

6
2ej.



Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado

Insurgentes Sur y Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, México, D.F., Código Postal: 04510

UNAM-CCH



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**DIFERENCIACION SEXUAL: EXPRESION GENICA EN LA
GONADA DE RATON**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA**

PRESENTA

VERONICA M. NARVAEZ PADILLA

TEMA CON
FALLA DE ORIGEN

1992



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 está 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.

INDICE

INTRODUCCION	...2
Teorías sobre la diferenciación sexual	...3
Desarrollo sexual primario en ratón	...9
Organogénesis de la gónada <u>in vitro</u>	..13
OBJETIVO	..16
MATERIALES Y METODOS	..17
Reagregados de 11,12 y 13 dpc	..17
Sexado de gónadas de 11 dpc	..18
Extracción de RNA	..18
Preparación de cDNA	..20
Amplificación de transcritos por PCR	..20
Purificación de oligonucleótidos	..22
Hibridización de las amplificaciones	..23
RESULTADOS	..26
Estandarización del método de detección del Sry	..26
Extracción de RNA de una sola gónada	..27
Cultivos de gónadas disgregadas	..28
Expresión del Sry y AMH en los reagregados	..30
DISCUSION	..35
CONCLUSIONES	..39

INTRODUCCION

Uno de los fenómenos más interesantes de la biología es que a partir de una célula se genere un organismo completo, con innumerables células diferenciadas, todas ellas con una función particular y perfectamente organizadas. La biología del desarrollo estudia este proceso, que inicia con la fertilización del huevo, y termina prácticamente hasta la muerte del organismo. Actualmente ésta es un área muy estimulante, ya que empiezan a comprenderse los mecanismos moleculares del desarrollo animal y se están integrando muchas disciplinas de las ciencias biológicas, como la biología molecular y celular, la fisiología, la genética y la embriología, para el mejor entendimiento del desarrollo.

La diversidad celular de un organismo se obtiene gracias al proceso de diferenciación progresiva de unas células con respecto a otras. En este proceso de desarrollo hay cambios en la potencialidad de la célula, pasando de la totipotencialidad (en el caso de los ovocitos), hasta el llegar a ser unipotentes (pudiendo dar lugar a un sólo tipo celular). A este proceso de pérdida de potencialidad se le llama determinación. Así, algunas células se determinan a ser mioblastos, linfoblastos, o neuroblastos, aunque fenotípicamente no se distinguen como tales. El proceso que las lleva a expresar fenotípicamente su destino determinado, lo llamamos diferenciación. Respecto a estos procesos se tienen muchas preguntas: ¿Cómo se decide el destino de las células? ¿Qué mecanismos llevan a cabo la diferenciación de una célula? ¿Cómo, una vez diferenciadas las células, logran integrarse, formar una estructura definida y cumplir con su función?

Con los estudios recientes en biología molecular se ha propuesto que la determinación y la diferenciación celular se lleva a cabo a través de cascadas de regulación de genes, es decir, el activar unos genes que a su vez regulan la expresión de otros y éstos a su vez a otros. Por esto, un aspecto muy importante del estudio del desarrollo es el estudio de los genes que influyen en él, y la regulación de los mismos. Cuando se logre comprender cuál es el papel de los genes durante el desarrollo, será más fácil entender cómo se lleva a cabo este proceso.

Las cascadas de regulación genética se dan en todos los organismos; amplifican una pequeña diferencia inicial, creando grandes diferencias finales. Por ejemplo, en la diferenciación sexual de organismos como Drosophila o Caenorhabditis elegans, la diferencia en número de un mismo gene es detectada y amplificada por la interacción de varios genes

que a su vez regulan a otros (¹). Estas interacciones pueden involucrar regulaciones a distintos niveles como: transcripcional, en donde distintos factores de transcripción actúan para que se expresen distintos genes; post-transcripcional, con procesamientos o "splicing" alternativos de los mRNAs; traduccional, como en el caso de los mRNAs maternos que permanecen estables sin traducirse hasta el momento en que son requeridos; y post-traduccional, con modificaciones que activan o inactivan a las proteínas.

Un modelo muy interesante para el estudio de la determinación y diferenciación celular es la diferenciación sexual de las gónadas. El establecimiento del sexo en un organismo es un modelo que tiene grandes ventajas al ser las gónadas indiferenciadas órganos únicos en su tipo por poder elegir entre dos caminos para diferenciarse: ovario o testículo; mientras que el resto de los órganos indiferenciados tienen sólo un destino posible. De esta forma, las gónadas son órganos bipotenciales por lo que podemos buscar el "factor" que determina uno u otro camino. Además, podemos obtener mutantes que no son letales para el organismo, por lo que pueden ser estudiadas in vivo.

TEORIAS SOBRE LA DIFERENCIACION SEXUAL

¿Cómo se establece el sexo de un organismo? Esta pregunta es muy vieja; ya Aristóteles se lo preguntaba y fue el primero en proponer una hipótesis al respecto. Propuso que el calor del macho durante el acto sexual determinaba el sexo de los hijos. Entre más caliente el macho, había mas probabilidad de que el producto fuera macho. En el siglo XIX se propuso que diversos factores ambientales determinaban el sexo, como la nutrición, el calor, la edad y la salud de los padres. Actualmente se conoce que tanto el medio ambiente como componentes genéticos pueden participar en la determinación del sexo de un organismo (²).

El medio ambiente determina el sexo en algunos reptiles y aves. El sexo es determinado en ciertos casos por la temperatura a la que se incuban los huevos. En otros, como en el de Bonellia viridis (un animal marino), el sitio en donde cae la larva determina el sexo: si ésta cae en la boca de una hembra, continúa hasta el útero, donde se diferencia como macho (vive ahí como parásito, fertilizando a la hembra); si la larva cae fuera se convierte en hembra (²). ¿Cuáles son los mecanismos internos involucrados en la determinación marcada por el medio ambiente, y cómo

¹ Baker, B.S. (1989). Sex in flies: the splice of life. *Nature* 340, 521-524.
Hodgkin, J. (1987). Sex determination and dosage compensation in Caenorhabditis elegans. *Annu. Rev. Genet.* 21, 133-154.

² Gilbert S. F. *Developmental Biology*, (1991). Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

es que ésta se lleva a cabo son preguntas que todavía quedan por contestar.

