (Revisado en Kashimada y Koopman, 2010).

Sry suprime directa o indirectamente la vía de determinación sexual femenina, que de otra forma continuaría activa. En las hembras (*i.e.* en ausencia de *Sry*), varios genes se expresan de manera específica durante la etapa embrionaria E11.5 - E12.5. (Tabla 1).

Tabla 1. **Genes expresados en hembras durante la etapa embrionaria de dimorfismo sexual**

Símbolo	Nombre	Función
<i>Wnt4</i>	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>	Factor de crecimiento que regula múltiples procesos del desarrollo como la formación del riñón, suprarrenal, glándula mamaria, hipófisis y sistema reproductor femenino.
<i>Foxl2</i>	Forkhead box L2	Factor transcripcional esencial para la función reproductiva femenina.
<i>Rspo1</i>	R-spondin family, member 1	Molécula de señalización para la diferenciación de las células somáticas femeninas en ratones.

Referencia: Del Castillo Ruiz, Uranga Hernández, y Zafra de la Rosa, 2012.

La expresión de *Wnt4*, *Foxl2* y *Rspo1* regula positivamente a otros genes femeninos, como el gen de la folistatina, una glicoproteína que se expresa en casi todos los tejidos de animales superiores. Este programa específico de expresión genética femenina provoca la diferenciación de las células de la granulosa y de las células theca, la producción de oocitos y la formación de folículos ováricos. Estos eventos también ocurren en gónadas XY que carecen del gen *Sry*, lo que soporta la idea de que *Sry* está involucrado tanto en la activación de la vía determinante de testículo como en la supresión de la vía determinante de ovario (revisado en Kashimada y Koopman, 2010).

7.2. DIFERENCIACIÓN SEXUAL

La diferenciación sexual depende de la diferenciación gonadal previa, al ser regulada principalmente por las hormonas que producen y por los receptores de las células efectoras (Eggers y Sinclair, 2012). De este modo, las células somáticas de las gónadas determinarán el desarrollo del embrión como macho o hembra (Kobayashi, Shawlot, Kania, y Behringer, 2004). Sin embargo, antes de la diferenciación sexual todos los embriones poseen dos pares de ductos genitales: los conductos de Müller y los conductos de Wolff.

7.2.1. DIFERENCIACIÓN DEL TRACTO REPRODUCTOR

Estudios desarrollados en modelo murino han permitido caracterizar los cambios anatómicos e histológicos que ocurren en el mesonefros durante la embriogénesis: Los conductos de Wolff son los primeros en desarrollarse a partir del día embrionario E9 (Kobayashi et al., 2004), terminando su formación en el E10.5 (Huang, Orvis, Kwan, y Behringer, 2014). Una vez formados los conductos de Wolff, los conductos de Müller comienzan su formación el E11.5 (Kobayashi et al., 2004) y completan su elongación el E13.5 (Huang et al., 2014). Hasta este punto, las diferencias estructurales entre machos y hembras son evidentes únicamente a nivel gonadal.

Posteriormente, en los machos los testículos fetales secretan la hormona antimülleriana (AMH) causando la regresión de los conductos de Müller a partir del E13.5 (Kobayashi et al., 2004). La producción de testosterona desencadena

una cascada de señalización que inducirá la diferenciación de los conductos de Wolff en vasos deferentes, vesículas seminales, epidídimos, entre otros (Nef, 2000). La eliminación de los conductos de Müller se completa el día E16.5 (Kobayashi y Behringer, 2003).

En el caso de las hembras (*i.e.* en ausencia de hormonas masculinas), los conductos de Wolff se degeneran y los conductos de Müller se diferencian dando lugar al útero, trompas de Falopio y vagina proximal (Kobayashi y Behringer, 2003) (Kobayashi et al., 2004). El conducto de Müller se elonga hasta alcanzar y fusionarse con el seno urogenital para formar el ducto útero-vaginal, que dará origen al útero caudal, cérvix y parte superior de la vagina. La región rostral del conducto Mülleriano se desarrolla en el oviducto y el útero rostral (Mullen y Behringer, 2014). El útero termina su formación a partir del E16.5 (Kobayashi et al., 2004).

Aunque la diferenciación sexual femenina normalmente se ha atribuido a la ausencia de hormonas masculinas (Kobayashi y Behringer, 2003), algunos estudios sugieren que podría haber más factores involucrados, como son los estrógenos maternos, fetales y ováricos fetales (Sadler, 2000).

7.2.2. ASPECTOS GENÉTICOS Y MOLECULARES

El desarrollo de los conductos de Müller está íntimamente relacionado con los conductos de Wolff (Orvis y Behringer, 2007). La formación del conducto de Müller

se lleva a cabo en tres fases distintas: Iniciación, invaginación y elongación (Mullen y Behringer, 2014). Mientras las fases de iniciación e invaginación son independientes del conducto de Wolff, la fase de elongación depende de éste (Orvis y Behringer, 2007).

Durante la iniciación, la proteína Lhx1 (antes conocida como Lim1), se expresa específicamente en las células epiteliales mesonéfricas destinadas a convertirse en células epiteliales del conducto Mülleriano y es considerada como esencial en las células progenitoras del conducto mulleriano para el desarrollo del tracto reproductor femenino durante la embriogénesis murina (Orvis y Behringer, 2007). En experimentos previos utilizando ratones *knock-in* para *Lhx1* (mediante sustitución con *lacZ*), se determinó la expresión específica del reportero en el epitelio de los conductos de Müller durante su formación y diferenciación en hembras, y durante su regresión en machos (Kobayashi et al., 2004). En este trabajo se observó que las hembras nulas para *Lim1* presentaron ovarios pero carecieron de útero y oviductos (Kobayashi et al., 2004), fenotipo análogo a la aplasia Mülleriana humana. En el caso de los machos, aunque tenían gónadas normales no desarrollaron derivados Wolffianos (Kobayashi et al., 2004). Recientemente, se desarrolló un modelo murino *knockout* para *Lhx1* específico del conducto Mulleriano; esta alteración dio como resultado hembras viables pero infértiles debido a la ausencia congénita de útero (Huang et al., 2014). El estudio de la secuencia de *Lhx1* indica que es un factor de transcripción, parte de una familia génica conservada en vertebrados y con ortólogos incluso en *C. elegans*. Los experimentos descritos en modelo murino sugieren que este factor de

transcripción es un regulador de alta jerarquía, que controla la expresión de ciertos genes que potencialmente participan en la morfogénesis embrionaria del TRF.

La expresión de *Wnt4* en el mesénquima mesonéfrico inicia la invaginación de las células progenitoras de los conductos de Müller (Mullen y Behringer, 2014). Ratones nulos para *Wnt4* mostraron ausencia de conductos Müllerianos (Yao et al., 2004). Debido a que los conductos Müllerianos presentaron regresión antes de la producción de AMH, la ausencia de conductos de Müller se atribuyó a la falta de expresión de *Wnt4* en los precursores mesenquimales (Parker y Schimmer, 2006). La pérdida de *Wnt4* no altera la expresión de *Lhx1* en las células precursoras del conducto Mülleriano, sin embargo estas células no se invaginan, lo que significa que *Wnt4* es necesario para la invaginación, pero no para la especificación (Mullen y Behringer, 2014).

Durante la fase de elongación se requiere del conducto de Wolff para el desarrollo del conducto Mülleriano. Se ha observado que si la elongación del conducto de Wolff es interrumpida en algún punto específico, el conducto de Müller es incapaz de elongarse más allá de ese punto (Orvis y Behringer, 2007). La punta invaginada del conducto de Müller, hace contacto con el conducto de Wolff y continúa su elongación a lo largo de este hasta fusionarse con el seno urogenital (Mullen y Behringer, 2014). *Pax2* es crítico para el desarrollo de los conductos de Wolff y Müller. En ratones mutantes para *Pax2*, se ha observado que el conducto de Wolff comienza a formarse a partir del E9.5 pero no termina su elongación, y en el E12.5 comienza a degenerarse. Por su parte, el conducto de Müller comienza a

formarse normalmente, pero su elongación solamente ocurre a lo largo del conducto de Wolff truncado. El conducto de Müller también se degenera y para el E16.5 ambos conductos han desaparecido (Mullen y Behringer, 2014). Dentro de los genes que regula *Pax2* se encuentra *Bcl2*, un gen antiapoptótico que se sabe también se expresa en los conductos de Müller (Park, Jia, Rajakumar, y Chamberlin, 2006).

El gen *Pax8*, que pertenece a la misma familia de *Pax2*, se coexpresa con este último en el desarrollo de los conductos de Müller y Wolff. Ratones mutantes para el gen *Pax8*, son capaces de desarrollar tractos reproductores normales, sin embargo, dobles mutantes *Pax2/8* presentan ausencia del conducto de Wolff. Esto sugiere que la función combinada de estos genes es necesaria para la formación del tracto reproductor masculino. Aunque es posible que la función de *Pax2/8* sea redundante en el epitelio del conducto de Müller, no se han reportado los detalles del desarrollo del conducto de Müller en estos dobles mutantes (Kobayashi y Behringer, 2003).

Otros genes que están involucrados en la elongación de los conductos Müllerianos son *Emx2* y *Wnt9b*. La vía PI3K/AKT, así como la señalización producida por el ácido retinoico (Mullen y Behringer, 2014). En ratones nulos para *Emx2* el desarrollo de los conductos de Wolff se observó normalmente hasta el día E10.5, sin embargo, su degradación prematura comenzó el día E11.5. Para el día E13 el mesonefros se encontró degenerado y los conductos de Müller nunca se formaron. (Miyamoto, Yoshida, Kuratani, Matsuo, y Aizawa, 1997). En ratones mutantes para

Wnt9b la estructura de los conductos de Wolff no se ve afectada, sin embargo, la elongación de los conductos Müllerianos queda bloqueada. Esto sugiere que el conducto de Wolff guía la elongación del conducto de Müller mediante la secreción de *Wnt9b* (Mullen y Behringer, 2014).

En cultivos de órganos urogenitales de rata, tratados con inhibidores de PI3K (Fujino et al., 2009), se observó el bloqueo de la elongación de los conductos de Müller. Debido a que la migración de células epiteliales no se vio afectada, se cree que PI3K se requiere para activar enzimas que rompan la matriz extracelular que bloquea la invasión de la punta caudal del conducto Mülleriano (Mullen y Behringer, 2014). Por otro lado, la señalización de ácido retinoico es requerida para la formación de los conductos de Müller. Aunque no se han reportado defectos del tracto reproductor femenino (TRF) debido a mutantes sencillas en los genes codificantes para receptores del ácido retinoico (*Rar*) (genes *Rara1*, *Rara2*, *Rarb2* o *Rarg*), se observó ausencia completa de los conductos de Müller en dobles mutantes *Rara1/Rarb2*. Adicionalmente otras combinaciones de mutaciones en *Rar* han resultado en pérdida parcial de la región caudal del conducto de Müller. Esto sugiere que la señalización del ácido retinoico tiene funciones importantes para la formación de los conductos Müllerianos (Mullen y Behringer, 2014).

Una vez terminada su formación, la diferenciación de los conductos Müllerianos depende de una compleja red de genes *Hox* y *Wnt*. Los genes *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11* y *Hoxa13* se expresan a lo largo del eje antero-posterior del conducto de

Müller. *Hoxa9* se expresa en el oviducto, *Hoxa10* en el mesénquima del útero, *Hoxa11* en la parte posterior del útero y en el cérvix y *Hoxa13* en el cérvix y la parte superior de la vagina. Mutaciones en *Hoxa10* resultan en transformación del 25% del útero proximal en oviducto. Ratones nulos para *Hoxa11* mostraron un útero más corto y delgado, así como ausencia de glándulas uterinas (Gendron et al., 1997). Mutaciones en los genes *Wnt* también han producido afectaciones uterinas en ratones. Adultos mutantes para *Wnt7a* presentaron un útero pequeño en longitud y diámetro, con pared uterina más delgada y las glándulas uterinas ausentes (C. Miller, Pavlova, y Sassoon, 1998). Aunque los oviductos se diferenciaron, no se elongaron ni enroscaron. Por otro lado, *Wnt5a* es requerido para la diferenciación de la región caudal del conducto Mülleriano. Un estudio con ratones nulos para *Wnt5a* mostró la formación de cuernos uterinos enroscados, agenesia de cervix y de vagina (Mericskay, Kitajewski, y Sassoon, 2004). Los genes *Wnt4* y *Ctnnb1* también parecen tener un papel en la diferenciación de los conductos de Müller. Finalmente, se sabe que las hormonas esteroideas regulan muchos genes necesarios para la apropiada diferenciación de los conductos Müllerianos durante la organogénesis y durante la edad adulta (revisado en Mullen y Behringer, 2014).

En conclusión, gracias a los diferentes estudios realizados en modelos animales, ha sido posible identificar genes que participan en el desarrollo sexual. Durante la determinación sexual, la diferenciación testicular se regula principalmente por los genes *Sry* y *Sox9*, mientras que la diferenciación del ovario se promueve por la expresión de los genes *Wnt4*, *Foxl2* y *Rspo1*. La diferenciación sexual femenina

se divide en la formación y diferenciación de los conductos de Müller. Durante la formación, la iniciación se regula por *Lhx1*, la invaginación por *Wnt4* y la elongación principalmente por *Pax2*, *Emx2*, *Wnt9b*, la vía PI3K/AKT y la señalización producida por el ácido retinoico. La diferenciación finalmente depende de una compleja red de genes *Hox* y *Wnt*. Mutaciones en *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Wnt7a* y *Wnt5a* pueden provocar malformaciones uterinas. Cabe señalar que la mayoría de estos genes codifican para factores de transcripción o proteínas de señalización. Esto sugiere que dichos genes constituyen el componente regulador de un sistema, el cual involucra también genes efectores de menor jerarquía. A pesar de los avances que se tienen en el conocimiento de las interacciones génicas involucradas en la diferenciación sexual femenina, a la fecha no hay una descripción de los cambios transcripcionales que suceden en el tejido Mülleriano durante la embriogénesis. La caracterización del transcriptoma durante la morfogénesis del tracto reproductor femenino permitirá identificar aquellos genes que por su perfil diferencial de expresión, estén potencialmente involucrados en el desarrollo del TRF.

7.2.3. ESTUDIOS EN HUMANOS

El estudio del desarrollo sexual en humanos se ha limitado al abordaje de personas afectadas por trastornos de la diferenciación sexual (TDS). En esta área convergen disciplinas como endocrinología, genética, biología molecular, histología, etc. Los TDS incluyen principalmente las patologías de la determinación sexual, que inciden en la formación de gónadas con alteraciones, así como

algunas otras patologías relacionadas con la diferenciación sexual secundaria, como el síndrome de insensibilidad a andrógenos, la aplasia de derivados Müllermanos en mujeres y su persistencia en hombres, entre otros.

Al menos una de cada 4,500 mujeres padecen el síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) (Jabeen, 2011), que se caracteriza por la aplasia congénita del útero y del tercio superior de la vagina. Las mujeres afectadas presentan características sexuales secundarias normales y su cariotipo generalmente es 46,XX normal (Jabeen, 2011). Frecuentemente, la aplasia de derivados Müllermanos se puede acompañar de defectos renales, vertebrales, auditivos o cardíacos (Morcel et al., 2007). Las mujeres diagnosticadas con MRKH sufren de ansiedad extrema y angustia psicológica, por las afectaciones en su vida sexual y reproductiva. Debido a esto, el manejo de dichas pacientes puede incluir la creación de una neovagina, por procedimientos quirúrgicos o mediante el uso de dilatores vaginales (Morcel et al., 2007). Una posibilidad reproductiva para las mujeres MRKH es la reproducción asistida, mediante fecundación *in vitro* e implantación en un vientre subrogado (Jabeen, 2011). Sin embargo, el desconocimiento de la etiología del síndrome MRKH impone ciertas consideraciones sobre el riesgo de utilizar un óvulo donado por la paciente.

Durante un largo tiempo, el síndrome MRKH se consideró como una anomalía esporádica, lo que sugería causas ambientales. Sin embargo, no fue posible relacionar el síndrome con el uso de drogas, enfermedades o exposición a agentes teratogénicos durante el embarazo (Morcel et al., 2007), aunque no se ha

descartado la posibilidad de que se deba a una exposición anormal y transitoria a hormonas, de modo que se activen los mecanismos de regresión de Mullerianos por AMH. Independientemente de esto, el incremento en el número de casos familiares descritos, ha dado fuerza a la hipótesis de una causa genética (Morcel et al., 2007). En casos familiares, el síndrome MRHK parece tratarse de un rasgo autosómico dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable, lo que sugiere que las posibles causas del síndrome correspondan a mutaciones en un gen importante para el desarrollo, o bien una deleción cromosomal limitada (Guerrier et al., 2006).

Debido a que la mayoría de las pacientes MRKH presentan un cariotipo normal, se han realizado estudios de mapeo genómico en pacientes con aplasia Mülleriana para identificar regiones sub-microscópicas con alteraciones en número de copias. Las alteraciones más recurrentes que se detectaron en estos estudios involucran las regiones cromosómicas 1q21.1, 16p11.2, 17q12, 22q11.22, 22q11.21 y Xq21.31 (Tabla 2). Entre éstas, la deleción de mayor recurrencia a la fecha afecta una región del Chr. 17q12, y se ha encontrado en 10 de 175 pacientes con aplasia Mulleriana (~6%) (Ledig et al., 2012). Esto ha contribuido a la noción de que alteraciones en el gen *LHX1* contribuyen a la aplasia Mülleriana, y junto con los experimentos realizados en ratones nulos para el homólogo *Lhx1*, constituye uno de los principales indicios para establecer la base molecular del desarrollo del TRF. Más aún, *Lhx1* murino presenta 99.5% de similitud en secuencia con su ortólogo *LHX1* humano, pero a nivel de proteína tiene 100% de

identidad; esto sugiere que la cascada de regulación transcripcional que esta proteína controla puede tener bases moleculares comunes entre ambas especies.

En un estudio realizado en 2012 (Tabla 2) se encontró la microdelección 16p11.2 en 2/38 pacientes con síndrome MRKH tipo I (5%) y en 2/25 pacientes con síndrome MRKH tipo II (8%), lo que sugiere que esta variante por sí sola contribuye significativamente al padecimiento de aplasia Mülleriana (Nik-zainal et al., 2012). En 2013 se identificaron variaciones o CNVs de *TBX6* o *LHX1* en 30/112 pacientes (26.8%), variantes nuevas de *TBX6* o *LHX1* en 7/112 pacientes (6.3%) y variantes raras de *TBX6* en 15/112 pacientes (13.4%)(Tabla 2). Además, 4/112 pacientes (3.6%) presentaron variantes de *TBX6* y *LHX1* o una CNV en combinación con variantes de *TBX6*. Esto indica que la aplasia Mülleriana tiene una etiología genética compleja (Sandbacka et al., 2013).

El análisis de mutaciones puntuales en pacientes MRKH ha corroborado la relación de *HNF1B* y *LHX1* con este síndrome, y ha permitido proponer algunos otros genes candidatos: *SHOX*, *TBX6*, *ITIH5*. A pesar de esto, la recurrencia de estas alteraciones es baja, lo que fortalece la teoría de que se trata de una patología poligénica y multifactorial, probablemente con penetrancia incompleta y expresividad variable.

Tabla 2. Estudios de mapeo genómico en pacientes MRKH con cariotipo 46, XX.

Estudio	Casos positivos/n	Porcentaje de detección	Cromosomas recurrentes	Genes candidatos	Microarreglos (Resolución ²)	Secuenciación ³ (Casos positivos/n)
Cheroki et al., 2008	4/14	29%	1q21.1, 17q12, 22q11.2, Xq21.3	<i>TBX1</i> , <i>HNF1B</i> , <i>LHX1</i> , <i>KLHL4</i> y posiblemente ¹ <i>DACH2</i> y <i>POFB1</i>	aCGH (1Mb)	NA
Bernardini et al., 2009	2/22	9.1%	17q12	<i>TCF2</i> y <i>LHX1</i>	Agilent 244K (6.4 kb)	0/20
Ledig et al., 2011	15/48	31%	1q21.1, 17q12 y 22q11.21	<i>LHX1</i> y <i>HNF1B</i>	Agilent 105A (21.7 kb)	1/56 (<i>LHX1</i>) ⁴
Nik-zainal et al., 2012	9/63	14%	16p11.2, 17q12 y 22q11.2.	<i>TBX6</i> , <i>HNF1B</i> , <i>LHX1</i> , <i>RTDR1</i> , <i>RAB36GNAZ</i> y <i>BCR</i>	Agilent 244K y Affymetrix SNP 6.0 (1.6 kb)	NA
Sandbacka et al., 2013	8/50	16%	16p11.2 y 17q12	<i>TBX6</i> y <i>LHX1</i>	Agilent 180K	CNVs (30/112) Variantes nuevas (7/112) Variantes raras (15/112)

1: Debido a su cercanía al sitio de la alteración en Xq21.31.