La determinación sexual por componentes genéticos depende de la presencia de ciertos genes, normalmente encontrados en los cromosomas sexuales (Tabla 1). Estos genes maestros inician una cascada de regulación (ejemplos figuras 1 y 2) que da como resultado final que el organismo sea hembra o macho.

En organismos como Drosophila o Caenorhabditis, todos los genes requeridos para el desarrollo sexual se encuentran presentes en ambos sexos; el sexo del organismo es determinado por la relación numérica entre los cromosomas X y los cromosomas autosómicos. La cascada de regulación está muy bien estudiada y caracterizada en estos organismos, y se conocen muchos de los genes y mecanismos que participan en ella (Figuras 1 y 2).

En organismos como aves y mamíferos, la determinación del sexo parece depender de la presencia o ausencia de un "factor determinante", que supuestamente actúa para iniciar una cascada de regulación. En mamíferos, este factor ha sido buscado por largo tiempo. Lo primero que se dedujo fue que debía actuar determinando al organismo como macho y se debía encontrar en el cromosoma Y; porque se observó que si hay uno de estos cromosomas, el individuo se desarrolla como macho, independientemente del número de cromosomas X existentes. A este "determinante" se le llamó "factor determinante del testículo o FDT"

El primer FDT propuesto fue el antígeno H-Y (³). Esta sustancia fue descubierta en 1955 (⁴) como resultado de un trasplante de piel en una cepa de ratón genéticamente idéntica. Los machos sí aceptaron el trasplante de hembras, mientras que las hembras rechazaron los trasplantes de macho. Como todos los demás genes eran iguales, se propuso que el cromosoma Y estaba produciendo un antígeno de superficie que era rechazado por las hembras. Sin embargo, en 1984 se demostró que no era necesario el antígeno H-Y para la diferenciación testicular en ratón (⁵), pues se encontraron ratones que aún sin este antígeno se desarrollaban como machos. Más tarde se observó que en

³ Watchel S. S., S. Ohno, G. C. Koo, E. A. Boyse (1975) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257, 236-236.

⁴ Eichwald, E.M. and C.R. Silmsler. (1955). Communication. *Transplant. Bull.* 2, 148.

⁵ McLaren, A., E. Simpson, K. Tomonari, P. Chandler, and H. Hogg. (1984). Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312: 552.

La Cascada de Regulación que se ha Propuesto para la Determinación del Sexo en *Drosophila*.

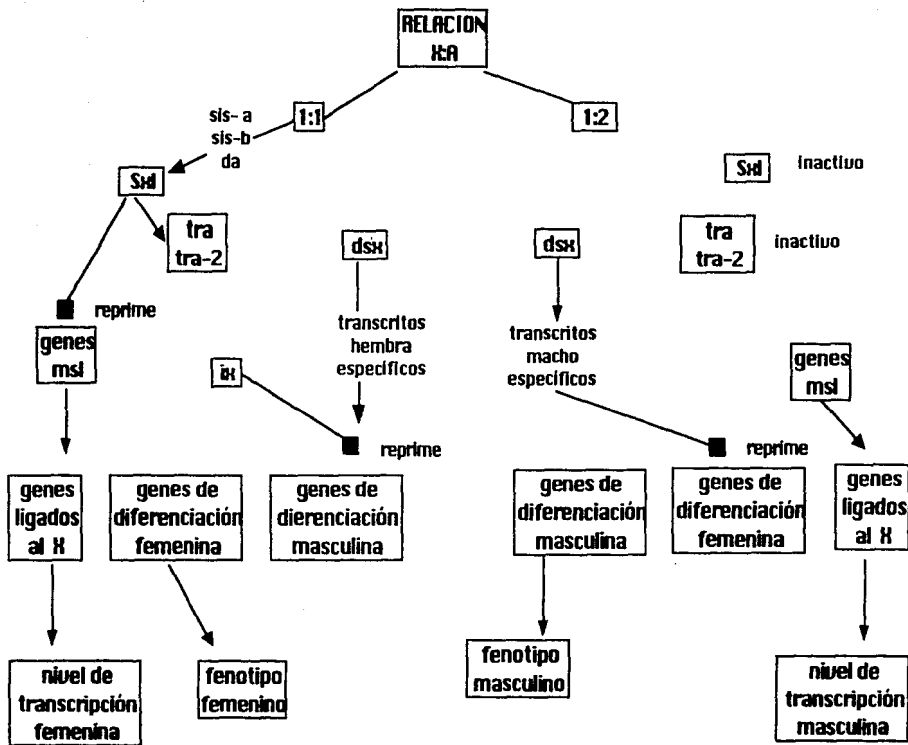


Figura 1. La cascada de regulación que se ha propuesto para la determinación del sexo en *Drosophila*, Las flechas indican activación, los cuadros negros represión (2).

TABLA 1:**Determinación Cromosomal del Fenotipo Sexual**

	XX	XY	XO	XXY
<u>D. melanogaster</u>	hembra	macho	macho	hembra
<u>C. elegans</u>	hermafrodita	—	macho	—
<u>M. musculus</u>	hembra	macho	hembra	macho
<u>G. domesticus</u>	macho	hembra	¿?	¿?

HERMAFRODITA

ALTO— BAJO	ALTO— BAJO	ALTO— BAJO	ALTO— BAJO	ALTO>>
X/A	Xol-1	sdc-1,2	her-1	tra-2,3
		fem-1,2,3	tra-1	
BAJO	ALTO— BAJO	ALTO— BAJO	ALTO— BAJO	ALTO>>

MACHO

Figura 2. Cascada de regulación génica en C. elegans. La relación entre los cromosomas X y los autosómicos determinan el sexo de este nemátodo. Si la relación es alta (XX/AA), la expresión del siguiente gene de la cascada *xol-1*, se reprime, lo que permite la expresión de *sdc-1* y *sdc-2*. Estos continúan con la cascada de la forma que se muestra en la figura, dando como resultado un hermafrodita. Cuando la relación es baja (X0/AA), *Xol-1* se activa, invirtiéndose toda la cascada, lo que genera un macho (*).