2: Resolución calculada con base en la distribución promedio de sondas.

3: Para la detección de mutaciones en las regiones cromosómicas afectadas en pacientes sin delección.

4: Transversión de C a G en el nucleótido 790 del exón 4, lo que provoca un cambio de arginina a glicina en el codón 264 (p.R264G)

NA: No aplica

A pesar de la importancia que tiene el desarrollo de tratamientos más eficaces para mujeres con MRKH, esta área de estudio se encuentra limitada por la falta de conocimiento sobre la etiología del síndrome MRKH y, de manera general, sobre el mecanismo molecular básico de diferenciación del TRF. A la fecha no hay una descripción de los cambios transcripcionales que suceden en el tejido Mülleriano

durante la embriogénesis, lo que permitiría recurrir a un abordaje distinto y complementario a las estrategias que hasta ahora se han utilizado para contribuir al entendimiento de la etiología de la aplasia Mülleriana. Es por esto que, en el presente proyecto se caracterizó el transcriptoma de los conductos mesonéfricos, durante la ventana temporal de morfogénesis del tracto reproductor en ratón, con la finalidad de identificar genes potencialmente involucrados en el proceso de diferenciación de los conductos Mullerianos, generando información básica sobre el proceso de desarrollo del TRF, y aportando información útil para el estudio de la etiología de la aplasia Mülleriana.

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar aquellos genes potencialmente involucrados en la morfogénesis del tracto reproductor femenino mediante la caracterización de la expresión global de genes murinos durante esta etapa embrionaria.

8.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sexar los embriones utilizados en el estudio de expresión génica.
2. Documentar las etapas anatómicas del desarrollo de los conductos Müllерianos y Wolffianos durante el periodo embrionario de E13-E17.
3. Obtener el RNA total de conductos Müllерianos y Wolffianos de embrión murino de las etapas embrionarias citadas.
4. Procesar las muestras e hibridar los microarreglos de expresión.
5. Analizar estadística y biológicamente de los datos de microarreglos.

9. HIPÓTESIS

El análisis de los cambios transcripcionales del mesonefros murino masculino y femenino, durante la etapa embrionaria E13 a E17, permitirá identificar genes cuyo patrón temporal de expresión corresponda potencialmente con el proceso de morfogénesis del tracto reproductor femenino.

10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

10.1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

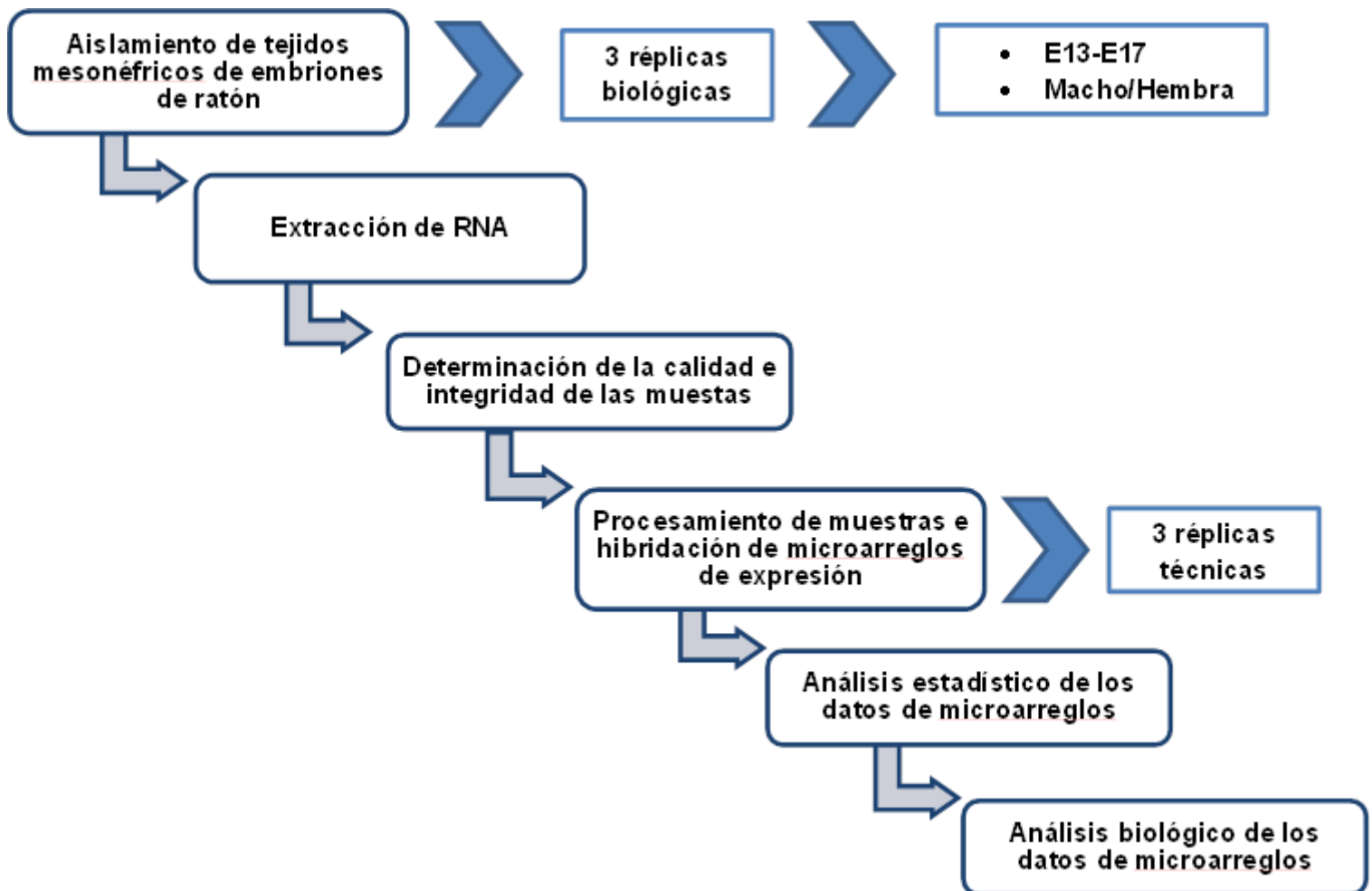


Figura 1. Diagrama de flujo experimental.

En el diagrama se indican los pasos generales que se siguieron para la caracterización del transcriptoma murino durante la morfogénesis del tracto reproductor femenino.

10.2. CONDICIONES DE CRIANZA

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) cepa CD-1 para el estudio, ya que estos son derivados de la línea Swiss Webster, la cual ha sido empleada como fondo genético en los estudios de inactivación de *Lhx1*. Los animales fueron criados y apareados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se mantuvo a los ratones bajo condiciones controladas de luz y temperatura, en cajas de plástico. Durante el periodo de apareamiento, se colocaron aproximadamente 6 hembras con 1 macho en cada caja. Los ratones fueron alimentados con el preparado comercial Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010 (LabDiet®) y agua *ad libitum*. Se revisó la presencia de tapón vaginal para determinar la fecha en la que las hembras quedaron preñadas. Una vez preñadas, los machos fueron separados de las hembras y las hembras se mantuvieron bajo las condiciones de crianza hasta el día de la recolección de muestras. Todas las manipulaciones de animales se llevaron a cabo por personal especializado, bajo los estándares de manejo y lineamientos éticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

10.3. OBTENCIÓN DE TEJIDOS

Se aisló el tejido mesonéfrico y gónadas de los embriones murinos machos y hembras de E13 - E17. Este proceso fue realizado por el M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. De forma general, los embriones se mantuvieron en contacto con solución de PBS 1X, se extrajeron del saco vitelino y se sacrificaron por decapitación. Se localizó el tejido mesonéfrico en los embriones y se realizó su aislamiento junto con la

gónada. Se colectaron tejidos de al menos 17 embriones por cada tiempo y género estudiados (Tabla 3), ya que durante la estandarización del proceso de extracción de RNA se observó que la eficiencia de recuperación de la columna utilizada es adecuada a partir de la cantidad de tejido sólido obtenida de 15 embriones. La cantidad necesaria de crías se obtuvo a partir de 3 hembras preñadas por cada tiempo de muestreo, lo que permitió obtener un total de 3 réplicas biológicas en el estudio.

Tabla 3. Número de embriones utilizados en el estudio

EDAD	SEXO	REPLICA	No. DE EMBRIONES
E13	HEMBRAS	1	7
		2	4
		3	6
		TOTAL	17
	MACHOS	1	5
		2	10
		3	5
TOTAL		20	
E15	HEMBRAS	1	6
		2	6
		3	7
		TOTAL	19
	MACHOS	1	8
		2	8
		3	1
TOTAL		17	

Nota: Por cada embrión se colectó un par de tejidos mesonéricos, sin embargo, para un embrión de las réplicas 2 y 3 de las hembras del tiempo E13 únicamente fue posible colectar una de las dos estructuras.

Los tejidos mesonéricos junto con la gónada se mantuvieron en PBS 1X y tras la inspección visual de la gónada (ver sección 10.4), las muestras fueron separadas en hembras y machos. Una vez realizado el sexado, la gónada se separó del

mesonefros y estos se colectaron en tubos eppendorf (colectando las réplicas biológicas en tubos separados). Se eliminó la solución remanente de PBS 1X y se sustituyó con 100 μ L de TRIzol (Ambion, Life Technologies). Las muestras fueron congeladas en hielo seco y almacenadas a -80C hasta su procesamiento.

10.4. SEXADO DE EMBRIONES MURINOS

Los embriones fueron sexados mediante inspección visual de las gónadas al día E13 y E15, en los cuales ya se encuentran bien diferenciadas. Este método fue suficiente para determinar con precisión el sexo de los embriones. Adicionalmente, se adaptó una técnica de sexado molecular para confirmar el género asignado, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Esta técnica es útil para determinar el sexo de ratones neonatos en los que no es sencillo realizar la determinación a simple vista. Se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos iniciadores (*i.e. primers*) para amplificar los genes *Sry* y *Jarid*. La información sobre los primers utilizados, se muestra en la Tabla 4.

La detección del gen *Sry* por PCR permite una rápida identificación de DNA de macho, ya que su locus está en el cromosoma Y y esto se conserva entre las especies (Lambert et al., 2000). En presencia de DNA masculino, los *primers* utilizados para SRY generan un amplicón de 402 bp, mientras que en su ausencia no se produce amplicón alguno (Lambert et al., 2000). Para confirmar que el DNA

molde utilizado en las reacciones es de calidad adecuada para PCR, y como método de confirmación adicional, se incluyeron *primers* específicos para *Jarid*.

Tabla 4. Información de los primers utilizados para el método de sexado por PCR.

Nombre	Secuencia	Peso molecular	Tm (°C)	Número de bases
SRY F (Forward)	5'-TGGGACTGGTGACAATTGTC-3'	6188.1	60.4	20
SRY R (Reverse)	5'-GAGTACAGGTGTGCAGCTCT-3'	6173.1	62.4	20
Jarid F (Forward)	5'-CTGAAGCTTTTGGCTTTGAG-3'	6154.1	58.4	20
Jarid R (Reverse)	5'-CCGCTGCCAAATTCTTTGG-3'	5754.8	60.2	19

El gen *Jarid1c* se localiza específicamente en el cromosoma X, mientras que el gen *Jarid1d* en el cromosoma Y. Debido a que los exones 9 y 10 de ambos genes tienen un alto grado de similitud en su secuencia, es posible amplificar ambos genes con el mismo par de *primers* empleados. La discriminación entre dichos genes se basa en el tamaño de los amplicones, el cual difiere a razón del intrón entre los dos exones; en el caso de *Jarid1c*, el intrón es de 114 bp, mientras que para *Jarid1d* es de 85 bp; esto es, una diferencia de 29 bp. En presencia de DNA macho, se producen dos amplicones: el correspondiente a *Jarid1c* (331 bp) y el de *Jarid1d* (302 bp); en ausencia de DNA macho y presencia de DNA de hembra, se produce solamente el amplicón de *Jarid1c* (Clapcote y Roder, 2005).

Finalmente, al utilizar ambos juegos de primers (Jarid y Sry) para sexado, se obtiene un patrón de bandeos fácil de interpretar. Para DNA macho, se obtienen 3 amplicones (402 bp, 331 bp y 302 bp), mientras que para DNA hembra solamente se obtiene el amplicón de 331 pb. Para llevar a cabo el procedimiento de sexado por PCR se realizó previamente la extracción de DNA de tejido, que se describe en los párrafos subsecuentes. La estandarización del sexado por PCR resultó exitosa partiendo de tejido sólido de ratones adultos. Sin embargo, no fue necesario utilizar esta técnica en los procedimientos con embriones, debido a que la precisión del sexado por inspección de la gónada fue eficiente, aunado a que se limitó la recolección de tejido embrionario por recomendaciones éticas, y al riesgo de contaminación de los tejidos durante la manipulación de los embriones.

10.4.1. **EXTRACCIÓN DE DNA**

Para extraer DNA a partir de tejido proveniente de la región craneal de los embriones utilizados en el estudio de expresión genética, se utilizó el kit AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep (Axygen Biosciences, Inc.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se colocaron aproximadamente 20mg de tejido en un tubo de 1.5µL y se agregaron 5µL de EDTA (5mM), 350µL de PBS 1X, 0.9µL de Ribonucleasa A (50mg/mL), 20µL de proteinasa K (15mg/mL) y 150µL del buffer C-L. Se incubó el tejido a 56°C durante 15 minutos, y una vez transcurrido el tiempo se eliminó el debris por centrifugación. El sobrenadante se transfirió a una columna de afinidad (silica), y se realizó la unión, lavados y elución final en dos rondas de 50µL de amortiguador de elución cada una. La pureza y

cantidad del DNA extraído se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, Inc.). La integridad del DNA se verificó por corrimiento electroforético en geles de agarosa-TBE al 0.8% (m/v), teñidos con bromuro de etidio.

10.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se llevaron a cabo reacciones de PCR en un volumen total de 25 μ L, utilizando agua ultra pura HyClone (Thermo Fisher Scientific Inc.), amortiguador DreamTaq 1X (Thermo Fisher Scientific Inc.), 0.4 mM de dNTP, y aproximadamente 0.7mM de cada uno de los 4 *primers* empleados para sexado. Se añadieron 2.5U de DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) y 50ng de DNA genómico por reacción. Las muestras fueron incubadas en un termociclador Veriti (Applied Biosystems Inc.) con el siguiente ciclaje: una ronda a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos y 68°C por 25 segundos. Finalmente las muestras se incubaron a 68°C durante 1 minuto. Se analizaron 5 μ L de cada producto de reacción mediante electroforesis en geles de agarosa-TBE al 2% (m/v), realizando el corrimiento a 400mA durante 65 minutos. Las muestras se cargaron en los geles mezclándolas previamente con 1 μ L de solución *loading dye* 6X (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.25% y xilencianol 0.25%).

10.5. EXTRACCIÓN DE RNA

Los tejidos se lisaron mecánicamente utilizando perlas de vidrio de 0.5mm nuevas Cell Disruption Media (Scientific Industries, Inc.), previamente inactivadas con radiación UV. Con el fin de obtener un rendimiento de RNA adecuado, se mezclaron los tejidos provenientes de las diferentes réplicas biológicas. Se homogeneizaron ≥ 17 pares de conductos Mullerianos o Wolfianos (con el mínimo tejido de soporte necesario para su aislamiento) en tubos tipo Eppendorf de 1.5ml, con 300 μ L de TRIzol (Ambion, Life Technologies), y perlas de vidrio hasta un volumen equivalente a 50 μ L. La homogenización de los tejidos se estandarizó en un vortex Disruptor Genie (Scientific Industries, Inc.), observándose buenos resultados de rendimiento e integridad a 2 minutos a la velocidad máxima. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 12000xg durante 1 minuto para sedimentar el debris y las perlas, y el sobrenadante fue colectado y procesado con el kit de extracción de RNA Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research Corp.) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, se agregaron 300 μ L de etanol anhidrido (Shelton Scientific IBI®) a la muestra y se mezclaron bien con vortex. La mezcla se colocó en una columna de afinidad Zymo-Spin IIC, donde se realizó la unión, lavados y elución. El RNA se eluyó pipeteando 50 μ L de agua libre de nucleasas en la columna y centrifugando a 10000xg durante 1 minuto. La calidad y cantidad del RNA extraído se determinó de manera preliminar por espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000 (Thermofisher Scientific, Inc.).

10.6. DETERMINACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

La calidad general del RNA se evaluó mediante el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.) de la Unidad de Microarreglos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), siguiendo el protocolo de servicio de análisis de calidad RNA de dicha institución. El procedimiento completo se describe en el apéndice I. El valor de integridad de RNA (RIN) de las muestras utilizadas en el estudio fue mayor de 7.0 para todas las muestras; los geles y electroferogramas corroboraron la integridad de las mismas.

10.7. MICROARREGLOS

De manera general, los microarreglos de DNA consisten de millones de sondas (oligonucleótidos) que se encuentran fijadas sobre una superficie sólida. Las sondas contienen secuencias que son complementarias y representan de manera muy específica las diferentes especies de RNA conocidas, y se utilizan para cuantificar los niveles relativos de los blancos de RNA con los que hibridan (Lovén et al., 2013). El ordenamiento de estas sondas en la superficie del soporte permite su identificación mediante coordenadas, y cada una corresponde a un elemento genético específico (genes, exones, tRNA, miRNA, etc.), establecido en una base de datos. Los blancos de RNA se marcan con moléculas reporteras, generalmente fluorescentes, de forma que cuando sucede una hibridación exitosa con las sondas, se produce un incremento en la intensidad de fluorescencia que puede

ser cuantificado con un escáner, mapeado de acuerdo con sus coordenadas y adjudicado al elemento genético correspondiente. Los datos de fluorescencia pueden ser analizados por distintos métodos y los detalles experimentales como el tipo de superficie sólida y la longitud y densidad de las sondas varía dependiendo del tipo de microarreglo utilizado (M. B. Miller y Tang, 2009).

Para el presente estudio se utilizaron los microarreglos GeneChip Mouse Gene 2.0 ST (Affymetrix, Inc.). Este microarreglo está diseñado con una mediana de 22 sondas por transcrito, cada una con una longitud de 25 nucleótidos. Este microarreglo tiene una cobertura para 35,240 elementos transcritos del genoma de ratón, los cuales se distribuyen como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Cobertura del microarreglo GeneChip Mouse Gene 2.0 ST (Affymetrix, Inc.)

Elementos transcritos	Cobertura
Transcritos codificantes con anotación bien establecida	26,191
Transcritos no codificantes con anotación bien establecida	3,391
Transcritos codificantes con anotación provisional	1,946
Transcritos no codificantes con anotación provisional	3,712
lncRNAs (RNAs no codificantes largos)	~2000
Recuento de genes RefSeq (Entrez)	26,515

Los microarreglos utilizados requieren una cantidad mínima de RNA total de 50ng, mientras que la concentración recomendada es de 100 ng. Las muestras de RNA fueron procesadas para el análisis de expresión con el kit GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Affymetrix Inc.) siguiendo el protocolo del fabricante. El diagrama del proceso se muestra en la Figura 2.

Se preparó un conjunto de transcritos poliadenilados para genes de *B. subtilis* (*lys*, *phe*, *thr*, y *dap*). Este conjunto de RNAs poliadenilados está diseñado como control positivo exógeno y debe ser agregado a las muestras de RNA antes de la síntesis de cDNA (DNA complementario). Los controles se amplifican y marcan junto con las muestras de RNA lo que permite monitorear (mediante la intensidad de hibridación dichos controles en los microarreglos) el proceso de marcaje de las muestras (independientemente de la calidad de las mismas).

Las concentraciones finales de los transcritos polidenilados en las muestras de RNA se muestran en la Tabla 6. Estas concentraciones fueron obtenidas mediante diluciones en serie de la mezcla original de controles de RNA poliadenilado incluida en el kit.