* Miller, L. M., J. D. Plenefach, L. P. Casson, and B. J. Meyer (1988). *xol-1*: A Gene That Controls the Male Modes of Both Sex Determination and X Chromosome Dosage Compensation in C. elegans. Cell 55, 167-183.

humano existían casos de machos XX y hembras XY. Se encontró que esto se debía a una translocación de la región 1 del cromosoma Y a algún otro cromosoma (⁷), lo que sugería fuertemente que el FDT se encontraba en esta región. En 1987, el grupo de David Page aisló una secuencia de la región 1 del cromosoma Y cuyo producto se presentaba como un fuerte candidato para funcionar como el FDT (⁸). Este gene codifica a una proteína que posee un dominio tipo "dedo de zinc" (un dominio de unión a DNA) por lo que en humano fue llamada ZFY ("zinc finger Y"), y Zfy en ratón. Las evidencias en favor de este gene como el FDT eran:

- 1) Que fue encontrado en los machos y no en las hembras;
- 2) Que se encontraron secuencias relacionadas a Zfy en el cromosoma Y de todos los mamíferos placentados en los que se buscó;
- 3) Que se encontró Zfy en ratones mutantes Sxr' (ratones con reversión sexual que al parecer tienen una translocación cromosomal, de la mínima porción del FDT (que especifica la formación del testículo), ya que no transloca un gene involucrado en espermatogénesis [Spy], ni transloca Hya [el gene que controla la expresión del antígeno H-Y]).

Aparecieron, sin embargo, evidencias que pusieron en duda el papel de Zfy como el FDT:

1. En marsupiales las secuencias relacionadas con Zfy no se encontraron en los cromosomas sexuales, sino en los autosómicos.

2. La expresión de Zfy se encontró ligada a las células germinales (⁹), lo cual resulta incompatible con un papel determinante del sexo, al no ser estas células necesarias para el desarrollo del testículo (¹⁰).

3. Se encontraron cuatro casos de individuos XX machos con secuencias de Y y que, sin embargo, no tenían ZFY.

Unos meses después, los grupos de Lovell-Badge y Goodfellow encontraron otro gene en la región 1 del cromosoma Y (¹¹). Este gene es hasta el momento, el mejor candidato para ser identificado como el FDT.

⁷ Page, D.C. (1985). Sex reversal: Deletion mapping of the male-determining function of the human Y chromosome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:229-235.

⁸ Page, D.C., et al. (1987). The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a zinc finger protein. Cell 51: 1091-1104.

⁹ Koopman P., J. Gubbay, J. Collignon, and R. Lovell-Badge (1989). Zfy gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. Nature 342: 940-942.

¹⁰ Merchant, H. (1975) Rat gonadal and Ovarian Organogenesis With and Without Germ Cells. An Ultrastructural Study. Devl. Biol. 44, 1-21.

McLaren, A. in The Origin and Evolution of Sex (eds Halvorson H.O. and Monroy, A.) 289-300 (Liss, New York, 1985)

¹¹ Sinclair, et al. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346:240-244.

Gubbay J., et al., (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346:245-250.

Las evidencias en su favor son:

1. Es un gene conservado en todas las especies de mamíferos probadas.

2. El gene mapea cerca de la porción en Y que confiere la masculinidad.

3. En hembras XY no está presente (¹²).

4. Cuando se encontraron casos de hembras XY en donde aparecía el SRY, éste se encuentra mutado.

5. Su patrón de expresión coincide perfectamente, tanto temporal como morfológicamente, con la diferenciación gonadal. En ratón, su expresión se detecta desde los 10 días post-coito (dpc), hasta los 12 dpc; etapa crítica en la diferenciación de las gónadas, pues en ella la gónada indiferenciada (igual en ambos sexos), pasa a ser diferenciada (ya sea testículo u ovario). Experimentos basados en hibridaciones in situ muestran que el gene se expresa en el primordio gonadal (¹³).

6. Ratones transgénicos que contienen una copia de este gene se desarrollan como machos, a pesar de ser cromosomalmente hembras (¹⁴). Esta es una de las evidencias más fuertes, ya que al parecer sólo se requiere de este gene para provocar desarrollo de macho. En ese estudio se intentó también introducir al ratón el gene homólogo de humano pero, al menos en dicho caso, no funcionó.

Este gene fue llamado en humano SRY ("sex region Y") y Sry en ratón. El Sry es un gene que tiene homología con las proteínas del grupo de "alta movilidad", lo que sugiere su papel como factor transcripcional. Se reportó una secuencia que parece ser la reconocida por la proteína codificada por Sry para su unión a DNA (¹⁵). Todavía no se sabe que factores regulan a este gene, ni a qué genes regula éste. Probablemente regula directa o indirectamente la expresión de la AMH (hormona antimulleriana), ya que de ésta depende gran parte del desarrollo posterior como macho, y esta hormona es el siguiente marcador molecular de diferenciación. Otro posible blanco serían los esteroides gonadales. En pollo, se ha visto que la inducción de la actividad de la aromatasa (la enzima que cataliza el último paso de la conversión de andrógenos a estrógenos) es un paso crucial y general del control de la diferenciación

¹² Philippe B., J. R. Hawkins, A. H. Sinclair, A. Taylor, B. L. Griffiths, P. N. Goodfellow and M. Fellous (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448-450.

¹³ Koopman P., A. Münsterberg, B. Capel, N. Vivian and R. Lovell-Badge (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 348, 450-452.

¹⁴ Koopman P. et al. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351:117-121.

¹⁵ Harley, V.R. et al. (1992) DNA Binding Activity of Recombinant SRY from Normal Males and XY Females. *Science* 255, 453-456.

gonadal y la determinación del sexo (¹⁶). También es probable que el Sry actúe sobre factores de crecimiento, ya que la distinta velocidad de crecimiento (ya sea por proliferación celular o por invasión de células) parece ser una de las diferencias entre el testículo y el ovario (¹⁷). En que consiste el papel de este gene en la morfogénesis de la gónada es otra pregunta interesante, pues no sólo importa su diferenciación sexual, sino la forma en que ésta se desarrolla.

¿Existe alguna relación entre la determinación y diferenciación sexuales y la morfogénesis? ¿Podiera darse una sin que necesariamente se diera la otra? Encontrar los pasos en esta cascada que determina el sexo en mamíferos es fundamental, pues cuando sepamos cuál es esta cascada y qué papel juega cada uno de los elementos en ella, podremos entender cómo es que algunos individuos son niñas y otros niños.

DESARROLLO SEXUAL PRIMARIO EN RATON

El desarrollo de las gónadas es el siguiente (¹⁸):

A los 10 dpc se logra distinguir la cresta genital en la región ventral del mesonefros. La gónada surge a partir de esta cresta, la que consiste en células somáticas y germinales primordiales fuertemente unidas a la superficie del epitelio. En esta etapa se pueden reconocer tres características morfogenéticas importantes: condensación de células somáticas a lo largo de la cresta genital, deposición gradual de lámina basal y una baja actividad mitótica de las células tipo epiteliales. Como consecuencia de estas características se forman los cordones gonadales tanto en hembras como en machos. A los 11 dpc se puede distinguir la gónada, aunque en esta etapa se trata de una gónada indiferenciada ya que no se distinguen diferencias morfológicas entre las de hembras y machos. El primer rasgo de diferenciación sexual (a los 12 dpc) es la invasión gradual de mesénquima y células endoteliales a la cresta germinal de la gónada de los machos. Como resultado, los cordones gonadales se hacen aparentes al microscopio estereoscópico, pudiéndose distinguir claramente en esta etapa las hembras de los machos. En el nivel ultraestructural, las células de Sertoli son el primer tipo celular en diferenciarse, identificándose por el desarrollo de retículo endoplásmico

¹⁶ Eibrecht A., and R. G. Smith. 1992. Aromatase Enzyme Activity and Sex Determination in Chickens. *Science* 255, 467-469.

¹⁷ Mittwoch, U. (1989) Sex Differentiation in Mammals and Tempo of Growth. *J. Theor. Biol.*, 137:445-455.

¹⁸ Merchant H. and T. Taketo. (1991) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J. of Elec. and Microsc. Tech.* 19:158-171.

rugoso, lo que podría estar relacionado a la producción de la hormona antimulleriana (AMH). Esta hormona hace que se degenera el conducto de Muller, que en las hembras da lugar al oviducto, útero, cervix y vagina superior. A los 13 dpc se da la diferenciación de las células de Leydig, que son las productoras de testosterona. Esta hormona produce el desarrollo del conducto de Wolf, que en los machos da lugar al epidídimo, vas deferens y vesícula seminal; en las hembras este conducto se degenera por falta de testosterona. A partir de la testosterona se sintetiza la dihidrotestosterona, cuya acción promueve el desarrollo del pene a partir del tubérculo urogenital. En las hembras, los cordones gonadales se fragmentan, cada uno rodeando a una o varias células germinales. En adulto, la célula germinal se convierte en el óvulo y las células que lo rodean en las células de la granulosa o foliculares, productoras de la hormona esteroide estradiol. Las tecas, de origen estromático, sintetizan los andrógenos, que son tomados por las células foliculares y aromatzados a estradiol (figura 3 y esquema).

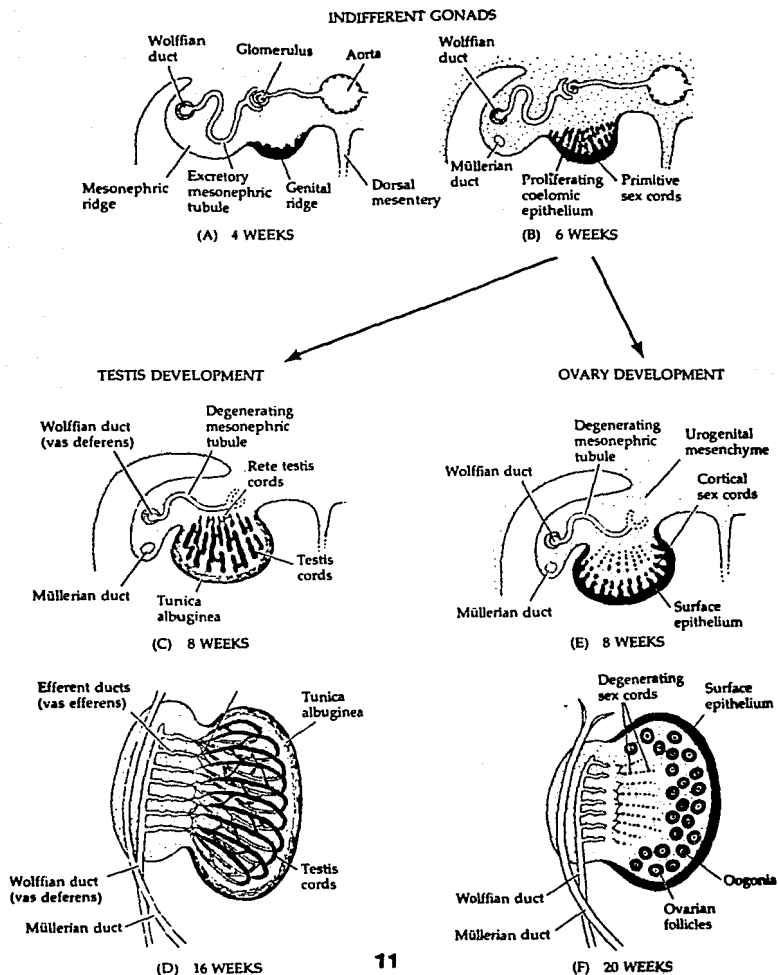
Un modelo que explica los mecanismos de la determinación sexual en mamíferos parte de la idea de que ambas gónadas se desarrollan activamente; es decir que tanto el ovario como el testículo requieren de la dirección de genes para su desarrollo.