Tabla 6. Concentraciones finales de los controles de RNA poliadenilado en las muestras de RNA

Control de RNA poliadenilado	Concentración final
Lys	1:100,000
Phe	1:50,000
Thr	1:25,000
Dap	1:6,667

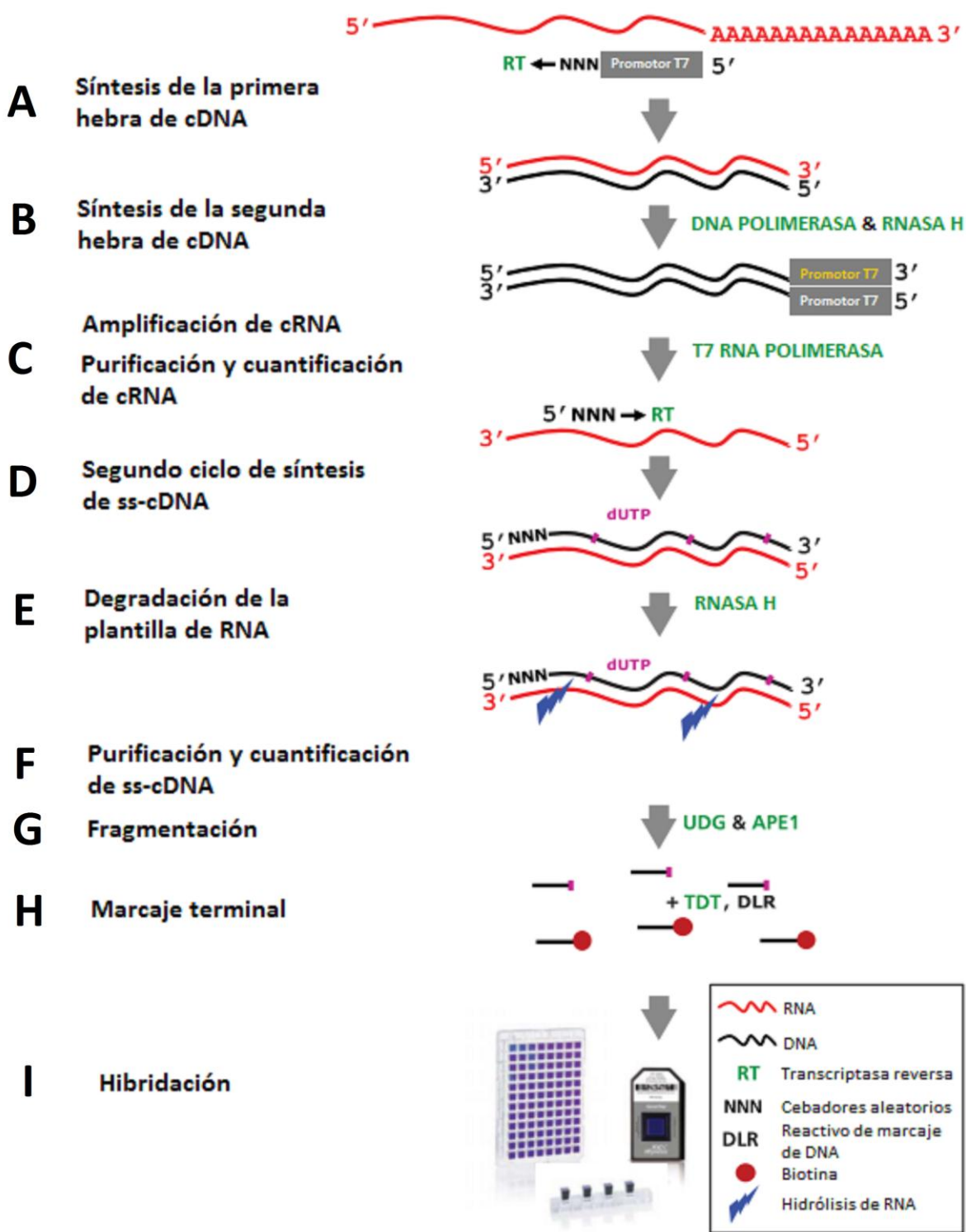


Figura 2. Procesamiento de muestras de RNA total para su análisis en microarreglos GeneChip® Mouse Gene 2.0 ST (Affymetrix, Inc.). Modificado de (Affymetrix Inc, Wt y Reagent).

Una vez preparados los controles, se inició el procesamiento de las muestras para microarreglo (Figura 2), brevemente: a partir de cada muestra de RNA se tomaron 2 alícuotas para ser procesadas de manera independiente de forma que en el estudio se incluyeron 2 réplicas técnicas. Se sintetizó cDNA de cadena sencilla utilizando iniciadores aleatorios (*random primers*) los cuales contienen la secuencia del promotor T7 en el extremo 5' (Figura 2, A). Posteriormente, se sintetizó la hebra complementaria de cDNA, obteniendo un dúplex, que sirvió subsecuentemente como molde para transcripción *in vitro*; por lo que se utilizó RNasa H para degradar el RNA del dúplex híbrido inicial y una DNA polimerasa para sintetizar la segunda cadena de cDNA (Figura 2, B). La transcripción *in vitro* de la doble cadena de cDNA se llevó a cabo con una T7 RNA polimerasa de acuerdo al método Eberwine (Van Gelder et al., 1990) (Figura 2, C). Se purificó el cRNA obtenido utilizando perlas de afinidad magnéticas (Affymetrix, Inc.). El rendimiento de la transcripción *in vitro* se determinó por espectrofotometría utilizando un Nanodrop 2000 (Thermofisher Scientific, Inc.). Se utilizaron 15µg de cRNA como molde para llevar a cabo un segundo ciclo de síntesis de cDNA (Figura 2, D), posteriormente se eliminó el cRNA utilizando una RNasa H (Figura 2, E) y se purificó el cDNA con perlas magnéticas (Figura 2, F). El rendimiento de cDNA se cuantificó en un Nanodrop 2000 (Thermofisher Scientific, Inc.). Se fragmentaron 5.5µg de cDNA de cadena sencilla con uracil-DNA glicosilasa (UDG) y endonucleasa I apurínica/apurimidínica (APE I) (Figura 2, G), y posteriormente se marcaron los extremos 3'-OH con biotina, utilizando la deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) del kit (Figura 2, H). Se preparó un coctel de hibridación

conteniendo 3.5 μg de ss-cDNA fragmentado y marcado, se desnaturalizó a 99°C durante 5 minutos seguido de un ciclo de 45°C por 5 minutos y se inyectó en los microarreglos. Los microarreglos se hibridaron con las muestras marcadas a 45°C durante 16 horas (Figura 2, I) y posteriormente se lavaron y tiñeron utilizando el GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, Inc.) en la estación de lavado Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix, Inc.). Los chips se escanearon en el scanner 3000 7G (Affymetrix, Inc.). Todos los procedimientos de preparación de las muestras fueron realizados en la Unidad de Genética del Hospital General de México, y la hibridación, lavado/tinción y cuantificación de microarreglos se realizó en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Pediatría del Centro Médico Nacional "Siglo XXI".

10.8. ANALISIS ESTADÍSTICO

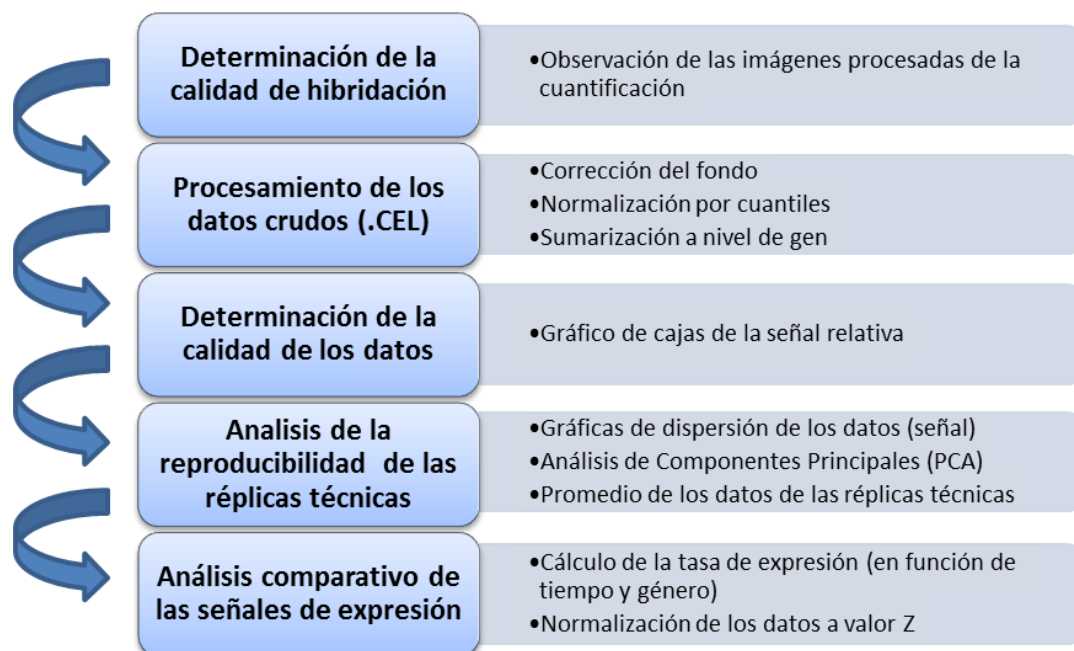


Figura 3. Estrategia general del análisis estadístico.

La estrategia general del análisis estadístico se muestra en la Figura 3. De manera general, se determinó la calidad de la hibridación mediante la observación de las imágenes procesadas de la cuantificación, obtenidas con el programa RMAExpress (Bolstad, B. M., 2014). Se procesaron los datos crudos (.CEL) con el programa Expression Console (Affymetrix, Inc.) incluyendo la corrección del fondo, la normalización por cuantiles y la sumarización a nivel de gen, esto es, la combinación de los valores de señal de todas las distintas sondas que interrogan el mismo gen. La calidad de los datos se determinó mediante el gráfico de cajas de la señal relativa.

Una vez determinada la calidad de los arreglos, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), como estrategia exploratoria de los datos, para identificar de manera general los arreglos más similares y más diferentes entre sí. Los datos de señal normalizada y sumarizada fueron utilizados para determinar las diferencias de expresión entre las condiciones biológicas en estudio. Se analizó la reproducibilidad de las réplicas técnicas mediante gráficas de dispersión de los datos (señal) y sus valores fueron promediados. A partir de los datos promediados de las réplicas técnicas, se realizó un análisis comparativo de las señales de expresión, mediante el cálculo de la tasa de expresión (i.e. ratio) tomando el tiempo E13 como referencia; de manera que se obtuvo el cociente de las señales del tiempo E15 sobre las del E13, para cada género. También se realizó la comparación del transcriptoma en función del género, para cada tiempo analizado. En este caso se utilizaron los datos de los machos como referencia, sobre la cual se obtuvo la tasa de expresión en hembras. Una vez calculada la tasa de

expresión para cada transcrito, se convirtió a escala logarítmica (base 2) y se establecieron las diferencias de expresión a nivel estadístico mediante la normalización de los datos a valor Z. El valor Z describe la posición de una observación x relativa a la media en unidades de desviación estándar. Un valor Z negativo indica que la observación está por debajo de la media, mientras que un valor Z positivo indica que la observación está por encima de la media. Para el presente trabajo los genes con un $Z > 1$ se consideraron como activados o sobreexpresados, los genes con un $Z < -1$ se consideraron reprimidos y los genes con un $-1 < Z < 1$ se consideraron sin cambio en su expresión.

10.9. ANALISIS BIOLÓGICO

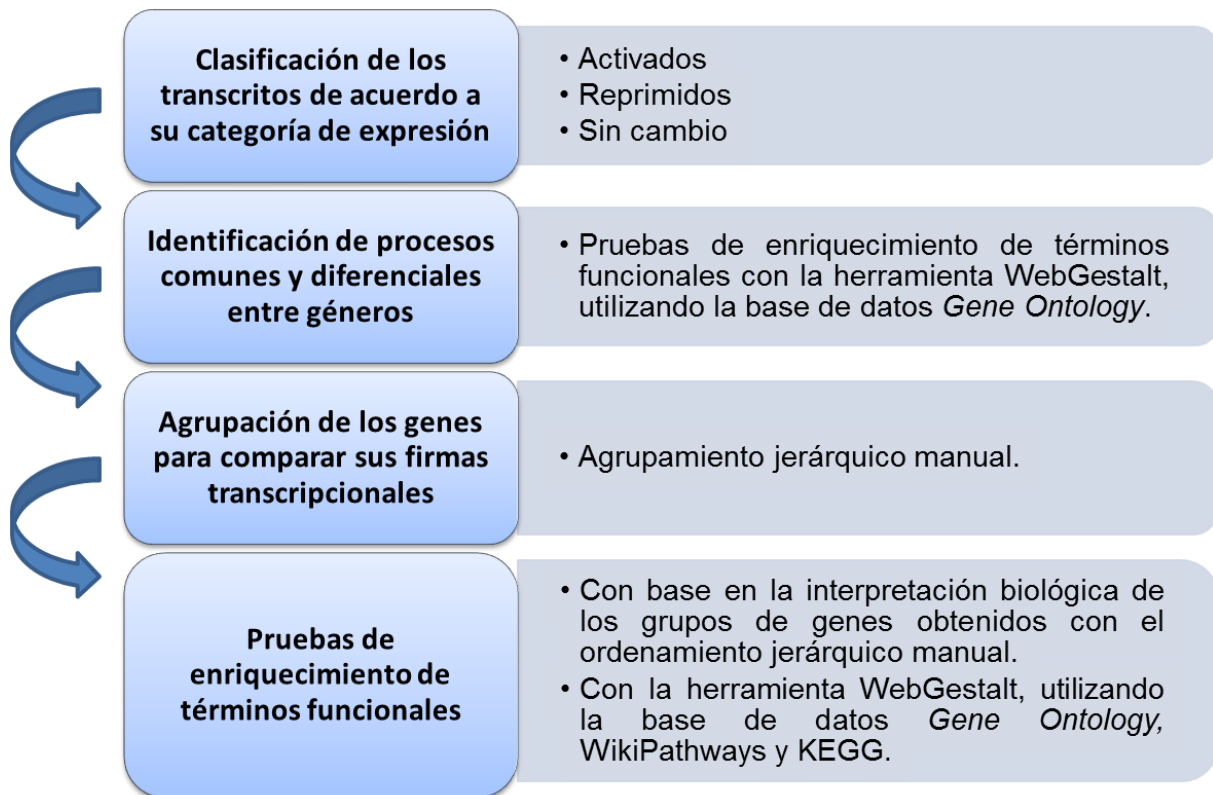


Figura 4. Estrategia general del análisis biológico.

La estrategia del análisis estadístico se muestra en la Figura 4. De acuerdo con la cinética temporal, se clasificaron los transcritos en 3 categorías de expresión: activados, reprimidos y sin cambio. Se calculó el porcentaje de coincidencia de los genes que se localizaron en la misma categoría tanto en machos como en hembras.

Para identificar los procesos comunes y diferenciales entre géneros, se realizaron pruebas de enriquecimiento de términos funcionales con la herramienta bioinformática WebGestalt en el sitio electrónico: <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/> (Wang, Duncan, Shi, y Zhang, 2013), utilizando la base de datos *Gene Ontology*. Para estas pruebas se usaron los símbolos de los genes como identificadores de los transcritos y el genoma de ratón como fondo para el análisis (total de genes). Para las categorías funcionales obtenidas se reportó el número de genes que permitió su recuperación y el valor $-p$, ajustado por el método BH (Benjamini-Hochberg).

Para analizar con más detalle los patrones de expresión encontrados, se agruparon los genes para realizar comparaciones entre las firmas transcripcionales previamente obtenidas. De manera inicial, se realizaron agrupamientos o *clusters* automatizados con la herramienta Cluster 3.0 <http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/index.html> (de Hoon, Imoto, Nolan, y Miyano, 2004), utilizando algoritmos de agrupamiento jerárquico por distancia (correlación no-centrada y *city-block*) así como pre-estableciendo el número de categorías a obtener (*k-means*). Debido a que no fue posible establecer una

interpretación biológica a partir de estos agrupamientos, se realizó un ordenamiento manual cuyo gráfico *heat map* se generó en el programa Cluster 1.0.

Con base en la interpretación biológica de los grupos de genes obtenidos con el ordenamiento jerárquico manual se realizaron pruebas de enriquecimiento funcional con la herramienta bioinformática WebGestalt. En esta ocasión además del uso de la base de datos Gene Ontology, se incluyeron WikiPathways y KEGG. Se reportó el número de genes que permitió la recuperación de distintas categorías funcionales y el valor $-p$ ajustado.

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1.1. VENTANA DE DIFERENCIACIÓN DEL TRACTO REPRODUCTOR, SEXADO DE EMBRIONES Y PURIFICACIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDO MESONÉFRICO

En el presente trabajo, se utilizó la cepa CD-1 de ratón, que es derivada de la cepa Swiss Webster, la cual ha sido empleada como fondo genético en los estudios de inactivación de *Lhx1*. Los ratones CD-1 se produjeron por primera vez en los laboratorios Charles River en 1956, a partir de una cepa que puede ser rastreada directamente hasta los ratones Swiss Webster del Instituto Rockefeller (Chia, Achilli, Festing, y Fisher, 2005). En 1926 Clara J. Lynch importó 2 ratones macho y 7 ratones hembra desde Lausana, Suiza. Todos los ratones derivados de estos son conocidos como “Swiss”. Lynch envió sus ratones “Swiss” a otros investigadores dentro y fuera del Instituto Rockefeller. En 1932, uno de estos investigadores, Leslie Webster, los pasó a criadores académicos y comerciales, incluyendo a Carworth Farms, UK, que produjo la cepa “Swiss Webster”.

Se realizó una comparación anatómica del proceso de diferenciación del TFR entre los ratones Swiss Webster (Kobayashi et al., 2004) y los ratones CD-1. Como se puede observar en la Figura 5, las etapas de desarrollo entre las dos cepas son muy similares en cuanto al desarrollo de las estructuras Mullerianas y Wolffianas. Estos resultados indican que en los ratones CD-1, el proceso de diferenciación

sexual es consistente con lo reportado previamente (Kobayashi et al., 2004), y de acuerdo con esto, se analizaron los tejidos mesonéfricos correspondientes a los tiempos E13 y E15. Debido a que en el día E13 la gónada ya está diferenciada, pero la diferenciación sexual del tracto reproductor no ha comenzado, se tomó este tiempo como punto de referencia inicial del proceso y se seleccionó el tiempo medio de la ventana (E15) asumiendo que en este punto se encontrarían plenamente activos los procesos moleculares (i.e. transcripcionales) involucrados en la diferenciación del TRF.

Se realizó el aislamiento de tejido mesonéfrico de embriones murinos machos y hembras, durante la etapa de morfogénesis del tracto reproductor femenino (E13 – E17). Estos tejidos incluyeron tanto los conductos Mullerianos como los Wolffianos (excepto del día E13, punto de referencia inicial en el que aún no termina su desarrollo), así como el mínimo indispensable de tejido mesonéfrico de soporte, necesario para la manipulación del material biológico. Se colectaron tejidos de al menos 17 embriones por cada tiempo y género estudiados, ya que durante la estandarización del proceso de extracción de RNA se observó que la cantidad de tejido sólido obtenida a partir de 15 embriones es suficiente para obtener un rendimiento adecuado de RNA total para microarreglo.

La discriminación de género de los embriones se realizó mediante observación de la gónada y en términos generales se determinó que mientras la gónada masculina es estriada (cordones testiculares), la gónada femenina se observa con pequeños cúmulos celulares en su interior (Figura 6, A y B). A medida que el

proceso de diferenciación sexual avanza, ambas gónadas adquieren una estructura redondeada, sin embargo, la gónada masculina aumenta de tamaño mientras que la femenina se hace más pequeña (Figura 5).

Este método resultó ser efectivo para el sexado de embriones por lo que no fue necesario utilizar la técnica de sexado mediante PCR. Sin embargo, esta técnica se estandarizó utilizando primers para Sry y Jarid y resultó ser adecuada para sexar ratones adultos. En la Figura 7 se muestra un ejemplo del bandeo que se obtiene para muestras femeninas y masculinas de DNA murino.

Una vez sexados los embriones, se separó la gónada del mesonefros y se colectó este último para la posterior extracción de RNA. En la Figura 6, C y D se observa un ejemplo del tejido mesonéfrico antes y después de aislarse la gónada.

La extracción de RNA total de mesonefros murino se realizó con Trizol, y se probaron las técnicas de purificación por precipitación y mediante columna de afinidad. Aunque se obtuvieron mayores concentraciones de RNA por el método de precipitación, el método de columnas permitió obtener RNA de mejor calidad para su utilización en microarreglos, es decir, con mayor integridad y pureza. También se probaron diferentes cantidades de muestra de tejido sólido, y se determinó que si se utiliza una cantidad menor a 15 tejidos mesonéfricos, la eficiencia de recuperación con respecto al lisado disminuye. De esta manera, se utilizó un mínimo de 32 tejidos mesonéfricos por muestra para favorecer la recuperación por medio de las columnas (Tabla 3).

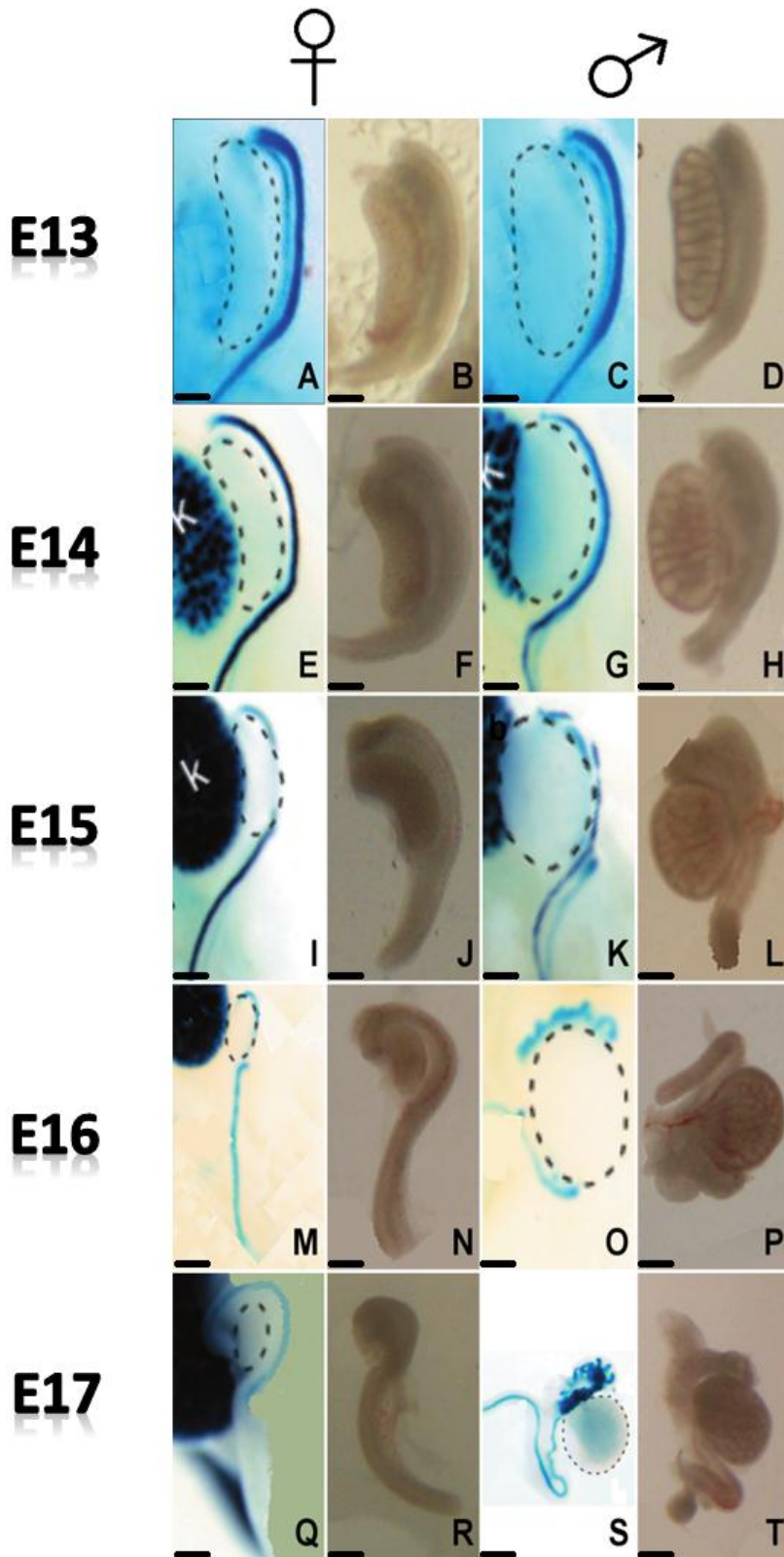


Figura 5. Mesonefros murino durante la diferenciación sexual (E13-E17).

En la imagen se comparan los con tejidos mesonéfricos reportados en la literatura (Kobayashi et al., 2004) con los tejidos aislados en el presente estudio, de hembras (♀) y machos (♂) para los días E13 a E17. En cada viñeta, el panel izquierdo muestra tejidos en los que el reportero *knock-in LacZ* permitió la visualización de la expresión específica de *Lhx1* (azul), lo que facilita la discriminación de los conductos embrionarios. El panel derecho muestra los tejidos aislados en presente estudio. En el tiempo E13 se observan los conductos de Müller y Wolff totalmente formados tanto en hembras como en machos. Durante los días E14, E15 y E16 se observa en los machos la degradación del conducto de Müller y la diferenciación del conducto de Wolff. En las hembras se observa la degradación del conducto de Wolff y la diferenciación del conducto de Müller. En el día E17, se observan el útero y los conductos deferentes ya formados. Barra de escala= 250µM.

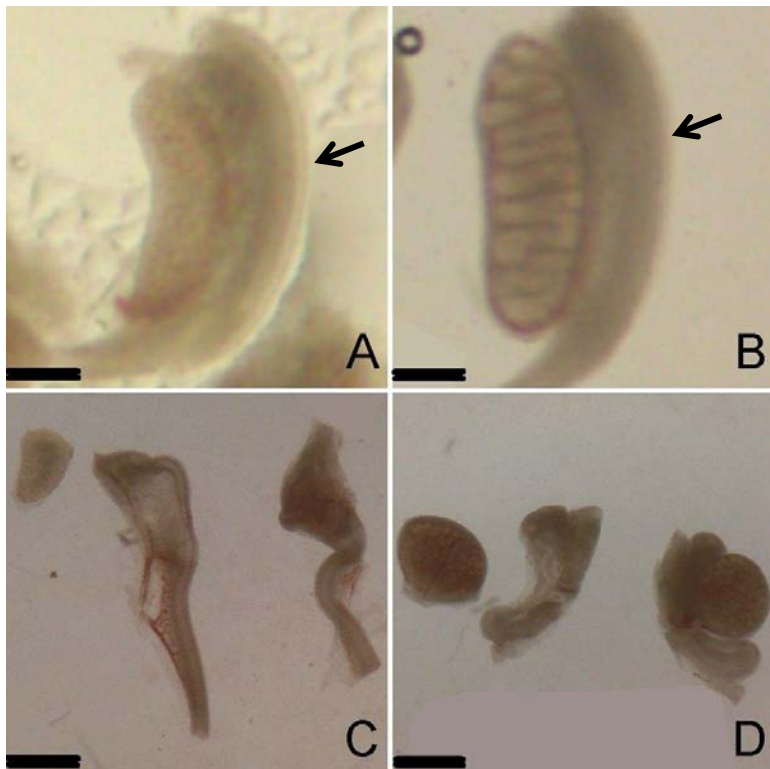


Figura 6. Comparación entre la gónada femenina y masculina de ratón. Aislamiento del mesonefros murino.

En la imagen se observan muestras de tejido mesonefrico femenino (A) y masculino (B) de embriones de ratón de 13 días de edad. En los tejidos de las imágenes A y B se muestra la gónada femenina y masculina respectivamente. Mientras la gónada masculina (B) se observa estriada, la gónada femenina (A) se muestra sin estrías y con algunos gránulos en su interior. Las imágenes C y D muestran el aislamiento de la gónada del tejido mesonefrico de ratones de 16 dpc. A la izquierda de cada imagen se observan la gónada y el mesonefros separados, mientras que a la derecha se observan los tejidos unidos. Mientras los tejidos de la imagen C provienen de embriones femeninos, los tejidos de la imagen D provienen de embriones masculinos. Las flechas indican la localización de los conductos de Müller y Wolff en el tejido mesonefrico. Barras de escala: 250µM en A y B; 500µM en C y D.

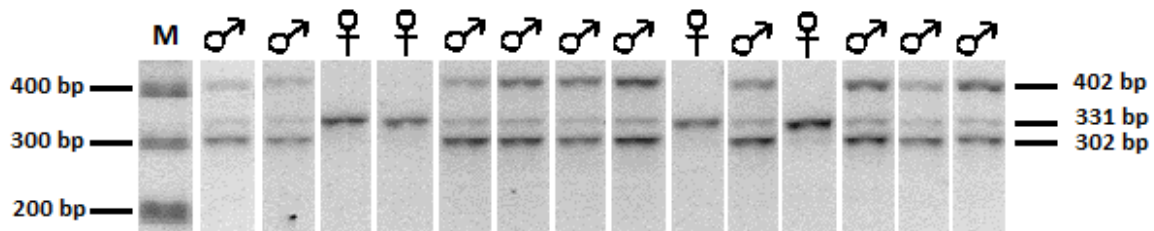


Figura 7. Patrón de productos de PCR para el sexado molecular murino.

En la imagen se observan los amplicones resultantes de la reacción de PCR con primers para *Sry* y *Jarid*. Para las muestras de DNA masculino, se obtuvieron 3 amplicones: 402 bp, 331 bp y 302 bp, correspondientes a los genes *Sry*, *Jarid1c* y *Jarid1d* respectivamente. Para las muestras de DNA femenino, se obtuvo un amplicón de 331 bp correspondiente al gen *Jarid1c*. El sexo de cada muestra, determinado por el método de PCR, se indica en la parte superior de la figura. Las muestras se corrieron electroforéticamente junto con un marcador de peso molecular (M) 100 bp DNA Ladder Marker (100 – 2000bp) (Axygen Biosciences).

Los tejidos se homogeneizaron con perlas de vidrio y vortex durante 2 minutos. Se observó que un mayor o menor tiempo de homogenización disminuye la concentración del RNA extraído. Aunque se probó la ruptura del tejido mediante su paso por la punta de una pipeta, se observó que la eficiencia de recuperación de RNA disminuye aproximadamente 50% respecto a la homogenización con perlas y vortex durante 2 minutos. En la Figura 8 se observa la imagen del gel de las muestras de RNA obtenidas mediante los métodos de precipitación y extracción por columna. Idealmente en las muestras RNA íntegras se espera una relación 2:1 entre las especies de RNA ribosomal (rRNA) 28S y 18S, además se espera que las bandas se muestren definidas y sin barridos por encima o por debajo de las mismas. En ambos métodos se observaron bandas definidas y proporciones adecuadas entre los rRNA, por lo que se concluye que la integridad del RNA extraído por ambos métodos es adecuada.

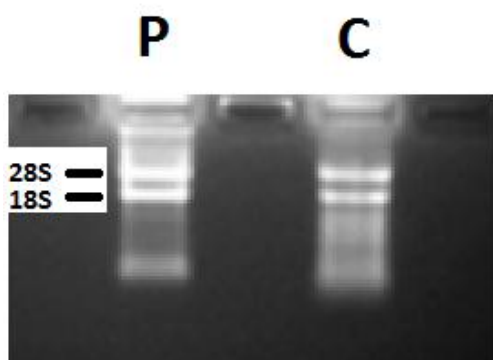


Figura 8. Integridad del RNA extraído mediante los métodos de precipitación y extracción por columna.

En la imagen se observan las subunidades de rRNA 28S y 18S. La letra P indica el carril de la muestra de RNA obtenida mediante el método de precipitación. La letra C indica el carril de la muestra de RNA obtenida mediante el método de extracción por columna.

Como resultado de la estandarización del método de extracción de RNA, se concluyó que la homogenización con perlas y vortex durante 2 minutos y la extracción por columna permite obtener las concentraciones necesarias de RNA

con calidad e integridad adecuadas para su utilización en microarreglos. Adicionalmente, la integridad del RNA se evaluó en un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.) y los resultados de la calidad y cantidad de las muestras se resumen en la Tabla 7. La concentración y calidad del RNA extraído fue adecuada para su aplicación en microarreglos. En cuanto a su integridad, en la

Figura 9 se muestra el corrimiento electroforético de un par de muestras extraídas durante la estandarización. Las bandas se observan sin barrido y la intensidad de la banda de 28S se observa del doble de la banda de 18S. Además, el valor de integridad de RNA (RIN) de las muestras fue no menor a 7.10.

Tabla 7. **Calidad y cantidad del RNA extraído para el ensayo**

Muestra	RIN	[RNA] (ng/μL)	260/280	260/230
Hembras E13	NA	164.62	2.12	2.11
Machos E13	NA	179.82	2.11	2.11
Hembras E15	7.10	184.02	2.12	2.08
Machos E15	7.10	279.22	2.11	2.14

RIN: RNA INTEGRITY NUMBER

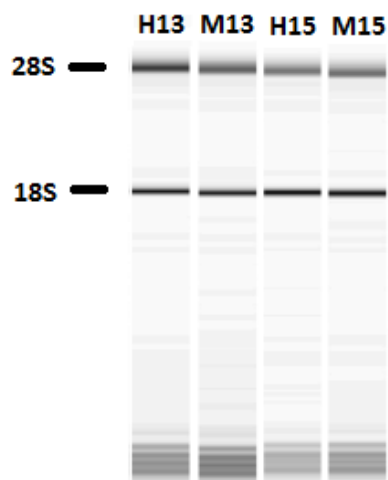


Figura 9. Integridad de las muestras de RNA utilizadas en el estudio.

En la imagen se observan el corrimiento en Bioanalyzer de las muestras de RNA total; se indican las subunidades de rRNA 28S y 18S. Los carriles corresponden a las muestras de RNA como sigue: H13, hembras del tiempo E13; M13, machos del tiempo E13; H15, hembras del tiempo E15; M15, machos del tiempo E15.

11.1.2. HIBRIDACIÓN DE MICROARREGLOS Y EVALUACIÓN DE SU CALIDAD

Las muestras de RNA se procesaron para su análisis subsecuente en microarreglos de expresión GeneChip Mouse Gene 2.0 ST (Affymetrix, Inc.). Una vez cuantificada la hibridación, se determinó su calidad mediante la observación de las imágenes procesadas de la cuantificación (Figura 10), obtenidas con el programa RMAExpress (Bolstad, B. M., 2014). En esta representación, los datos con baja calidad normalmente presentan parches de color uniforme en distintas regiones (Bolstad, 2014), y en el caso de nuestros experimentos, las imágenes no presentaron ningún artefacto de hibridación (Figura 10), lo que resultó consistente con lo observado en las imágenes originales obtenidas directamente del escáner. Se analizaron los controles de hibridación en las orillas de los *chips* y se observó que la hibridación se realizó correctamente. Se buscaron partículas contaminantes que pudieran afectar la hibridación y no se encontraron en ninguna de las imágenes.

El procesamiento de los datos crudos (archivos con extensión .CEL) se realizó con el programa Expression Console (Affymetrix, Inc.) e incluyó la corrección del fondo, la normalización por cuantiles y la sumarización a nivel de gen, esto es, la combinación de los valores de señal de todas las distintas sondas que interrogan el mismo gen. La calidad de los datos se determinó mediante el gráfico de cajas de la señal relativa (Figura 11). Este gráfico compara la distribución de los valores

de señal (intensidad normalizada y sumariada) de cada arreglo con la mediana de los arreglos en el grupo. Esta comparación es una forma útil de identificar arreglos que muestren diferencias dramáticas respecto al grupo y respecto a sus réplicas, lo que indica que no es adecuada una comparación inter-arreglo en estos casos. Los arreglos de baja calidad normalmente tendrán datos con gran dispersión y no se encontrarán centrados con la mediana del grupo (Bolstad, 2014). En la Figura 11 se observa que los arreglos son parecidos entre sí. La dispersión de los datos es pequeña y similar entre los arreglos y las réplicas. Además todos los arreglos se encuentran centrados sobre la mediana del grupo. Como conclusión se determinó que ningún arreglo presenta diferencias significativas respecto al grupo y que por lo tanto todas las muestras pueden ser incluidas en el estudio y comparadas entre sí.

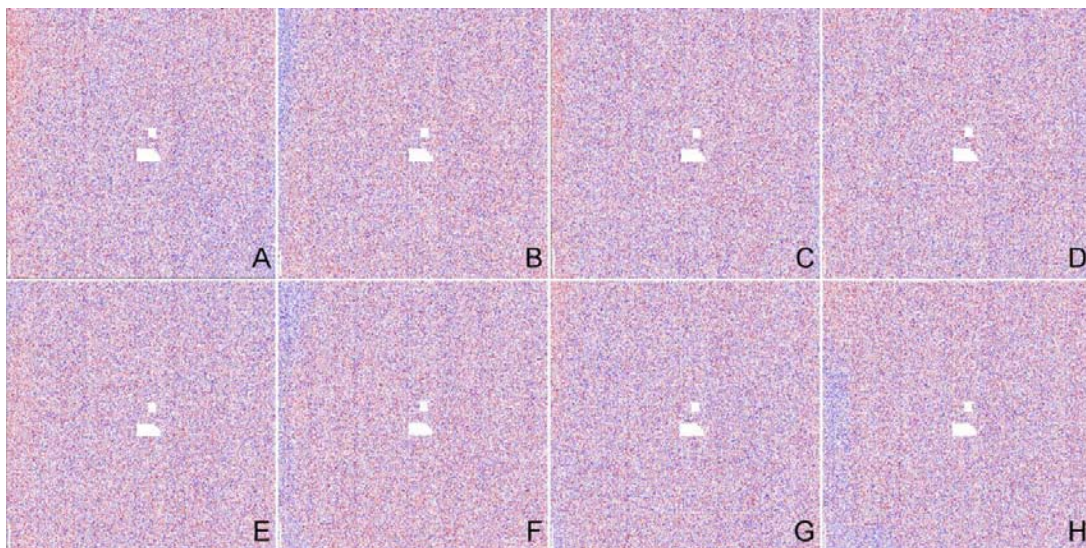


Figura 10. Imágenes residuales de los *Chips* escaneados.

En la figura se observan las imágenes de los *chips* escaneados. A= muestra H13A (Hembras del tiempo E13, réplica A), B= H13B, C= M13A, D=M13B, E=H15A, F= H15B, G= M15A y H= M15B. Los datos con baja calidad normalmente presentan parches de color en distintas regiones (Bolstad, 2014). Las imágenes observadas en esta figura no muestran artefactos.

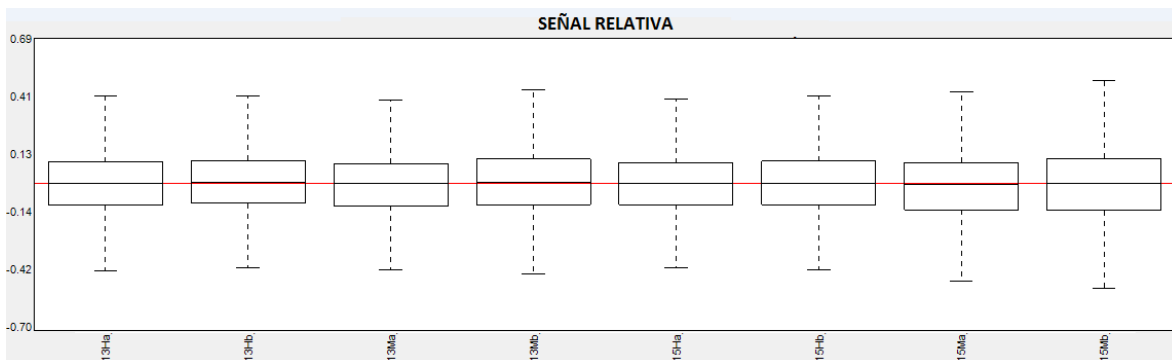


Figura 11. Gráfico de cajas de la señal relativa

En el gráfico se compara la distribución de los valores de señal (intensidad normalizada y sumariada) de cada arreglo con la mediana de los arreglos en el grupo.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), como una estrategia exploratoria de los datos, para identificar de manera general los arreglos más similares y más diferentes entre sí. El método se basa en la reducción del grupo original de variables, que pueden estar relacionadas entre sí, a un nuevo grupo de variables, más pequeño y no-correlacionado. De esta forma se retienen las características del conjunto de datos que contribuyen más a su varianza, los componentes principales, que permiten recoger la información más relevante. En la Figura 12 se observa la segregación de las muestras de acuerdo a sus componentes principales. Las réplicas segregaron como se esperaba, formándose 4 grupos de muestras en el gráfico. En el tiempo E13 las muestras de machos y hembras se aparearon en planos distintos, lo que significa que desde el tiempo inicial existían diferencias debidas al género y que estas diferencias se acentuaron para el tiempo E15, pues la distancia entre machos y hembras aumentó con respecto al tiempo de referencia E13.

La segregación observada en las muestras respecto al sexo y tiempo en el gráfico de PCA resultó alentadora para continuar con el estudio, debido a que de acuerdo con este análisis la información transcripcional *per se* (es decir, la abundancia global de transcritos) resulta suficiente para discriminar las diferentes muestras biológicas, y a la vez agrupar las similares (réplicas técnicas). Se sugiere que estas diferencias se deben a los procesos de diferenciación sexual masculina y femenina.