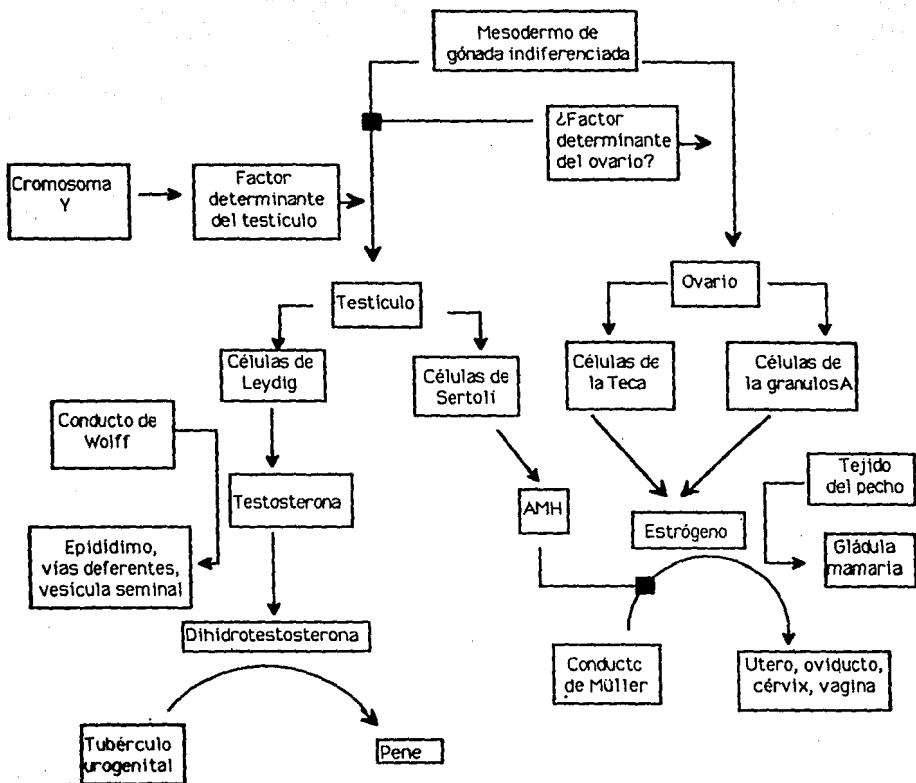
De acuerdo a este modelo, el desarrollo del ovario se iniciaría con el gene hipotético Od. Este actuaría en las células germinales. El Sry actuaría antes del Od, reprimiendo su acción, de forma que al expresarse éste, se desarrollara un testículo. En ausencia del Sry se activaría Od, y se induciría el desarrollo del ovario (¹⁹). Si existe o no un factor determinante del ovario está todavía por probarse. Los individuos en que las gónadas están poco desarrolladas representan un buen sistema para buscar este factor.

¹⁹ Eicher, E. and L.L. Washburn. (1986) Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu. Rev. Genet.* 20, 327-260.

Washburn L.L. and E.M. Eicher. (1983) Sex reversal in XY mice caused by a dominant mutation in chromosome 17. *Nature* 303, 338-340.

Figura 3. Eventos morfológicos de la diferenciación gonadal en mamíferos





Esquema de la secuencia de eventos que da lugar a la formación del fenotipo masculino en mamíferos. Con la presencia del cromosoma Y, la gónada indiferenciada se convierte en testículo. El testículo secreta hormonas que causan la masculinización del cuerpo

ORGANOGENESIS DE LA GONADA *IN VITRO*.

Una de las formas de estudiar los fenómenos que ocurren durante la morfogénesis de diversos órganos es el de provocar una perturbación experimental del órgano y estudiar los fenómenos que ocurren durante la reasociación de los diversos tipos celulares. La reconstrucción de tejidos *in vitro* a partir de suspensiones celulares ha sido ampliamente utilizada como modelo experimental para estudiar los mecanismos que intervienen en el proceso de morfogénesis.

Desde los estudios clásicos realizados con esponjas a principio de siglo, se observó que las células disociadas mantenían la capacidad de reorganizarse en la estructura pluricelular original. Más tarde se observó que células disociadas de embriones de anfibios y aves, logran reorganizar tejidos y estructuras histotípicas similares a las originales.

En el laboratorio del Dr. Merchant se ha desarrollado un método de disociación y reagregación de la gónada (²⁰). Se tienen bien caracterizados a nivel de microscopía electrónica reagregados de gónadas de 12 y 13 dpc. Normalmente el proceso de reagregación toma alrededor de 24 horas (Figura 4). Falta caracterizar los cultivos de gónadas de 11 dpc.

Este sistema ofrece ventajas como la de poder hacer estudios que permiten distinguir entre los procesos de diferenciación celular y los de morfogénesis. También permite la manipulación de la expresión de genes utilizando mRNA antisentido.

²⁰ Escalante-Alcalde D. and H. Merchant (1992) Somatic and Germ Cell Interactions during Histogenetic Aggregation of Mouse Fetal Testes. *Exp. Cell. Res.* 198:150-158.

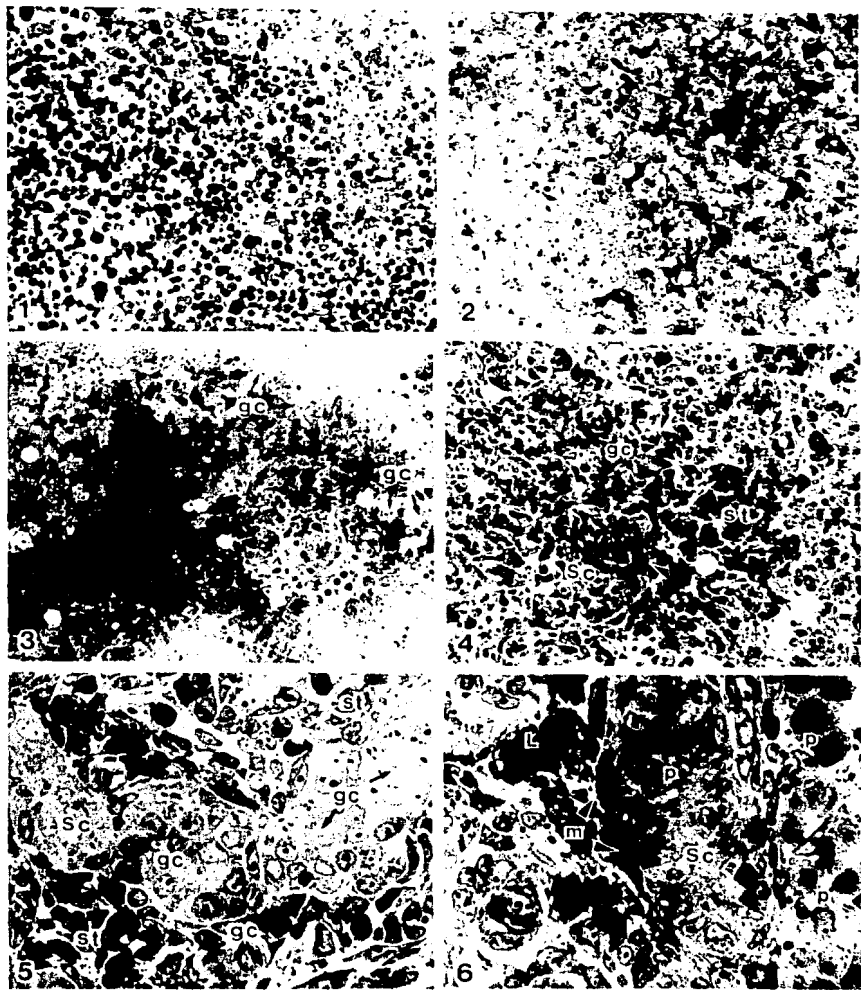


FIGURA 4

Figura 4. Proceso de reagregación de testículos disociados de 12.5 dpc. 1) Células disociadas enzimáticamente (0 horas). 2) A las 3 horas de cultivo se puede observar que las células ya se adhirieron, aunque todavía no hay organización, células germinales (gc) y células somáticas (sm). 3) A las 6 horas se pueden observar grupos compactos de células. 4) A las 12 horas se observan estructuras semejantes a cordones seminíferos (sc), segregadas del tejido estromático (st). 5) A las 24 horas de cultivo los cordones seminíferos son claramente distinguibles (17). 6) Reagregado de testículo de 15.5 dpc cultivado por 24 horas. Un cordón seminífero rodeado por células apianadas tipo mioide. Dentro de las células estromáticas se pueden distinguir algunas células de Leydig (L) (²⁰).