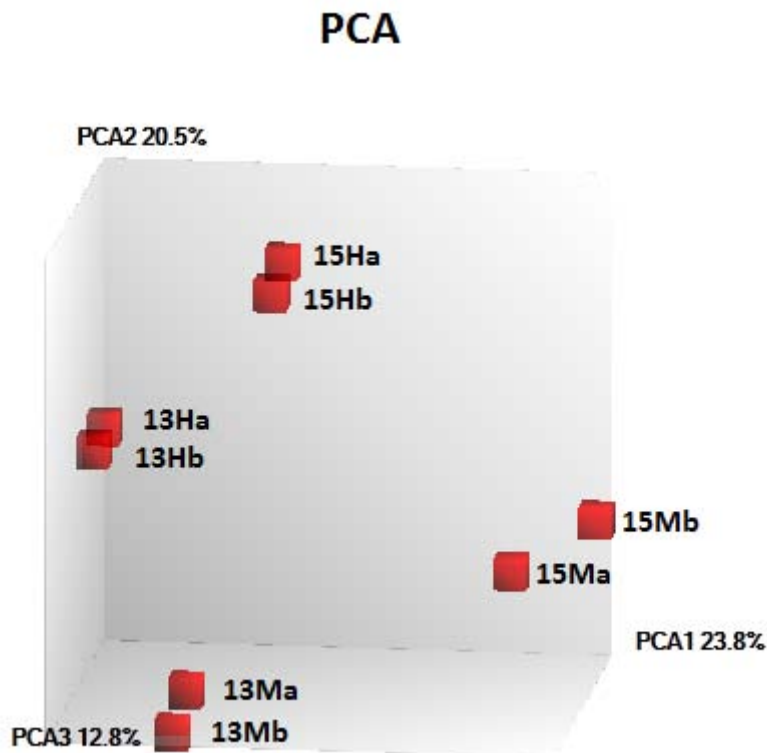


Figura 12. Análisis de Componentes Principales (PCA)

En la imagen se observa la segregación de las muestras de acuerdo a sus componentes principales. H13a: Hembras del tiempo E13, réplica A; H13b: Hembras del tiempo E13; réplica B, H15a: Hembras del tiempo E15, réplica A; H15b: Hembras del tiempo E15, réplica B; M13a: Machos del tiempo E13, réplica A; M13b: Machos del tiempo E13; réplica B, M15a: Machos del tiempo E15, réplica A; M15b: Machos del tiempo E15, réplica B.

Una vez determinada la calidad de los arreglos, los datos de señal normalizada y sumariada obtenidos con el software Expression Console (Affymetrix, Inc.), fueron utilizados para determinar las diferencias de expresión entre las condiciones biológicas en estudio. Tanto en la gráfica de cajas de la señal relativa (Figura 11) como en el gráfico de PCA (Figura 12) se observó que las réplicas técnicas resultaron similares entre sí; de manera adicional, se analizó su reproducibilidad mediante gráficas de dispersión de los datos (señal normalizada) de cada una de las dos réplicas realizadas para cada punto de muestreo (Figura 13). Los valores del coeficiente de determinación (R^2) son mayores de 0.9700, por lo que las réplicas técnicas se consideran estadísticamente reproducibles. Debido a esto, todas las réplicas se mantuvieron en el estudio y sus valores de señal fueron promediados.

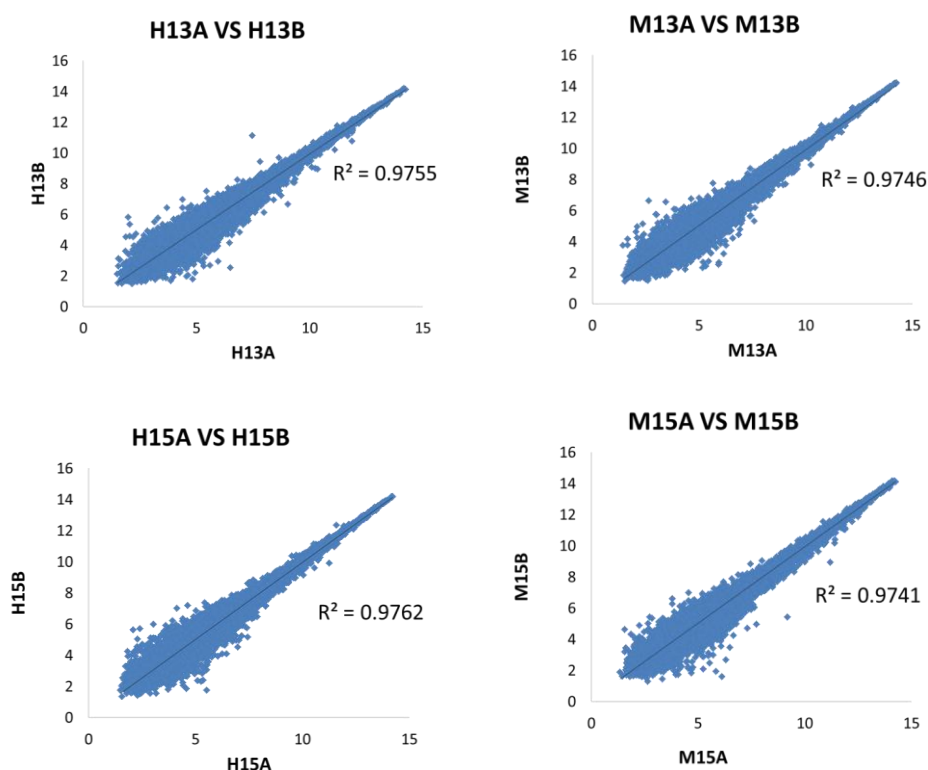


Figura 13.
Comparación de las réplicas técnicas.

En la imagen se observan gráficas de dispersión de los arreglos hibridados para cada muestra. Para cada dispersión se muestra además la línea de tendencia y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

A partir de los datos promediados de las réplicas técnicas, se realizó un análisis comparativo de las señales de expresión, mediante el cálculo de la tasa de expresión (i.e. ratio) tomando el tiempo E13 como referencia. De manera que se obtuvo el cociente de las señales del tiempo E15 sobre las del E13, para cada género. Una vez calculada la tasa de expresión para cada transcrito, se establecieron las diferencias de expresión a nivel estadístico mediante la normalización de los datos a valor Z, obteniendo 3 categorías de expresión para los genes: sobreexpresados, reprimidos y sin cambio. En la Figura 14 se representa el porcentaje de transcritos en cada categoría, utilizando un umbral de $Z > 1$ y $Z < -1$. Posteriormente, se compararon los transcritos de cada categoría entre machos y hembras, y se determinó el número de genes coincidentes en ambos grupos (Figura 15).

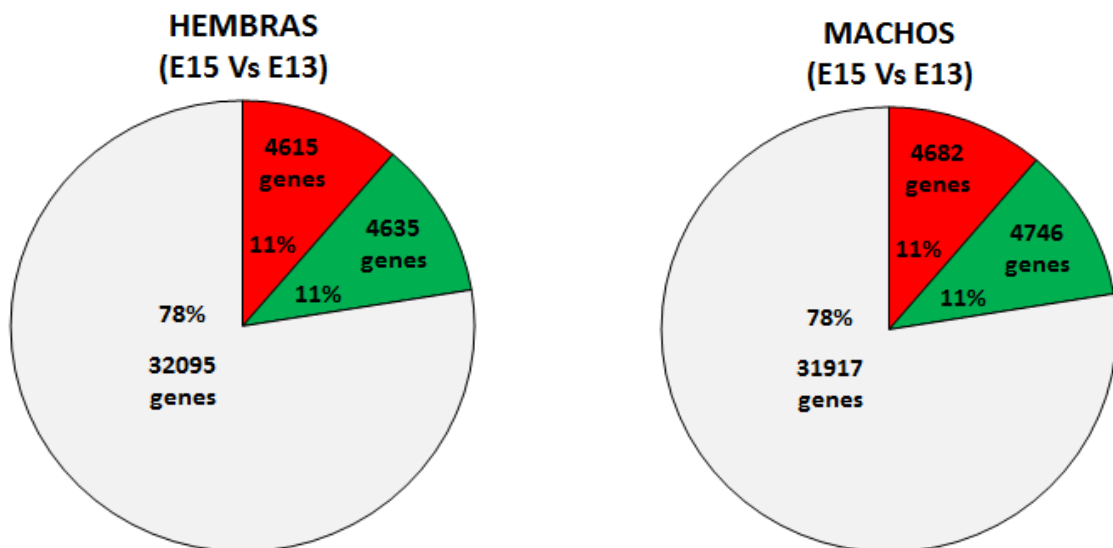
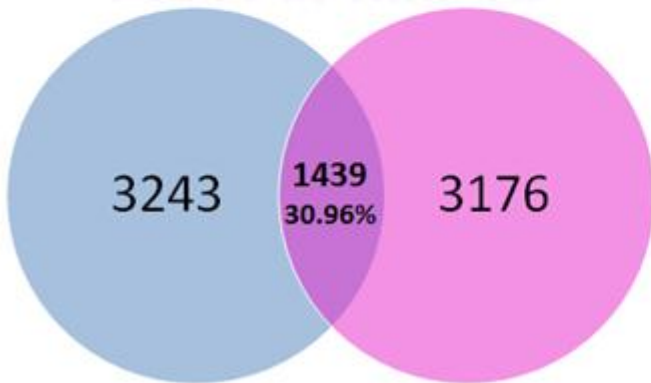


Figura 14. Porcentaje de genes activados, reprimidos y sin cambio para machos y hembras (E15 Vs E13). En las gráficas se muestra la cantidad de genes

activados (rojo), reprimidos (verde) y sin cambio (blanco) cortando en $Z > 1$ y $Z < -1$. El valor Z fue calculado tomando el tiempo E13 como control para machos y hembras.

E15 VS E13

GENES ACTIVADOS



GENES REPRIMIDOS



GENES SIN CAMBIO

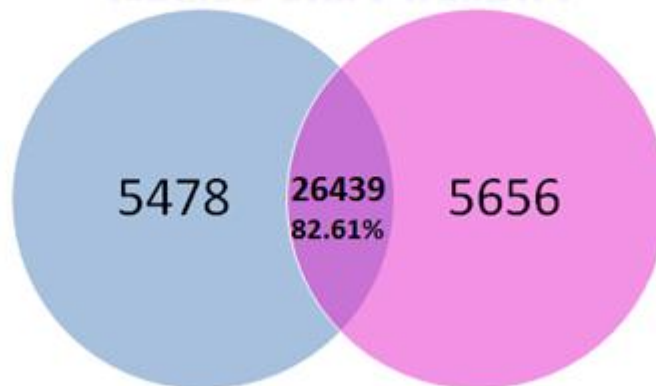


Figura 15. Comparación del número de genes activados, reprimidos y sin cambio entre machos y hembras (E15 Vs E13). En la figura se muestra la cantidad de genes activados, reprimidos y sin cambio en machos (azul) y hembras (rojo), así como el número de genes coincidentes entre los géneros para cada grupo de genes.

También se realizó la comparación del transcriptoma en función del género, para cada tiempo analizado. En este caso se utilizaron los datos de los machos como referencia, sobre la cual se obtuvo la tasa de expresión en hembras. En la Figura 16 se representa el porcentaje de genes sobreexpresados, reprimidos y sin cambio en hembras respecto a machos, utilizando un criterio de corte para las categorías de $Z > 1$ y $Z < -1$. Del mismo modo, se comparó el número de genes en cada categoría de expresión, así el número de genes coincidentes en ambos grupos (Figura 17).

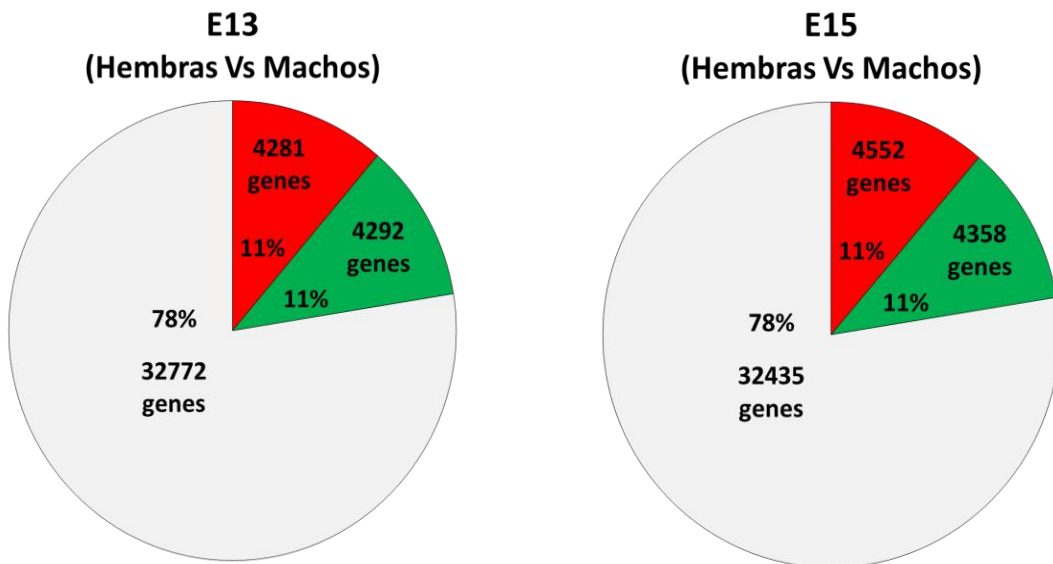


Figura 16. Porcentaje de genes sobreexpresados, reprimidos y sin cambio para los tiempos E13 y E15 (hembras Vs machos). En las gráficas se muestra la cantidad de genes sobreexpresados (rojo), reprimidos (verde) y sin cambio (blanco) cortando en $Z > 1$ y $Z < -1$. El valor Z fue calculado tomando como control los valores de intensidad de los machos para los tiempos E13 y E15.

HEMBRAS VS MACHOS

GENES SOBREENEXPRESADOS



GENES REPRIMIDOS



GENES SIN CAMBIO



Figura 17. Comparación del número de genes activados, reprimidos y sin cambio entre los tiempos E15 y E13 (machos Vs hembras). En la figura se muestra la cantidad de genes activados, reprimidos y sin cambio en el tiempo E15 (amarillo) y el tiempo E13 (azul), así como el número de genes coincidentes entre los tiempos para cada grupo de genes.

Se compararon los transcritos activados, reprimidos y sin cambio en el tiempo E15 tomando como referencia al tiempo E13 (es decir, el cociente E15/E13), tanto para hembras como para machos. Adicionalmente se realizaron comparaciones de género (hembra/macho) dentro de cada tiempo, tomando los machos como referencia, y se clasificaron los transcritos de acuerdo con 3 categorías de expresión: activados, reprimidos y sin cambio.

De acuerdo con la cinética temporal, 30.6% de los genes que se activaron tanto en machos como en hembras (al tiempo E15), coinciden; de la misma manera, coinciden 26.97% de los genes reprimidos y 82.61% de los genes sin cambio (Figura 15). Estas coincidencias sugieren la presencia de procesos comunes entre machos y hembras, los cuales comparten la misma respuesta transcripcional durante la ventana de tiempo analizada. De manera interesante, el porcentaje de genes que no coinciden fue mayor, y es indicativo de procesos diferenciales entre los géneros.

Para identificar estos procesos, se realizaron pruebas de enriquecimiento de términos funcionales, utilizando la herramienta bioinformática WebGestalt. Ésta permite identificar, a partir de una lista de genes, aquellos procesos biológicos que están estadísticamente sobrerrepresentados en dicha lista con respecto al genoma. Se realizaron pruebas de estandarización utilizando el *Probeset-ID* (Affymetrix) como identificador de los transcritos, y se observó que se obtiene una mejor cobertura (número de genes identificados en la base de datos) utilizando los símbolos de los genes (Tabla 8). De modo que se utilizaron los símbolos de los

genes como identificadores y el genoma de ratón como fondo para el análisis (total de genes).

Tabla 8. **Porcentaje de cobertura de las pruebas de enriquecimiento funcional utilizando símbolos de los genes como identificadores**

		Número de identificadores ingresados	Número de identificadores mapeados	Número de identificadores no mapeados	Porcentaje de cobertura
HEMBRAS	Genes activados	2046	1870	176	91.40
	Genes reprimidos	1674	1480	194	88.41
MACHOS	Genes activados	2290	2112	178	92.23
	Genes reprimidos	1609	1439	170	89.43

Para las hembras se recuperaron un total de 52 procesos con significancia estadística. Mediante inspección del gráfico acíclico dirigido (DAG), el cual es una representación gráfica de la ontología genética (GO), se realizó un análisis de redundancia y especificidad de los procesos identificados, conservando solo aquellos más representativos. El número de genes que permitió la recuperación de las categorías funcionales y su significancia (valor p ajustado) se reportan en la Tabla 9. De este modo, para los genes activados en hembras al tiempo E15 se recuperaron las categorías funcionales denominadas *regulación de procesos del desarrollo* y *desarrollo de tejidos*. En concordancia con estos procesos, se encontró sobreexpresión de genes relacionados con la *regulación de la proliferación celular* y la *regulación positiva de procesos celulares*. También se observaron activas la *regulación de la localización*, la *regulación de la adhesión*

celular y la *regulación de la comunicación celular*. En esta categoría, se incluyen genes relacionados con estructuras específicas como la matriz extracelular, la membrana basal y diversas proteínas integrales de membrana.

Los datos muestran una coherencia biológica entre los procesos activados. Por ejemplo, la *comunicación celular* está ligada a la *activación de respuesta a estímulos*, la cual puede estar mediada por *receptores de superficie celular*, entre los cuales se encuentran genes de *percepción de estímulos químicos acoplados a proteínas G*. Al desglosar el contenido de estas categorías, se identificaron específicamente receptores olfatorios, y otros genes como *Wnt9a* y *Epha6* que se encuentra directamente regulado por *Hoxa13* durante el desarrollo del tubérculo genital (Gene, NCBI). Entre los genes de *respuesta a sustancias orgánicas*, se encontró el receptor de estrógenos *Esr1*, receptores de hormonas, quimiocinas, componentes de cascadas de señalización, feromonas, entre otros.

En el espacio extracelular se encontraron genes sobreexpresados como *Ptgds*, una sintasa de la prostaglandina D2 (GeneCards), cuya deficiencia se encuentra asociada a alteraciones de la migración testicular en ratones (Gene, NCBI) y *Twsg1* cuya regulación de la señalización de proteínas morfogenéticas oseas (BMP) es necesaria para la elongación y derivación ductal, formación del lumen y compartimentación mioepitelial en la glándula mamaria post-natal (Forsman et al., 2014). Las proteínas BMP participan en diversos eventos durante el desarrollo embrionario y la vida post-natal. Se han relacionado con la regulación procesos biológicos como la proliferación celular, migración, diferenciación y apoptosis

(Forsman et al., 2014). Dentro de los genes sobreexpresados en el espacio extracelular también se encontraron: *Bmp2*, *Bmp6*, *Bmp7*, *Bmp8b* y *Bmp10*. Entre éstos, *Bmp2* y *Bmp6* son efectores de la señalización por *Wnt1* y se relacionan con el desarrollo de condrocitos, hipertrofia de cardiomiocitos y la regulación de la vía canónica de Wnt/Beta-catenina. *Wisp1* y *Wnt5b*, otros efectores de *Wnt1* se encontraron sobreexpresados entre los genes de *unión al factor de crecimiento* y *localización* respectivamente.

Dentro de las categorías más específicas encontradas, se identificó la sobreexpresión de genes reguladores de actividades enzimáticas, específicamente aquellos que *regulan negativamente peptidasas*, entre los cuales hay *reguladores negativos de endopeptidasas de tipo serina*. A nivel de organelos, se encontró sobreexpresión de genes en el retículo endoplásmico lo que sugiere una elevada actividad en este organelo. También se identificó el desarrollo de fibras contráctiles, incluyendo miofibrillas. Específicamente se encontraron genes sobreexpresados en el disco Z de la banda I del sarcómero. Estos resultados se relacionan con lo conocido respecto al desarrollo de miofibrillas, el cual es requerido para la diferenciación de la pared mesenquimal uterina en células musculares lisas.

Tabla 9. Número de genes y significancia de las categorías funcionales encontradas en el grupo de genes activados en hembras

Categorías funcionales	Número de genes	p ajustada
<i>Regulación de procesos del desarrollo</i>	164	1.29e-07
<i>Desarrollo de tejidos</i>	143	7.71e-08
Regulación de la proliferación celular	131	5.8E-08
Regulación positiva de procesos celulares	294	2.62e-08
<i>Regulación de la localización</i>	168	4.23E-9
<i>Regulación de la adhesión celular</i>	121	5.9E-13
<i>Regulación de la comunicación celular</i>	568	2.1E-27
<i>Respuesta a estímulos</i>	574	2.2E-20
<i>Receptores de superficie celular</i>	384	2.7E-22
<i>Percepción de estímulos químicos</i>	233	7.3E-09
<i>Receptores acoplados a proteínas G</i>	228	1.1E-10
<i>Respuesta a sustancias orgánicas</i>	178	2.7E-09
Espacio extracelular	150	5.27E-27
<i>Unión al factor de crecimiento</i>	24	1.11E-5
<i>Regulación negativa de peptidasas</i>	43	4.3e-09
<i>Reguladores negativos de endopeptidasas de tipo serina</i>	21	4.2E-05
Retículo endoplásmico	123	8.50E-5

Nota: En negritas se presentan los procesos diferenciales para hembras.