O B J E T I V O

Evidencias obtenidas por el grupo de Lovell-Badge sugieren que el Sry es el gene que induce el desarrollo del testículo. Si bien la represión de su expresión coincide con la formación de los cordones testiculares, aún se desconoce si el Sry está relacionado a la determinación celular de las células de Sertoli y/o, directamente participa en el proceso morfogénico. Para resolver esta incertidumbre, hemos aprovechado la capacidad de las células del primordio gonadal masculino para reorganizarse en estructuras similares a los cordones testiculares in vitro y, determinar si el Sry es requerido durante este proceso morfogénico. Como un marcador molecular del proceso diferenciativo de las células de Sertoli utilizamos la expresión del AMH, proteína característica de estas células. Simultáneamente, los resultados obtenidos permitirán definir a este sistema in vitro, como un modelo para estudiar a nivel molecular el proceso de gonadogénesis en ratón.

MATERIALES Y METODOS

Ratones. En todo el trabajo se usó la cepa CD1.

Reagregados de 11, 12 y 13 días post coito (dpc):
(El día en que se detecta el tapón vaginal se determina como día 0.5)

Materiales:

Medio L-15 (GIBCO).

Medio McCoy 5a modificación con suero bovino fetal al 10%.
Tripsina al 0.25% en Solución de Rinaldini⁽²¹⁾:

Para 100 ml:

0.8 g de NaCl

0.02 g de KCl

0.1 g de Citrato de Sodio

0.005g de NaH₂PO₄.H₂O

0.1 g de NaH₂CO₃

0.1 g de glucosa (o cualquier otra azúcar).

0.25 g de Tripsina (Difco)

Filtros de policarbonatos (Nucleopore, tamaño de poro de 1 μ)

Metodología

- 1) Debido a que a los 11 dpc las gónadas están todavía indiferenciadas, se extraen y se mantienen separadas en medio L-15 (GIBCO) hasta sexarlas por la presencia del corpúsculo de Barr, y una vez realizado esto, se hacen grupos de machos y hembras. (Sexar 30 embriones toma alrededor de dos horas).
- 2) A partir de los 12 dpc los testículos fetales ya son distinguibles de los ovarios por lo que se extraen y se colectan juntas en L-15.
- 3) Una vez extraídas todas las gónadas, se les quita el L-15 y se incuban en la tripsina por 15 minutos a 37°C.
- 4) Se inactiva la enzima el medio McCoy.
- 5) Se lavan las células disociadas 2 veces con McCoy, centrifugándolas a 370g.
- 6) Se resuspenden en medio McCoy y se vuelven a centrifugar en tubos Eppendorf de 400 μ l a 370g por 15 minutos.
- 7) Las pastillas de células (aproximadamente 4-5 gónadas por pastilla) se despegan del fondo del tubo con una pequeña espátula de platino y se recuperan con una pipeta de 200 μ l (Gilson) con el tip cortado diagonalmente.

²¹ Rinaldini, M.L. (1959) *Exp. Cell. Res.* 16, 477-505.

- 8) Se coloca la pastilla sobre un filtro de policarbonatos, y se deja flotando sobre 1.5 ml de medio McCoy, en una caja de petri de 35 mm.
- 9) Se cultivan por varios tiempos a lo largo de 24 horas, a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire. En estas condiciones las pastillas forman discos sólidos de 1 a 2 mm. de diámetro que llamamos reagregados.

Sexado de las gónadas de 11 dpc:

Para sexar las gónadas se usó la tinción de corpúsculos de Barr (éste es uno de los cromosomas X que en las hembras se inactiva durante el desarrollo).

Materiales

Fijador:

metanol:acético 1:1,

ácido acético al 60%.

azul de Toluidina al 1% en agua

- 1) Se fija el amnios en fijador por 10 minutos.
- 2) Se decanta y se le agrega una gota de ácido acético al 60%.
- 3) Con una pipeta Pasteur sellada con fuego se macera ligeramente el amnios en el ácido por un minuto, o se le da vortex por 30 segundos.
- 4) Se le agrega un ml. de fijador.
- 5) Se centrifuga en microfuga a 12,000 rpm por 5 minutos.
- 6) Se retira el sobrenadante y se resuspende en lo que quede en el tubo.
- 7) Se coloca una gota en una laminilla y se deja secar al aire.
- 8) Se le pone una gota de azul de Toluidina al 1% en agua y se le coloca un cubreobjetos.
- 9) Se cuentan al microscopio los corpúsculos de Barr y se considera hembra a las preparaciones en donde más del 80% de los núcleos presenten corpúsculo.

Extracción de RNA:

(Protocolo Final, Extracción de una sola gónada, ver resultados)

Materiales

Cloruro de Litio 3M- Urea 6M

Solución A:

Tiocianato de Guanidina 4M

Citrato de Sodio 25 mM pH 7

Sarcosil 0.5%

β -mercaptoetanol 0.1 M (36 μ l a 5ml de solución)

Los primeros 3 componentes se pueden mezclar y guardar a temperatura ambiente por varias semanas. El β -mercaptoetanol se le

agrega al momento de usarse.

Acetato de sodio 2M, pH 4.

Fenol saturado en agua.

Cloroformo:isoamílico 49:1

TE:

Tris 20mM

EDTA 1mM.

Isopropanol

Etanol 75%

Buffer DNAasa 10X

Acetato de sodio 1M, pH 5.5

Cloruro de Magnesio 100mM.