Para los machos, se recuperaron un total de 60 procesos con significancia estadística. Mediante inspección del gráfico acíclico dirigido (DAG), se realizó un análisis de redundancia y especificidad de los procesos identificados, conservando solo aquellos más representativos. El número de genes que permitió la recuperación de las categorías funcionales y su significancia (valor p ajustado) se reportan en la Tabla 10. De este modo, para los genes activados en machos al tiempo E15 se recuperó una serie de procesos comunes con las hembras, como son la *regulación de procesos del desarrollo*, *desarrollo de tejidos*, *regulación de la proliferación celular*, *regulación positiva de procesos celulares*, *regulación de la localización* y de la *comunicación celular*, incluyendo la *regulación positiva de la*

respuesta a estímulos, mediada por *receptores acoplados a proteínas G* dentro de los que se incluyen los receptores olfatorios. También se encontró sobreexpresión de genes del espacio extracelular, incluyendo a *Twsg1*, *Bmp6* y *Bmp8b*. A nivel de organelos se encontró sobreexpresión de genes relacionados con en el *retículo endoplásmico* y se identificó el desarrollo de miofibrillas, aunque no se obtuvo mayor especificidad, a diferencia de lo observado en las hembras. En machos, el desarrollo de miofibrillas es necesario para la diferenciación de los vasos deferentes pues se requiere de la formación de una gruesa capa circular de células musculares lisas alrededor de la porción distal del conducto de Wolff (Jacob et al., 1985).

La sobreexpresión de genes involucrados en la proliferación celular y la regulación positiva de procesos celulares se identificaron tanto en machos como hembras, y estos se relacionan con el proceso de embriogénesis, e incluyen posiblemente eventos de diferenciación sexual. En las hembras los procesos de elongación de los conductos Müllerianos y diferenciación de la pared mesenquimal del útero en células musculares lisas requieren de la proliferación celular. En los machos la regulación positiva de procesos celulares se relacionaría con la diferenciación de los vasos deferentes y la transformación de los conductos de Wolff en epidídimos, proceso que requiere de su previa elongación y enrollamiento (Jacob et al., 1985). Dentro de los procesos diferenciales en machos se identificó la *activación de metalopeptidasas*, entre las cuales se encontraron *Mmp14* y *Mmp19*, que participan en la descompostura de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales como el desarrollo embrionario, la reproducción y la remodelación de

tejido (GTR, NCBI). Aunque no se ha reportado la actividad de los genes *Mmp14* y *Mmp19* en el proceso de diferenciación sexual, se sabe que existen dos procesos de regresión durante la diferenciación sexual masculina. El primero es la regresión de los conductos de Müller que comienza en el día E13.5 y se completa el día E16.5. El segundo sucede durante la transformación del mesonefros en epidídimo, la cual requiere de dos olas de regresión (Jacob et al., 1985). La primera regresión ocurre en el nefros craneal y comienza antes de que la porción caudal del mesonefros esté completamente desarrollada. La segunda regresión se lleva a cabo en la parte caudal del mesonefros que persiste como paradídimo rudimentario (Jacob et al., 1985). A pesar de que en las hembras también se espera una ola de regresión tisular, en este caso relacionada con los conductos de Wolff, los datos no mostraron una sobrerrepresentación de este proceso, al menos en este punto temporal del muestreo. Otras actividades específicas de *regulación enzimática* que se recuperaron diferencialmente para los machos son: *actividad de fosfolipasa D* y *actividad hidrolasa de éster sulfúrico*.

A nivel de organelos se observó el *desarrollo de vasculatura*, específicamente de *vasos sanguíneos*. En concordancia con estos procesos, se encontró sobreexpresión de genes relacionados con diferenciación celular, *unión celular* y *adhesión celular*.

Tabla 10. **Número de genes y significancia de las categorías funcionales encontradas en el grupo de genes activados en machos**

Categorías funcionales	Número de genes	p ajustada
<i>Regulación de procesos del desarrollo</i>	199	2.82e-12
<i>Desarrollo de tejidos</i>	175	8.65e-13
<i>Regulación de la proliferación celular</i>	164	5.62E-14
<i>Regulación positiva de procesos celulares</i>	345	3.80E-12
<i>Regulación de la localización</i>	203	3.46E-14
<i>Comunicación celular</i>	236	3.92E-12
Regulación positiva de la respuesta a estímulos	150	1.29E-12
<i>Receptores acoplados a proteínas G</i>	186	9.42E-6
<i>Espacio extracelular</i>	155	8.31E24
<i>Retículo endoplásmico</i>	142	4.64E-6
Activación de metalopeptidasas	31	0.0003
Regulación enzimática	103	0.0001
Actividad de fosfolipasa D	77	0.0004
Actividad hidrolasa de éster sulfúrico	8	5.36E-5
Desarrollo de vasculatura	94	8.72E-13
Desarrollo vasos sanguíneos	93	2.98E-13
Unión celular	99	4.64E-6
Adhesión celular	146	1.50E-18

Nota: Los procesos diferenciales para machos se presentan en negritas.

Se analizó también el conjunto de genes reprimidos en hembras al tiempo E15. El número de genes que permitió la recuperación de las categorías funcionales y la Pajustada obtenida para las mismas se reportan en la Tabla 11. Se identificó la represión de genes relacionados con el desarrollo del sistema urogenital, específicamente del *desarrollo renal*, del proceso de *ramificación del brote urético*, del *desarrollo de túbulos de la nefrona* y de los *túbulos mesonéricos*. En concordancia con la represión del desarrollo de estos procesos se observó la represión de genes de la *replicación de DNA* y la *fase M del ciclo celular*. A nivel de organelos se observó la represión de genes cromosomales, específicamente

relacionados con la *estructura centromérica*. Dentro de los genes reprimidos en el proceso de ramificación del brote urético se incluyen: *Wnt9b*, involucrado en la morfogénesis de los túbulos renales y la regulación de diversos componentes del sistema urogenital; *Pax2*, *Pax8* y *Lhx1*, reguladores transcripcionales involucrados en la activación de genes efectores responsables de la señalización celular y la organización tisular durante la morfogénesis del mesonefros y *Wnt4*, regulador del desarrollo folicular ovárico y del desarrollo postnatal uterino (Gene, NCBI).

Dentro de las categorías más específicas encontradas, se identificó la represión de genes reguladores de la morfogénesis de copa óptica involucrada en el *desarrollo del ojo de tipo cámara*, incluyendo a *Pax2*, responsable del destino celular en el desarrollo urogenital, de la morfogénesis renal y de la diferenciación del uréter; y *Aldh1a1*, un gen que se expresa fuertemente y de manera específica en las células somáticas de los testículos en desarrollo de ratones machos y que además participa en la regulación de 12 vías celulares en el tejido ovárico (Gene, NCBI). También se identificó la represión de la *actividad de receptor acoplado a proteínas G*, dentro de los que se incluyen *receptores olfatorios* que participan en la *percepción sensorial del aroma*.

Se identificaron los genes reprimidos en machos al tiempo E15. El número de genes que permitió la recuperación de las categorías funcionales y su significancia se reportan en la Tabla 12. Se identificaron genes que corresponden a procesos también observados en hembras, como la *morfogénesis del ojo de tipo cámara* y

de la *actividad de receptor acoplado a proteínas G*, incluyendo a los *receptores olfatorios* y la *percepción sensorial del aroma*.

Tabla 11. **Número de genes y significancia de las categorías funcionales encontradas en el grupo de genes reprimidos en hembras**

Categorías funcionales	Número de genes	p ajustada
<i>Desarrollo renal</i>	14	9.64E-6
<i>Ramificación del brote urético</i>	14	0.0001
<i>Desarrollo de túbulos de la nefrona</i>	10	4.54E-5
<i>Desarrollo de túbulos mesonéfricos</i>	6	5.87 E-5
<i>Replicación de DNA</i>	31	0.0001
<i>fase M del ciclo celular</i>	53	5.03E-6
<i>Estructura centromérica</i>	22	0.0002
<i>Desarrollo del ojo de tipo cámara</i>	5	0.0002
<i>Actividad de receptor acoplado a proteínas G</i>	178	1.17E-19
<i>Receptores olfatorios</i>	150	4.21E-24
<i>Percepción sensorial del aroma</i>	152	2E-24

Nota: En negritas se presentan los procesos diferenciales para hembras.

En cuanto a los procesos reprimidos diferencialmente respecto a la hembra, se encontraron procesos un tanto generales, como la represión de genes involucrados en el *desarrollo celular*, la regulación positiva de la *diferenciación celular*, y de la regulación de la expresión genética, específicamente la represión de la *formación de nucleosomas* y la *regulación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II*.

La actividad de receptor acoplado a proteínas G se encontró en los cuatro grupos de genes: activados en hembras, activados en machos, reprimidos en hembras y reprimidos en machos; por lo que se realizó una comparación de los genes incluidos en cada grupo para esta categoría funcional. Para los genes activados

en hembras y machos y se obtuvo una coincidencia del 7.0% y para los genes reprimidos en hembras y machos se obtuvo una coincidencia del 8.7%. De estas observaciones se puede determinar que aunque el mismo proceso está representado en los cuatro grupos, este se recuperó a partir de distintos genes (más de 90% en cada grupo); por lo tanto, esto indica que la señalización por receptores acoplados a proteínas G es muy activa durante esta etapa de la embriogénesis, y simultáneamente se activan y reprimen diferentes genes de estas vías, de un modo diferencial entre hembras y machos.

Tabla 12. **Número de genes y significancia de las categorías funcionales encontradas en el grupo de genes reprimidos en machos**

Categorías funcionales	Número de genes	p ajustada
<i>Morfogénesis del ojo de tipo cámara</i>	17	0.0003
<i>Actividad de receptor acoplado a proteínas G</i>	211	6.04E-34
<i>Receptores olfatorios</i>	161	1.89E-30
<i>Percepción sensorial del aroma</i>	152	4.47E-30
Desarrollo celular	111	3.00E-4
Diferenciación celular	54	8.13E-5
Formación de nucleosomas	13	0.0003
Regulación de la transcripción del promotor de la RNA polimerasa II	97	0.0005

Nota: Los procesos diferenciales para machos se presentan en negritas.

Para analizar con más detalle los patrones de expresión encontrados, se decidió agrupar los genes para realizar comparaciones entre las firmas transcripcionales previamente obtenidas. De manera inicial, se realizaron agrupamientos o *clusters* automatizados con la herramienta Cluster 3.0 y diferentes métodos de agrupamiento (Figura 18).

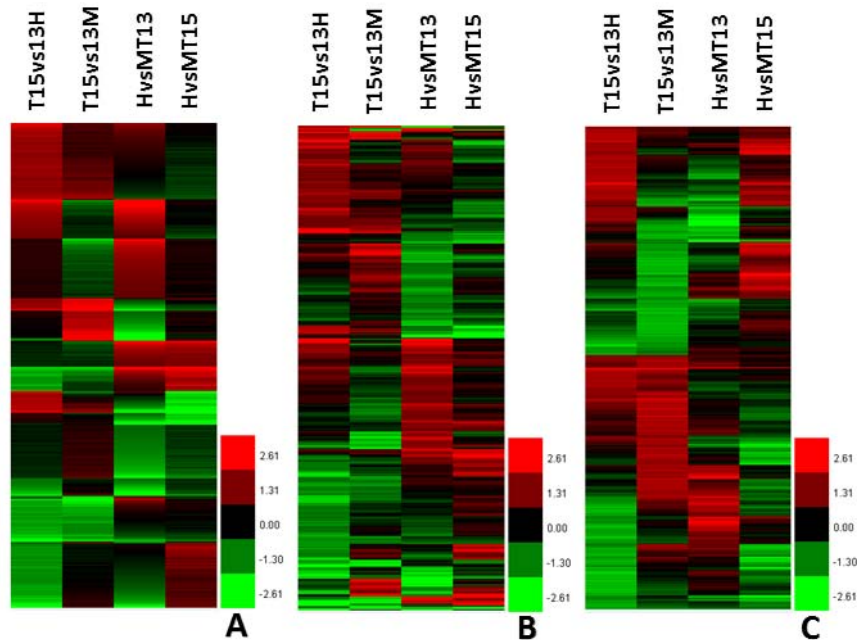


Figura 18. Agrupamiento automatizado con la herramienta Cluster 3.0.

En la imagen se observan los agrupamientos realizados para los genes de acuerdo a sus patrones de expresión. A= agrupamiento por *k-means*, B= agrupamiento por *city-block*, C= agrupamiento jerárquico (8 grupos).

En la representación gráfica de las firmas transcripcionales (*heat maps*), se observan los cambios de expresión obtenidos para cada gen en las cuatro comparaciones realizadas (respecto al tiempo y respecto al género, en machos y hembras). Los datos utilizados fueron el valor Z de cada gen, el cual se representa en un gradiente de color rojo-negro-verde, que corresponde a genes sobreexpresados-sin cambio-reprimidos, respectivamente. Los puntos estadísticos de cada una de estas categorías corresponden a los mismos del análisis ontológico ($Z > 1$ para genes sobreexpresados y $Z < -1$ para los reprimidos). Las líneas de color negro representan los genes sin cambio ($1 > Z > -1$). En el costado derecho del *heat map* se puede observar la barra de colores que indica de manera

más específica la relación de la intensidad de dichos colores con el valor Z de los datos.

El objetivo del agrupamiento es encontrar grupos de genes que, por su patrón de expresión, sean similares entre sí y diferentes de otros grupos. Al agrupar genes con base en las similitudes de sus perfiles de expresión, es posible encontrar genes relacionados funcionalmente (de Hoon et al., 2004). En general hay 2 métodos de agrupamiento comúnmente usados: agrupamientos jerárquicos y agrupamientos por particiones (no jerárquicos). La primera estrategia de agrupamiento que se utilizó fue el agrupamiento por *k-means* (Figura 18, A), que pertenece a los agrupamientos por particiones, produciendo grupos sin solapamiento. Este método requiere de la selección previa del número de grupos en los que se desea acomodar el total de genes (Milligan y Martha, 1987), y en este caso se consideró que son 8 las posibles combinaciones esperadas en cuanto al análisis de tiempos entre machos y hembras (habiendo eliminado el grupo de genes que no presentó cambios tanto en hembras como en machos, ya que este resulta irrelevante para el análisis funcional). Aunque el agrupamiento permitió identificar grupos de genes con patrones de expresión similares, dentro de cada grupo hay subgrupos de genes con patrones distintos, lo que complica la interpretación biológica de cada grupo y la identificación de grupos de genes relacionados funcionalmente. Como segunda estrategia se utilizó el agrupamiento por cálculo de distancias *city-blocks* (Figura 18, B). En este método de agrupamiento la distancia entre los genes se determina midiendo el camino más corto en un espacio vectorial (Milligan y Martha, 1987), y como se puede observar

en la imagen, el número de *clusters* obtenidos resultó mayor y con más heterogeneidad que en el agrupamiento por *k-means*, lo que complicó aún más su interpretación. Finalmente se realizó un ordenamiento jerárquico por cálculo de distancias mediante correlación no-centrada (Figura 18, C). Este método inicia considerando cada entidad como un *cluster* distinto y en cada nivel sucesivo de agrupamiento dos *clusters* se unen, y este proceso continúa hasta que se obtiene un solo *cluster* que contiene el total de los datos (Milligan y Martha, 1987). Con este agrupamiento se pueden identificar con mayor claridad sectores de grupos activados, reprimidos y sin cambio; especialmente para las primeras dos columnas del mapa (Figura 18, C), sin embargo, las dos últimas columnas (comparaciones de género a diferentes tiempos), mostraron cierta heterogeneidad. Aunque este agrupamiento no permitió realizar una interpretación completa de los patrones de expresión, sí aportó información relevante en cuanto a la interpretación biológica de las primeras dos columnas: en la segunda columna (T15vs13M) se observa que en general los genes se dividieron en genes activados y reprimidos en los machos al tiempo E15. Una vez establecida esta división, la primera columna (T15vs13H) subdivide estos dos grupos en subgrupos de genes que además de estar activados o reprimidos en machos también se activaron, reprimieron o no cambiaron su expresión en las hembras al tiempo E15. Debido a que las últimas dos columnas no aportan información adicional en este ordenamiento, se decidió realizar un ordenamiento de forma manual.

Para el ordenamiento jerárquico manual (Figura 19) se establecieron los mismos puntos de corte en cuanto a nivel de expresión, que se utilizaron en los

procedimientos anteriores. Se realizó el primer ordenamiento con base en la comparación del tiempo E15 contra el E13 en hembras (primera columna de datos). Posteriormente se realizó un segundo ordenamiento con base en la comparación del tiempo E15 contra el E13, en machos (segunda columna). De esta forma el conjunto total de genes se dividió en 8 subgrupos que pueden observarse en la Figura 19. Las últimas dos columnas de datos que corresponden a las comparaciones entre géneros a los diferentes tiempos se ordenaron automáticamente respecto a la segunda columna, lo que facilita la interpretación biológica de cada uno de los grupos de acuerdo a su perfil de expresión (Figura 19). El gráfico de este agrupamiento manual (*heat map*) se generó en el programa Cluster 1.0.

De acuerdo con este análisis, se identificaron al menos 8 grupos de genes con patrones de expresión definidos (Figura 19, panel inferior). La interpretación de estos grupos se describe a continuación:

- Grupo 1: Genes activados en hembras y machos. La expresión es igual entre géneros al tiempo E13 y E15.
- Grupo 2: Al tiempo E13 la expresión de los genes es mayor en machos que en hembras. Los genes se activan en hembras mientras que su expresión se mantiene sin cambio en machos. Al tiempo E15 la expresión en hembras es mayor con respecto a los machos.

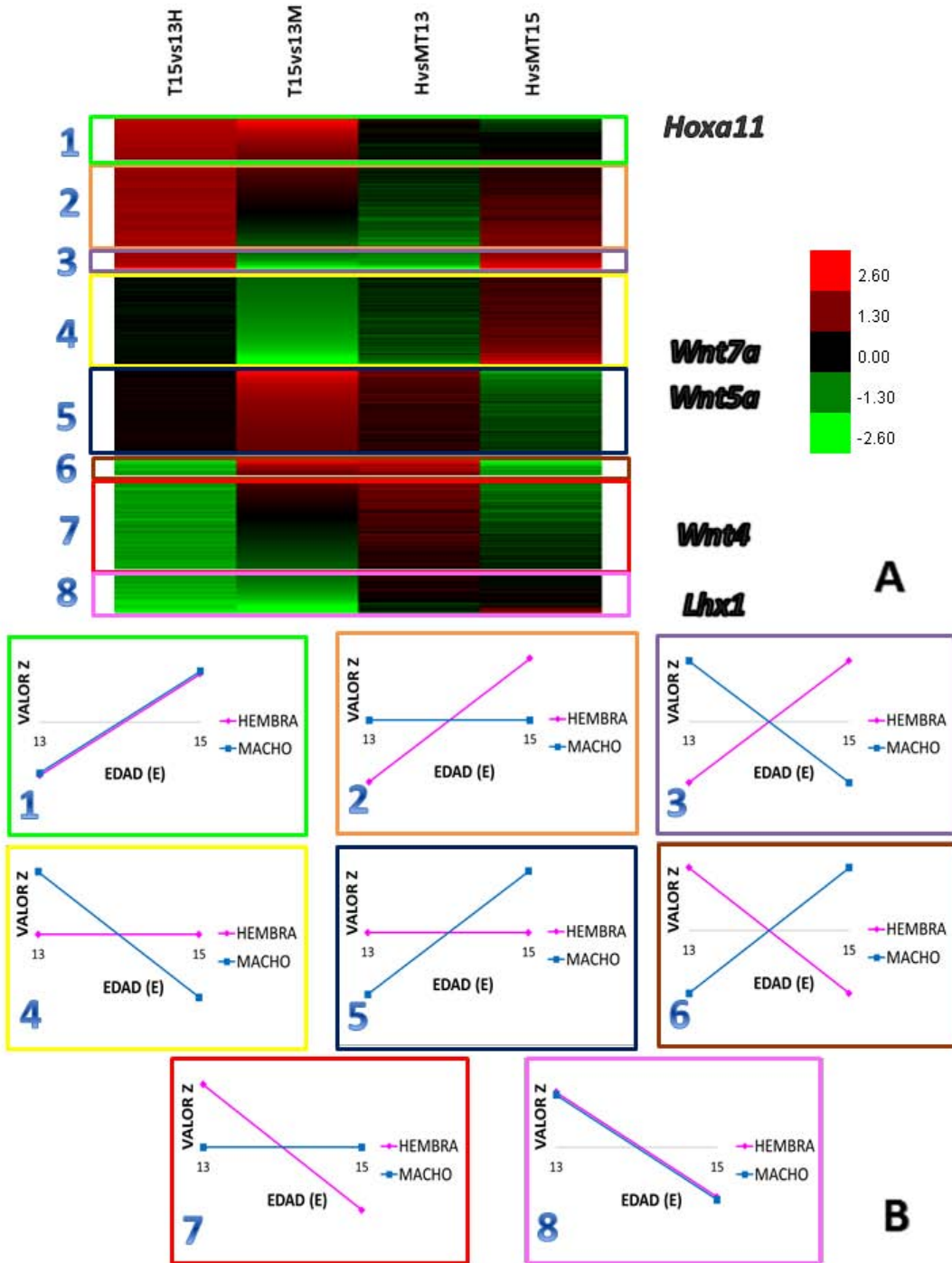


Figura 19. Comparación de los patrones de expresión mediante agrupamiento manual.

En la parte superior de la figura se observa el *heat map* resultante del ordenamiento jerárquico manual de los genes con base en su valor Z. En la parte inferior se presentan gráficas que ilustran la interpretación biológica de cada grupo identificado en el *cluster*. Se indica la posición de algunos de los genes relacionados con la diferenciación sexual femenina como son *Hoxa10*, *Hoxa11*, *Wnt7a*, *Wnt5a* y *Lhx1*.

- Grupo 3: Son genes que se activan en hembras y se reprimen en machos. Al tiempo E13 la expresión en machos es mayor que en hembras mientras que al tiempo E15 la expresión en hembras es mayor que en machos.
- Grupo 4: Al tiempo E13 la expresión de los genes es mayor en machos que en hembras, sin embargo mientras los genes en hembras mantienen su expresión, en los machos se reprimen. Al tiempo E15 la expresión en hembras es mayor con respecto a los machos.
- Grupo 5: La expresión al tiempo E13 es mayor en hembras que en machos. Mientras en las hembras la expresión se mantiene sin cambio, en los machos los genes se activan; por lo que al tiempo E15 la expresión es mayor en machos que en hembras.
- Grupo 6: Son genes que se reprimen en hembras y se activan en machos. Al tiempo E13 la expresión en machos es menor que en hembras mientras que al tiempo E15 la expresión en hembras es menor que en machos.
- Grupo 7: Al tiempo E13 la expresión es mayor en hembras que en machos, mientras las hembras se reprimen, los machos mantienen su expresión constante, por lo que para el tiempo E15 la expresión en machos es mayor que en hembras.
- Grupo 8: Genes reprimidos en hembras y machos. La expresión es igual entre géneros al tiempo E13 y E15.

Dentro de los 8 grupos de genes, los grupo 1 y 8 incluyen genes que participan en procesos comunes debido a que sus perfiles de expresión son iguales entre los

géneros. Se reagruparon los 6 grupos restantes para realizar pruebas de enriquecimiento funcional:

- Grupo A: Grupos de genes activados en hembras y sin cambio o reprimidos en machos (grupos 2 y 3 respectivamente), y sin cambio en hembras y reprimidos en machos (grupo 4).
- Grupo B: Grupos de genes activados en machos y sin cambio o reprimidos en hembras (grupos 5 y 6 respectivamente) y sin cambio en machos y reprimidos en hembras (grupo 7).

Las pruebas de enriquecimiento funcional se realizaron con la herramienta bioinformática WebGestalt, y en esta ocasión además del uso de la base de datos Gene Ontology, se incluyeron WikiPathways y KEGG. Se compararon los resultados de los grupos de genes A y B para discriminar los procesos comunes y diferenciales entre los géneros. Se asume que los procesos recuperados específicamente para el grupo A serán aquellos involucrados en la diferenciación sexual femenina, ya que este grupo de genes contiene aquellos se activaron únicamente en hembras o que se reprimieron en machos mientras su expresión se mantuvo constante en las hembras.

Los resultados para el grupo de genes diferencialmente activados en hembras (grupo A) incluyen la regulación negativa de la actividad peptidasa (39 genes, $P=3.81e-06$), que incluye genes inhibidores de la actividad endopeptidasa (33 genes, $P=5.51e-06$) (Figura 20). Esta categoría ya había sido recuperada del conjunto de

genes activados en hembras al tiempo E15, siendo una de las más específicas encontradas para ese grupo. Aunque de manera general no se ha reportado en la literatura la participación de estos genes en la diferenciación sexual femenina, la regulación negativa de la actividad peptidasa resultó ser uno de los procesos más específicos dentro del grupo de genes activados de manera diferencial en hembras. Esto sugiere que los genes involucrados en este proceso podrían estar involucrados en la diferenciación sexual del TRF.

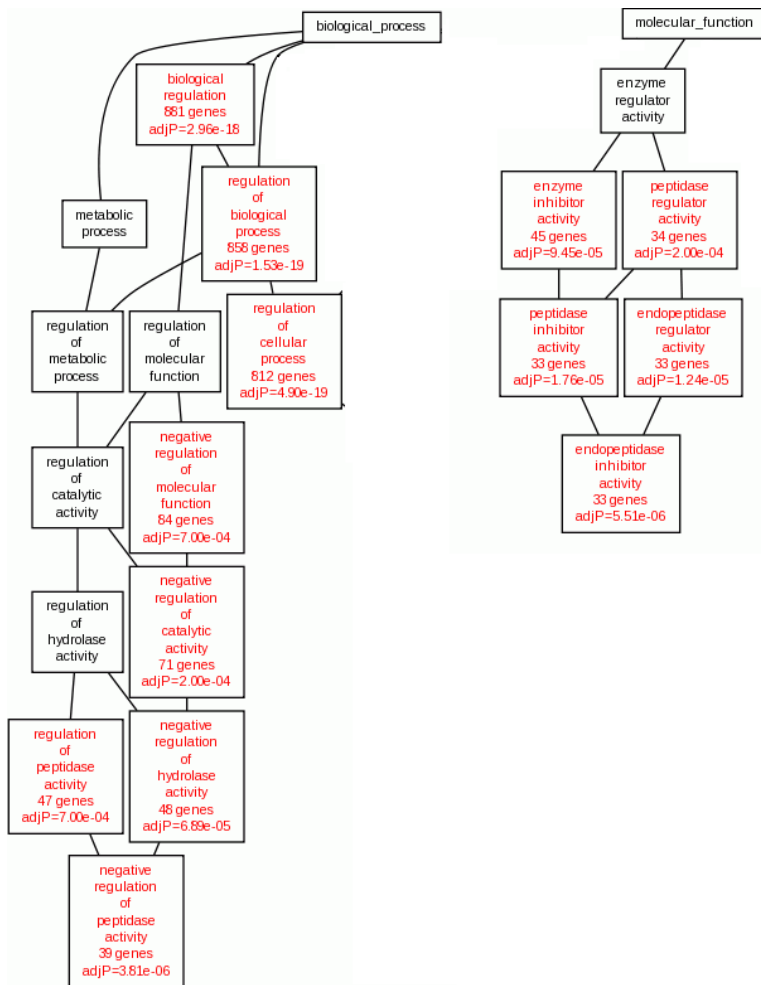


Figura 20. Ilustración de la categoría funcional de regulación negativa de la actividad peptidasa obtenida con la herramienta Gene Ontology.

En la imagen se observa la sección del mapa obtenido con la herramienta Gene Ontology correspondiente a las categorías funcionales de regulación negativa de la actividad peptidasa y de actividad inhibidora de endopeptidasas.

Se recuperaron de forma diferencial las vías de señalización de Wnt (WikiPathways P= 7.80e-05; KEGG P= 0.0003) y TGF Beta (WikiPathways P= 7.14e-05; KEGG P= 8.68e-05), a partir de los genes activados diferencialmente en hembras. La familia de glicoproteínas Wnt actúan como ligandos para activar múltiples caminos de transducción de señales que han sido reconocidos por sus roles en la regulación del desarrollo embrionario (Zimmerman, Moon, y Chien, 2012), regulando el destino celular, la proliferación celular y la muerte celular (Saito-diaz et al., 2013). La señalización por Wnt (Figura 21) es una de las más importantes para la generación de tejido. Defectos en esta señalización pueden provocar malformaciones embrionarias (Sugimura y Li, 2010). La señalización se divide en canónica y no canónica. Ambos caminos inician con ligandos Wnt y receptores *frizzled* (Sugimura y Li, 2010), una familia de receptores acoplados a proteínas G. En la vía canónica, los ligandos de Wnt estabilizan a la β -catenina citoplasmática mediante la inhibición de la degradación del complejo β -catenina. De esta forma, la β -catenina entra al núcleo activando a los genes *Wnt* mediante su interacción con la familia de proteínas del factor de células T (Manuscript, 2009), lo que regula la proliferación y diferenciación celular. La señalización no canónica de Wnt se requiere para la formación de tejido. En esta vía se incluye la señalización a través de cinasas Jun N-terminal (JNK) y proteínas G pequeñas y heterotriméricas (Veeman, Axelrod, y Moon, 2003). El calcio cumple además un papel importante como segundo mensajero (Kohn y Moon, 2005).

La señalización de Wnt/ β -catenina está implicada en el desarrollo de muchos sistemas orgánicos, entre los que se incluye la corteza cerebral, el hipocampo, los ojos, el cordón espinal, las extremidades, los huesos, los cartílagos, la cresta neural, la piel, los dientes, los intestinos, los pulmones, el corazón, el páncreas, el hígado, los riñones, las glándulas mamarias, el sistema hematopoyético y el sistema reproductivo (Voronkov y Krauss, 2013).

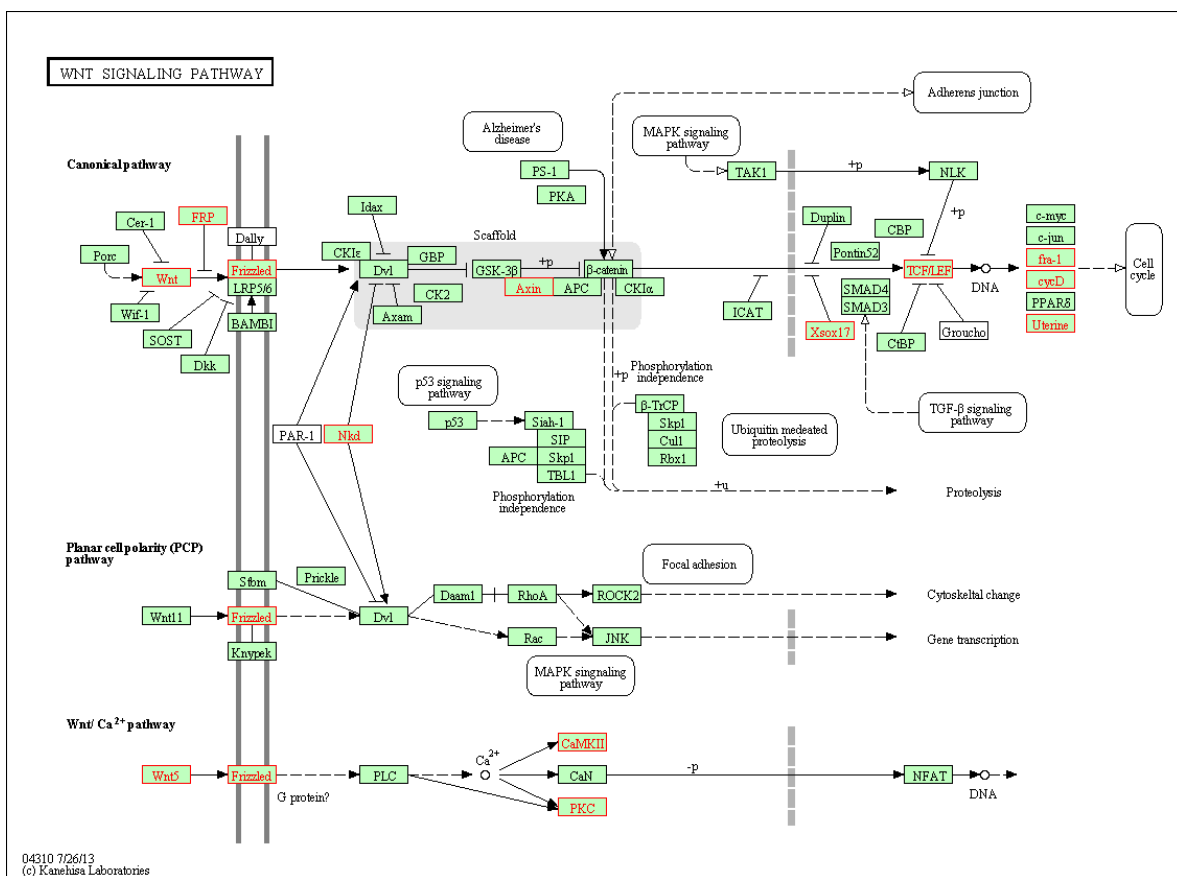


Figura 21. Vía de señalización de Wnt.

Las proteínas marcadas en rojo corresponden a los genes que se activaron únicamente en hembras o que se reprimieron en machos mientras su expresión se mantuvo constante en las hembras. Imagen tomada de las base de datos KEGG.

En ratones, mutaciones en la vía de Wnt pueden producir defectos en la formación de cerebro, huesos, riñones y pulmones (Saito-díaz et al., 2013). Algunas de las malformaciones que se asocian en ocasiones con el síndrome de aplasia Mulleriana, específicamente malformaciones del tracto urinario superior (40%), anomalías esqueléticas, especialmente cervicales (30 – 40%) o en las extremidades, defectos auditivos o sordera (10 – 25% de casos de MRKH tipo II) y en raras ocasiones anomalías cardíacas. Dentro de las malformaciones renales se encuentra la agenesia renal unilateral (23 – 28%), ectopia de uno o ambos riñones (17%), hipoplasia renal (4%), riñón de herradura e hidronefrosis (Morcel et al., 2007). Existe un subtipo de aplasia Mulleriana que se presenta asociada a hiperandrogenismo, y estos casos corresponden específicamente a mutaciones puntuales de *WNT4*. La señalización de Wnt ha sido reportada durante la formación de extremidades y cartilago. *Wnt3*, *Wnt4*, *Wnt6*, *Wnt7a*, *Wnt7b*, *Wnt9b*, *Wnt10a*, *Wnt10b* y *Wnt16* se expresan en el ectodermo durante el desarrollo temprano de extremidades. *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11* y los antagonistas de Wnt *Sfrp1*, *Sfrp3/Frzb* y *Sfrp5* participan en la formación de cartilago (Witte, Dokas, Neuendorf, Mundlos, y Stricker, 2009). Los genes *Wnt7a*, *Wnt16* y *Sfrp5* figuran dentro del grupo de activación en hembras, y permitieron recuperar la vía de señalización de Wnt (Figura 21) como proceso. La expresión de *Sfrp2* y *Sfrp5* en el conducto Mülleriano durante la diferenciación sexual femenina sugiere que estos genes podrían también estar involucrados en el desarrollo del tracto reproductor femenino (Cox et al., 2007).

La vía de señalización de Wnt también está involucrada en el desarrollo cardíaco. *Wnt11* es un regulador importante en la diferenciación y proliferación de células musculares cardíacas durante el desarrollo del corazón. La vía canónica de Wnt es requerida para la apropiada diferenciación cardíaca y la inducción celular de la cresta neural. La vía no canónica de Wnt es esencial para la migración de la cresta neural. *Nkd2*, es una proteína de unión al calcio que mediante su unión a la proteína Dishevelled antagoniza las vías canónica y no canónica de Wnt. La expresión incrementada de *Nkd2* en ratones mutantes para *Folr1* (receptor de folato 1) puede inhibir la señalización Wnt-Dishevelled contribuyendo a la presencia de anomalías cardíacas en estos embriones (Zhu et al., 2007). *Nkd2* es otro de los genes que permitieron recuperar la vía de señalización de Wnt (Figura 21).

Finalmente dentro de la lista de genes proporcionada por KEGG y WikiPathways se encontró a *Wnt7a*. La expresión de *WNT7A* ha sido detectada en humanos en placenta, riñones, testículos, extremidades fetales, cerebro fetal y adulto y útero (Timmreck, Pan, Reindollar, y Gray, 2003). Ratones hembras con pérdida completa de *Wnt7a* han presentado malformaciones de los derivados Mullerianos, incluyendo útero pequeño en longitud (C. Miller et al., 1998).

La vía de señalización TGF-Beta (Figura 22) también fue recuperada por las herramientas KEGG y WikiPathways para los genes que se activaron únicamente en hembras o que se reprimieron en machos mientras su expresión se mantuvo constante en las hembras. Esta vía regula las proteínas SMAD3 Y SMAD4, que

participan a su vez en la vía de señalización de Wnt. La familia TGFβ comprende un gran grupo de moléculas de señalización que incluyen BMPs, TGFβ, Nodal, Vg1, los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs) y activina. La señalización de tipo Nodal juega un papel importante en la formación y diferenciación del mesodermo. Nodal y Vg1 son requeridos para la formación del mesodermo y el endodermo en las etapas de pre-gástrula y gástrula temprana del desarrollo.

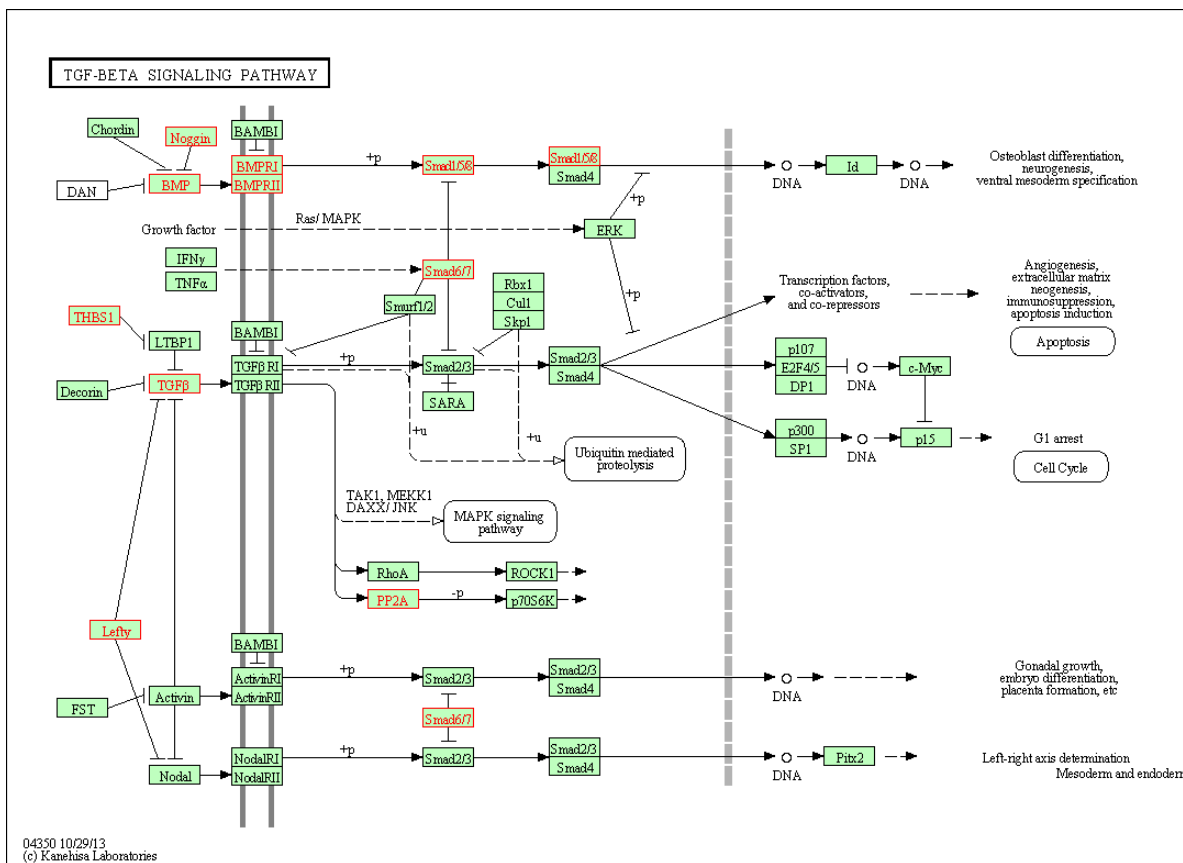


Figura 22. Vía de señalización TGF Beta.