TBE 10X:

Tris Base 108g

Acido bórico 55g

EDTA 0.5M pH 84ml

Gel de Agarosa-Urea:

Agarosa 0.300 g

Urea 7.2 g

TBE 1X 17 ml

Se corre vertical, buffer TBE 1X.

Metodología:

- 1) Homogenizar el tejido (con vortex) en la solución de LiCl-Urea (para una gónada o un reagregado en 500 μ l).
- 2) Precipitar a -70°C toda la noche.
- 3) Centrifugar a 14,000 rpm. en microfuga por 20 minutos.
- 4) Resuspender en 500 μ l de solución A.
- 5) Añadir 1/10 de volúmen de Acetato de sodio (50 μ l).
- 6) Extraer con un volumen de fenol (500 μ l) y 2/10 de volúmen (100 μ l) de Cloroformo:isoamílico, enfriándolo en hielo por 15 minutos.
- 7) Precipitar con un volúmen de Isopropanol a -20°C, una hora.
- 8) Lavar con Etanol al 75%.
- 9) Secar en el Savant.
- 10) Resuspender en 20 μ l de TE.
- 11) Añadir 2.5 μ l de buffer DNAasa 10X.
- 12) Agregar 1 μ l (40 u) de DNAasa, libre de RNAasa (Boehringer) e Incubar a 37°C por media hora.
- 13) Añadir un 25 μ l de TE y 5 μ l de Acetato de sodio.
- 14) Extraer con 50 μ l de fenol y 10 μ l de Cloroformo:isoamílico y volver a repetir del paso 6 al 9.
- 15) Resuspender en 20 μ l de TE.
- 16) Si se quiere ver el RNA, se corre en un gel de Agarosa-Urea.

Preparación de cDNA a partir de RNA:

Materiales

dNTP 5mM
Oligo dT primer 1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Boehringer)
Transcriptasa Reversa, 200U/ μl (BRL)
Buffer 5X de Transcriptasa Reversa (BRL):
Tris 250 mM (pH 8.3)
KCl 375 mM
MgCl₂ 15 mM
DTT 0.1M (10X, BRL)

Metodología:

- 1) Preparar Solución A: (para una reacción de 30 μl , mezclar):
 - 6.0 μl de Agua
 - 6.0 μl de Buffer 10X
 - 3.0 μl de dNTP
 - 3.0 μl de DTT
 - 1.5 μl de Oligo dT primer
 - 0.5 μl de Transcriptasa Reversa
- 2) Calentar 10 μl de RNA a 65°C, 5 minutos.
- 3) Añadir la mezcla A.
- 4) Incubar a 37°C por una hora.
- 5) Guardar a -20°C.

Amplificación de transcritos por PCR. (Polymerase Chain Reaction)

Materiales:

Pollimerasa Taq, 5U/ μl (Boehringer)
Buffer 10X de Taq (Boehringer):
Tris 100mM, pH 8.3 (20°C)
MgCl₂ 15mM
KCl 500mM
Gelatina 1mg/ml
Buffer 1X de Transcriptasa Reversa (BRL):
Tris 50 mM (pH 8.3)
KCl 75 mM
MgCl₂ 3 mM

dNTP 5mM

Oligonucleótidos para detectar Sry, 0.025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

5' GAG AGC ATG GAG GGC CAT (S1)

3' CCA CTC CTC TGT GAC ACT (S2)

Se obtiene un fragmento de 266 bases.

Oligonucleótidos para detectar HPRT, 0.10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

5' CCT GCT GGA TTA CAT TAA AGC ACT G (H1)

3' GTC AAG GGC ATA TCC AAC AAC AAA C (H2)

Se obtiene un fragmento de 326 bases si proviene del RNA y de 579 bases si proviene del DNA (debido a los intrones)

Oligonucleótidos para detectar Amh, 0.030 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$:

5' TCA CGC GGA TGA CTC CCA CCC (M1)

3' TCC CAG TCG AGC AGG CGT CCC (M2)

Se obtiene un fragmento de 301 bases cuando proviene del RNA, y de 401 bases cuando proviene del DNA.

Stop Mix:

Urea 9M

TBE 1X

Azul de Bromofenol, una pizca.

Gel de Agarosa 3%:

Agarosa 3%

TBE 0.5X

Bromuro de Etidio

Tomar 15 μl de la reacción del PCR y mezclar con 5 μl de Stop Mix.

Correr a 300 V, 20 minutos, en buffer TBE 0.5X, bromuro de etidío.

Metodología:

Mezclar:

Agua: Aforar a 50 μl

Buffer 10X: 5 μl

dNTP: 2 μl

Taq: 0.5 μl

cDNA: 6 μl (si se añade menos cDNA, aforar a 6 μl con buffer de transcriptasa reversa 1X)

y según el transcrito que se desee detectar, los correspondiente oligonucleótidos (añadir por parejas):

426: 1 μl

428: 1 μl

H1: 1 μl

H2: 1 μl

M1: 2 μ l
M2: 2 μ l

Las condiciones finales (tomando en cuenta lo aportado a la reacción de PCR por la reacción de transcriptasa reversa) son las siguientes:
Tris 20mM, pH 8.3 (20°C), KCl 65mM, MgCl₂ 2.1mM, gelatina 0.1 mg/mM, 200mM dNTP.

Los ciclos que se usaron fueron los siguientes:

Para el Sry y HPRT:

Desnaturalización a 91°C, 1'15"
Annealing a 55°C, 1'
Extensión a 72°C, 1'.
30 ciclos

Para el AMH:

Desnaturalización a 95°C, 1' 15"
Annealing a 57°C, 1'
Extensión a 72°C, 1'
30 ciclos.

Para ver el resultado de la amplificación se corre un gel de Agarosa 3%

Purificación de Oligonucleótidos

Materiales:

Acrilamida 40%:

Acrilamida 152g
Bisacrilamida 8g
Aforar con agua a 400ml

Gel Acrilamida 20%-Urea 8M-TBE:

Acrilamida 40% 50ml
Urea 48g
TBE 10X 10ml
Aforar con agua a 100ml

Para 10 ml de Acrilamida:

TEMED 5 μ l
Persulfato de Amonio 10% 25 μ l

Butanol

Etanol 100%

Stop Mix
TE

Metodología:

- 1) Hacer un gel de Acrilamida-Urea-TBE de 1.5mm de espesor con carriles de 1.3 cm en la Tall Mighty Small.
- 2) Preparar la muestra (aproximadamente 10 μ g por carril) con 1 volúmen de muestra por 0.5 volúmenes de Stop Mix.
- 3) Correr el gel a 450 Volts, una hora.
- 4) Cortar la banda de los oligos vistos por "UV Shadowing".
- 5) Eluir en 1 ml de agua toda la noche a 37°C.
- 6) Secar (hasta precipitar) con butanol. (Se le agrega butanol, se da vortex, se centrifuga y se saca la fase de arriba, hasta que se precipite).
- 7) Se lava con etanol 100%, frio.
- 8) Se resuspende en TE.
- 9) Se lee al espectro para cuantificar:
25 μ g=1 OD.