Las proteínas marcadas en rojo corresponden a los genes incluidos en la lista de genes que se activaron únicamente en hembras o que se reprimieron en machos mientras su expresión se mantuvo constante en las hembras. Imagen tomada de las base de datos KEGG

Dentro de los genes que permitieron recuperar la vía de señalización de TGF-Beta se encuentran *Bmp2*, *Bmpr1b* y *Bmp7*. Anteriormente ya se habían encontrado algunas BMPs dentro de la lista de genes activados en hembras al tiempo E15. Las proteínas BMP participan en el desarrollo embrionario y la vida post-natal. Se han relacionado con la regulación de la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular (Forsman et al., 2014). *Bmp2* es un efector de la señalización por *Wnt1* y se relacionan con el desarrollo de condrocitos, hipertrofia de cardiomiocitos y la regulación de la vía canónica de Wnt/Beta-catenina.

Dentro de los genes de la señalización TGF-Beta se encontró a los genes *Amh*, *Amhr2* y *Smad1*; que participan en la regresión del conducto de Müller en machos a partir del E13.5. Aunque parece extraño encontrarlos en este grupo de genes, un análisis más profundo de su localización exacta en el *heat map* del ordenamiento jerárquico manual realizado (Figura 19) mostró que el transcrito *Amh* se encuentra en el grupo cuya expresión se mantuvo sin cambio en hembras y se reprimió en machos (Figura 19 – grupo 4). *Amhr2* y *Smad1* se encuentran en el grupo de genes que se activaron en hembras y mantuvieron su expresión constante en machos (Figura 19 – grupo 2). Al revisar sus valores Z se observó que estos son de 1.3 (*Amhr2*) y 1.2 (*Smad1*), por lo que su activación a nivel de RNA puede considerarse ligera, y no necesariamente reflejarse a nivel de proteína. En este sentido, se espera que en machos exista una mayor cantidad del ligando Amh al inicio de la diferenciación sexual, pues es al tiempo E13.5 cuando comienza la regresión del conducto de Müller, y probablemente al tiempo E15 su transcripción se encuentre reprimida y su mensajero en decaimiento. En las hembras el nivel de

transcrito *Amh* se mantiene constante y comienza siendo menor que para los machos. La expresión de *Amhr2* y *Smad1* no se reprime en machos, sin embargo la señalización en ese momento puede estar siendo limitada por *Amh*.

Tabla 13. **Resultados inesperados recuperados específicamente a partir del grupo A con la herramienta bioinformática WebGestalt**

Categorías funcionales	Pajustada (BH= Benjamini-Hochberg)	Base de datos
<i>Pancreatic secretion</i>	7.05e-07	KEGG
<i>Glutathione metabolism</i>	9.08e-07	KEGG
<i>Systemic lupus erythematosus</i>	6.30e-05	KEGG
<i>p53 signaling pathway</i>	0.0008	KEGG
<i>Leishmaniasis</i>	0.0005	KEGG
<i>Amoebiasis</i>	0.0005	KEGG
<i>Salivary secretion</i>	0.0005	KEGG
<i>Melanogenesis</i>	0.0004	KEGG

En conjunto, los resultados obtenidos corroboran información previa sobre la diferenciación sexual femenina, y a la vez permitieron identificar algunos genes candidatos o procesos biológicos inesperados (Tabla 13), que podrían estar involucrados en este proceso. Esta información abre diferentes campos de estudio que pueden contribuir al entendimiento de la morfogénesis del tracto reproductor femenino.

12. CONCLUSIONES

Se caracterizó mediante microarreglos la expresión global de genes murinos en tejido mesonéfrico, incluyendo los conductos de Müller y de Wolff, durante la etapa embrionaria de morfogénesis del tracto reproductor femenino.

Se identificaron cambios transcripcionales cuantificables que corresponden a genes que se activaron específicamente en hembras o que se reprimieron en machos mientras su expresión se mantuvo constante en las hembras.

El análisis de este grupo de genes mediante pruebas de enriquecimiento funcional permitió identificar algunos genes y procesos biológicos que podrían estar involucrados en la diferenciación del tracto reproductor femenino.

Dentro de los procesos con activación diferencial en hembras, uno de los más significativos es la vía de señalización de Wnt. Algunos genes de esta familia como *Wnt4*, *Wnt7a* y *Wnt5a* ya han sido implicados en la aparición de malformaciones uterinas. Además de éstos, en la lista de genes que permitió recuperar esta vía de señalización, se encontraron algunos otros genes como *Wnt16* y *Sfrp5* que se sabe que también participan en la formación de extremidades y cartílago; *Nkd2*, que en ratones mutantes para *Folr1* puede contribuir a la presencia de anomalías cardíacas. La asociación de defectos óseos y cardíacos con el síndrome de aplasia mülleriana, permite considerar la posibilidad de que estos genes, cuya mutación en humanos se asocia con

defectos oseos, renales, cardíacos y auditivos, puedan también estar involucrados funcionalmente con la diferenciación de derivados Mullerianos.

La vía de señalización TGF- β se encontró sobrerrepresentada en el grupo de genes activados diferencialmente en hembras; a través de genes como *Bmp2*, *Bmpr1b* y *Bmp7*. Las proteínas BMP participan en el desarrollo embrionario, y *Bmp2* es un efector de la señalización por Wnt1, relacionados con la regulación de la vía canónica de Wnt/Beta-catenina. Esta información sugiere que la señalización por TGF- β podría también estar involucrada en el proceso de diferenciación del TRF.

13. PERSPECTIVAS

Se caracterizó mediante microarreglos la expresión global de genes murinos durante la etapa embrionaria de morfogénesis del tracto reproductor femenino. Específicamente se muestrearon los tiempos E13 y E15, lo que permitió realizar un análisis de los cambios transcripcionales cuantificables que potencialmente corresponden a genes involucrados en la diferenciación sexual femenina. Dentro de los resultados, se recuperaron genes que ya han sido reportados en la literatura, pero además se recuperaron genes que no se han reportado como parte de la diferenciación sexual femenina, pero que este estudio sugiere que podrían estar involucrados.

LHX1 ha sido uno de los principales genes candidatos responsables de la etiología del síndrome de aplasia mülleriana, sin embargo durante el análisis de los cambios transcripcionales se observó que su expresión se reprimió en hembras al tiempo E15 con respecto al tiempo E13. Aunque podría ser un resultado inesperado, en realidad se sabe que *Lhx1* participa durante el inicio de la formación del conducto de Müller, en el tiempo E11.5, por lo que su mayor actividad probablemente se presenta antes de los tiempos muestreados. Debido a esto podría ser importante ampliar el estudio, incluyendo tiempos anteriores al E13, de forma que se identifiquen genes involucrados en la formación del TRF y cuya alteración puede ser parte de la etiología de la aplasia Mülleriana.

En este trabajo se analizaron los puntos inicial y medio de la ventana de diferenciación sexual (E13 y E15), sin embargo sería apropiado completar la secuencia de tiempos (E14, E16 y E17) para tener una visión más integral de la expresión global de genes murinos durante esta etapa embrionaria. Esto podría permitir la recuperación de genes que participan en el proceso pero que presentan su mayor expresión antes o después del tiempo E15 y que por lo tanto durante este estudio podrían haber pasado desapercibidos.

Finalmente, sería interesante realizar una comparación entre los genes candidatos resultantes del presente estudio con aquellos que se han mostrado alterados en estudios genómicos de mujeres con MRKH. Esto permitiría avanzar en el conocimiento de la etiología del síndrome al identificar los genes alterados en mujeres con MRKH y que además se sabe participan durante el proceso de diferenciación sexual.

14. BIBLIOGRAFÍA

Affymetrix Inc, Wt, G., y Reagent, P. (n.d.). User Manual. 2013.

Bernardini, L., Gimelli, S., Gervasini, C., Carella, M., Baban, A., Frontino, G., Dallapiccola, B. (2009). Recurrent microdeletion at 17q12 as a cause of Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome: two case reports. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4, 25. doi:10.1186/1750-1172-4-25

Bolstad, B. M. (2014). RMAExpress Users Guide 1.1.0.

Cheroki, C., Szuhai, K., Brenner, V., Kim, C. A. E., Otto, P. A., y Rosenberg, C. (2008). Genomic imbalances associated with müllerian aplasia, 228–232. doi:10.1136/jmg.2007.051839

Chia, R., Achilli, F., Festing, M. F. W., y Fisher, E. M. C. (2005). The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nature Genetics*, 37(11), 1181–6. doi:10.1038/ng1665

Clapcote, S. J., y Roder, J. C. (2005). Simplex PCR assay for sex determination in mice. *BioTechniques*, 38(5), 702, 704, 706. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15945368>

Cox, S. A. M., Smith, L. E. E., Bogani, D., Cheeseman, M., Siggers, P. A. M., y Greenfield, A. (2007). Europe PMC Funders Group Sexually Dimorphic Expression of Secreted Frizzled-Related (SFRP) Genes in the Developing Mouse Müllerian Duct, 73(8), 1008–1016. doi:10.1002/mrd.20507.Sexually

Crews, D. 1993. The organizational concept and vertebrates without sex chromosomes. *Brain Behav. Evol.* 42: 202–214.

De Hoon, M. J. L., Imoto, S., Nolan, J., y Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics* (Oxford, England), 20(9), 1453–4. doi:10.1093/bioinformatics/bth078

Del Castillo Ruiz, V., Uranga Hernández, R. D., y Zafra de la Rosa, G. (2012). *Genética Clínica* (1a. ed.). México, México: Manual moderno.

Eggers, S., y Sinclair, A. (2012). Mammalian sex determination—insights from humans and mice. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 20(1), 215–38. doi:10.1007/s10577-012-9274-3

Eisen, M. (s.f.). Cluster 3.0. Obtenido de <http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/software.htm>

Forsman, C. L., Ng, B. C., Heinze, R. K., Kuo, C., Gopalakrishnan, R., Yee, D., Kathryn, L. (2014). NIH Public Access, 373(1), 612–626. doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.007.BMP-binding

Fujino, A., Arango, N. a, Zhan, Y., Manganaro, T. F., Li, X., MacLaughlin, D. T., y Donahoe, P. K. (2009). Cell migration and activated PI3K/AKT-directed elongation in the developing rat Müllerian duct. *Developmental Biology*, 325(2), 351–62. doi:10.1016/j.ydbio.2008.10.027

Gendron, R. L., Paradis, H., Hsieh-Li, H. M., Lee, D. W., Potter, S. S., y Markoff, E. (1997). Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biology of Reproduction*, 56(5), 1097–105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9160706>

Guerrier, D., Mouchel, T., Pasquier, L., y Pellerin, I. (2006). The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome (congenital absence of uterus and vagina)--phenotypic manifestations and genetic approaches. *Journal of Negative Results in Biomedicine*, 5, 1. doi:10.1186/1477-5751-5-1

Huang, C.-C., Orvis, G. D., Kwan, K. M., y Behringer, R. R. (2014). Lhx1 is required in Müllerian duct epithelium for uterine development. *Developmental Biology*, 389(2), 124–36. doi:10.1016/j.ydbio.2014.01.025

Jabeen, M. (2011). Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser Syndrome. *World Journal of Laparoscopic Surgery with DVD*, 4, 123–128. doi:10.5005/jp-journals-10007-1128

Jacob, M., Yusuf, F., y Jacob, H. J. (1985). *Development , Differentiation and Derivatives of the Wolffian and Müllerian Ducts*.

Kashimada, K., y Koopman, P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development (Cambridge, England)*, 137(23), 3921–30. doi:10.1242/dev.048983

Kim, I., Ph, D., Kang, H. C., y Park, J. (2004). *Microarray Applications in Cancer Research*, 36(4), 207–213.

Knower, K. C., Kelly, S., y Harley, V. R. (2003). Turning on the male – SRY , SOX9 and, 198, 185–198. doi:10.1159/000074336

Kobayashi, A., y Behringer, R. R. (2003). Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews. Genetics*, 4(12), 969–80. doi:10.1038/nrg1225

Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A., y Behringer, R. R. (2004). Requirement of *Lim1* for female reproductive tract development. *Development (Cambridge, England)*, 131(3), 539–49. doi:10.1242/dev.00951

Kohn, A. D., y Moon, R. T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38(3-4), 439–46. doi:10.1016/j.ceca.2005.06.022

Lambert, J. F., Benoit, B. O., Colvin, G. a, Carlson, J., Delville, Y., y Quesenberry, P. J. (2000). Quick sex determination of mouse fetuses. *Journal of Neuroscience Methods*, 95(2), 127–32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10752483>

Ledig S, Schippert C, Strick R, Beckmann MW, Oppelt PG, Wieacker P. (2011). Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome. *Fertility and Sterility*, 95(5), 1589–1594. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1062

Ledig, S., Brucker, S., Barresi, G., Schomburg, J., Rall, K., y Wieacker, P. (2012). Frame shift mutation of *LHX1* is associated with Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(9), 2872–5. doi:10.1093/humrep/des206

Lovén, J., Orlando, D. A., Sigova, A. A., Lin, C. Y., Rahl, P. B., Burge, C. B., Young, R. A. (2013). NIH Public Access, 151(3), 476–482. doi:10.1016/j.cell.2012.10.012.Revisiting

Manuscript, A. (2009). Wnt signaling : the good and the bad, 1–29.

Mericskay, M., Kitajewski, J., y Sassoon, D. (2004). *Wnt5a* is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development (Cambridge, England)*, 131(9), 2061–72. doi:10.1242/dev.01090

Miller, C., Pavlova, A., y Sassoon, D. A. (1998). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle, 76, 91–99.

Miller, M. B., y Tang, Y.-W. (2009). Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 611–33. doi:10.1128/CMR.00019-09

Milligan, G. W., y Martha, C. (1987). Methodology Review: Clustering Methods, 329–354.

Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I., y Aizawa, S. (1997). Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* (Cambridge, England), 124(9), 1653–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9165114>

Morcel, K., Camborieux, L., y Guerrier, D. (2007). Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(601076), 13. doi:10.1186/1750-1172-2-13

Mullen, R. D., y Behringer, R. R. (2014). Molecular Genetics of Müllerian Duct Formation, Regression and Differentiation. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*. doi:10.1159/000364935

National Center for Biotechnology Information. (s.f.). Gene, NCBI. Recuperado en Diciembre de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>

National Center for Biotechnology Information. (s.f.). GTR, NCBI. Recuperado en Diciembre de 2014, de Genetic Testing Registry: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtr>

Nef, S. (2000). Hormones in male sexual development. *Genes y Development*, 14(24), 3075–3086. doi:10.1101/gad.843800

Nik-zainal, S., Strick, R., Storer, M., Huang, N., Rad, R., Fitzgerald, T., Shaw-, C. (2012). UKPMC Funders Group Author Manuscript High incidence of recurrent copy number variants in patients with isolated and syndromic Müllerian aplasia, 48(3), 197–204. doi:10.1136/jmg.2010.082412.High

Ono, M., y Harley, V. R. (2013). Disorders of sex development: new genes, new concepts. *Nature Reviews. Endocrinology*, 9(2), 79–91. doi:10.1038/nrendo.2012.235

Orvis, G. D., y Behringer, R. R. (2007). Cellular mechanisms of Müllerian duct formation in the mouse. *Developmental Biology*, 306(2), 493–504. doi:10.1016/j.ydbio.2007.03.027

Park, D., Jia, H., Rajakumar, V., y Chamberlin, H. M. (2006). Pax2/5/8 proteins promote cell survival in *C. elegans*. *Development* (Cambridge, England), 133(21), 4193–202. doi:10.1242/dev.02614

Parker, K. L., y Schimmer, B. P. (2006). Embryology and Genetics of the Mammalian Gonads and Ducts.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (95, 12930–12933),. (1999), (22), 12930–12933.

RMAExpress. (8 de Julio de 2014). Recuperado el 9 de Diciembre de 2014, de <http://rmaexpress.bmbolstad.com/>

Sadler, T. (2000). Embriología Médica (7a ed.). Mexico, México: Editorial Panamericana.

Saito-diaz, K., Chen, T. W., Wang, X., Thorne, C. A., Wallace, H. A., Page-mccaw, A., y Lee, E. (2013). NIH Public Access, 31(1), 1–31. doi:10.3109/08977194.2012.752737.The

Sandbacka, M., Laivuori, H., Freitas, É., Halttunen, M., Jokimaa, V., Morin-Papunen, L., Aittomäki, K. (2013). TBX6, LHX1 and copy number variations in the complex genetics of Müllerian aplasia. Orphanet Journal of Rare Diseases, 8, 125. doi:10.1186/1750-1172-8-125

Sugimura, R., y Li, L. (2010). Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. Birth Defects Research. Part C, Embryo Today : Reviews, 90(4), 243–56. doi:10.1002/bdrc.20195

Timmreck, L. ., Pan, H. ., Reindollar, R. ., y Gray, M. . (2003). WNT7A Mutations in patients with Müllerian duct abnormalities. Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology, 16(4), 217–221. doi:10.1016/S1083-3188(03)00124-4

Van Gelder, R. N., von Zastrow, M. E., Yool, a, Dement, W. C., Barchas, J. D., y Eberwine, J. H. (1990). Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(5), 1663–7.

Veeman, M. T., Axelrod, J. D., y Moon, R. T. (2003). A Second Canon : Functions and Mechanisms of β -Catenin-Independent Wnt Signaling, 5(2002), 367–377.

Voronkov, A., y Krauss, S. (2013). Wnt / beta-Catenin Signaling and Small Molecule Inhibitors, 634–664.

Wang, J., y Zhang, B. (2014). WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit. Recuperado en Noviembre de 2014

Wang, J., Duncan, D., Shi, Z., y Zhang, B. (2013). WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W77–83. doi:10.1093/nar/gkt439

Weizmann Institute of Science. (s.f.). GeneCards. Recuperado en Diciembre de 2014, de <http://www.genecards.org>

Wilhelm, D., Martinson, F., Bradford, S., Wilson, M. J., Combes, A. N., Beverdam, A., Koopman, P. (2005). Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Developmental Biology*, 287(1), 111–24. doi:10.1016/j.ydbio.2005.08.039

Witte, F., Dokas, J., Neuendorf, F., Mundlos, S., y Stricker, S. (2009). Comprehensive expression analysis of all Wnt genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene Expression Patterns : GEP*, 9(4), 215–23. doi:10.1016/j.gep.2008.12.009

Yao, H. H. C., Matzuk, M. M., Jorgez, C. J., Menke, D. B., Page, D. C., Swain, A., y Capel, B. (2004). Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 230(2), 210–5. doi:10.1002/dvdy.20042

Zhu, H., Cabrera, R. M., Wlodarczyk, B. J., Bozinov, D., Wang, D., Schwartz, R. J., y Finnell, R. H. (2007). Differentially expressed genes in embryonic cardiac tissues of mice lacking *Folr1* gene activity. *BMC Developmental Biology*, 7, 128. doi:10.1186/1471-213X-7-128

Zimmerman, Z. F., Moon, R. T., y Chien, A. J. (2012). Targeting Wnt Pathways in Disease, 1–24.

15. APÉNDICE

15.1. APÉNDICE I

Procedimiento experimental de la determinación de la integridad de las muestras de RNA con el Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.)

La matriz de gel se preparó centrifugando 550 μ l de RNA gel matrix (Agilent Technologies) en un filtro para microcentrifuga (1500xg durante 10 min a temperatura ambiente). Brevemente, la matriz se distribuyó en alícuotas de 65 μ l y almacenó a 4°C hasta su uso. Se equilibró el RNA Nano dye (Agilent Technologies Inc.) a temperatura ambiente durante 30 min y se agregó 1 μ l de este a una alícuota de 65 μ l de matriz filtrada. La matriz con colorante se mezcló y se centrifugó a 13000xg durante 10 min a temperatura ambiente. Se colocó un chip RNA 6000 Nano chip (Agilent Technologies Inc.) en la estación de cebado, se agregaron 9 μ l de la mezcla de matriz con colorante en el primer pozo designado y se cerró la estación de cebado con el émbolo en la posición de 1mL. Se oprimió el émbolo lentamente hasta que quedó sostenido por el clip de la estación. Se liberó el émbolo después de 30 segundos y 5 segundos después se colocó en su posición original. Se abrió la estación de cebado y se añadieron 9 μ l de la mezcla de gel con colorante en los otros dos pozos designados. Se agregaron 5 μ l de RNA marker (Agilent Technologies Inc.) a cada uno de los pozos de las muestras y de la escalera de RNA, seguido de 1 μ l de muestra o de la escalera. Se vortexeo el chip en el IKA M3 vortexer (Agilent Technologies Inc.) durante 1 min a 2400 rpm y se analizó en el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.).