Hibridización de las Amplificaciones por PCR.

Materiales:

Oligonucleótido P1:

TCA GCA AGC AGC TGG GAT GCA GGT GGA AAA GC

Oligonucleótido P2:

TTT TTC GGC TTC TGT AAG GCT TTT CCA CCT GC

Estos nucleótidos son complementarios entre sí en 14 bases de la siguiente forma:

TCA GAC AGC AGC TGG GAT GCA GGT GGA AAA GC

CGT CCA CCT TTT CG GAA TGT CTT CGG CTT TTT

Tienen una secuencia interna a la banda de amplificación del Sry.

Se completan las cadenas con CTP radioactivo y de esta forma se usa como marcador para comprobar que la banda amplificada sí es la adecuada.

Buffer Klenow 5X

Klenow

Mezcla para precipitar:

TE	2ml
DNA de esperma de salmón sonicado (10 mg/ml)	200 μ l
EDTA 500mM	100 μ l
Acetato de amonio 7.5M	1.2ml

Propanol
dCTP p32* 10 μ Cl/ μ l
dCTP 0.5 mM

Buffer NET 20X:
NaCl 3 M
EDTA 20 mM
Tris 0.3 M pH 7.5

Solución de Hibridización
NET 20X 15ml (queda 6X)
SDS 10% 0.5 ml (queda 0.1%)
Denhardt 50X 10ml (queda 10X)
H₂O 24.5

Solución de Lavado:
SSC 6X
Fosfato de sodio monobásico 0.5 g por litro.

Metodología:

Para marcar el "Probe".

1) Mezclar:

P1 (15ng/ μ l)	1 μ l
P2 (15ng/ μ l)	1 μ l
dGAT (5mM)	1 μ l
Buffer Klenow	1 μ l
CTPp*32 (50 μ Cl)	5 μ l
Klenow	1 μ l
H ₂ O	10 μ l

2) Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

3) Agregar 1 μ l de dCTP 0.5 mM, e incubar 5 minutos.

4) Parar la reacción con 1 μ l de EDTA 500mM.

Para medir porcentaje de incorporación:

1) Medir lo que tiene de radioactividad 1 μ l de reacción llevada a 10 μ l con H₂O, en "Countprobe".

2) Mezclar:

Reacción	10 μ l
Mezcla para precipitar	200 μ l
Propanol	400 μ l

- 3) Centrifugar 15 minutos
- 4) Quitar sobrenadante muy bien.
- 5) Repetir el proceso una vez.
- 6) Resuspender en 10 μ l de H₂O.
- 7) Leer en el "Countprobe" cuanto quedó de radioactividad y sacar el porcentaje de incorporación.

Para Hibridizar:

- 1) Correr la muestra en gel de agarosa (Si es DNA total en 0.8% y si es producto de PCR en 3%).
- 2) Transferir a Nylon N+ con NaOH 0.4 M.
- 3) Prehibridizar a 37°C, 4 Horas con Solución de Hibridización, agregando DNA de esperma de salmón a 75 μ g/ml, hervido por 5 minutos.
- 4) Hibridizar a 55°C, con la solución de Hibridización agregando el probe a 10 millones de cuentas por ml, previamente hervido 5 minutos o resuspendido en NaOH 0.4 M. Dejar toda la noche.
- 5) Lavar con solución de lavado, una vez a temperatura ambiente y dos a 55°C.
- 6) Secar al aire y exponer 1 hora sin pantallas a temperatura ambiente.

RESULTADOS

ESTANDARIZACION DEL METODO DE DETECCION DEL Sry.

El grupo de Lovell-Badge reportó la expresión del Sry durante el desarrollo *in vivo* de la gónada (²²). Debido a la muy baja cantidad de mRNA del Sry en gónadas embrionarias fue imposible detectarlo por experimentos tipo Northern, por lo que se usó PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La técnica que nosotros utilizamos está basada en este reporte. Para su estandarización usamos cDNA de RNA extraído de testículo adulto: a esta edad la expresión del Sry es relativamente alta y puede detectarse en un Northern. Los mismos oligonucleótidos (S1 y S2) reportados por Koopman *et al* (²²) son los que usamos para nuestra detección. Estos fueron diseñados contra la región del Sry que tiene homología con las proteínas de alta movilidad y delimitan un fragmento de 257 bases, que no contiene intrones (figura 1)

Debido a que los experimentos de amplificación por PCR se ven afectados por distintos parámetros, para obtener las condiciones finales intentamos: distintas composiciones de buffers de reacción, algunas reportadas en la literatura y otras proporcionadas por las distintas casas comerciales con la enzima Taq polimerasa; distintas concentraciones de nucleótidos, de enzima y de magnesio (siendo este ión crítico para la optimización de la amplificación); distintas temperaturas ya que ésta se define parcialmente por la Tm de los oligonucleótidos pero también influye la velocidad a que ocurren los cambios de temperatura, característica de cada termociclador. El protocolo utilizado finalmente es el descrito en Materiales y Métodos, para el cual fue importante tomar en cuenta la concentración de magnesio proveniente de la reacción de transcriptasa reversa.

Para probar que la banda detectada producida por la reacción de PCR corresponde al fragmento esperado del Sry se sintetizaron dos oligonucleótidos que hibridan contra la región interna del fragmento amplificado. Estos oligos son complementarios entre ellos en 10 bases, de modo que aparean de la siguiente manera:

5'TCAGCAAGCAGCTGGGATGCAGGTGGAAAAGC3'
3'CGACCACCTTTTCGGAATGTCTTCGGCTTTTT5'

De esta forma se puede sintetizar la cadena complementaria, marcándola con algún nucleótido radioactivo; una vez marcado, se puede usar como sonda en hibridaciones tipo Southern de la banda producida por el PCR.

Para determinar las condiciones de hibridación usamos DNA

²² Koopman *et al.* (1990) *opus Ibid.*

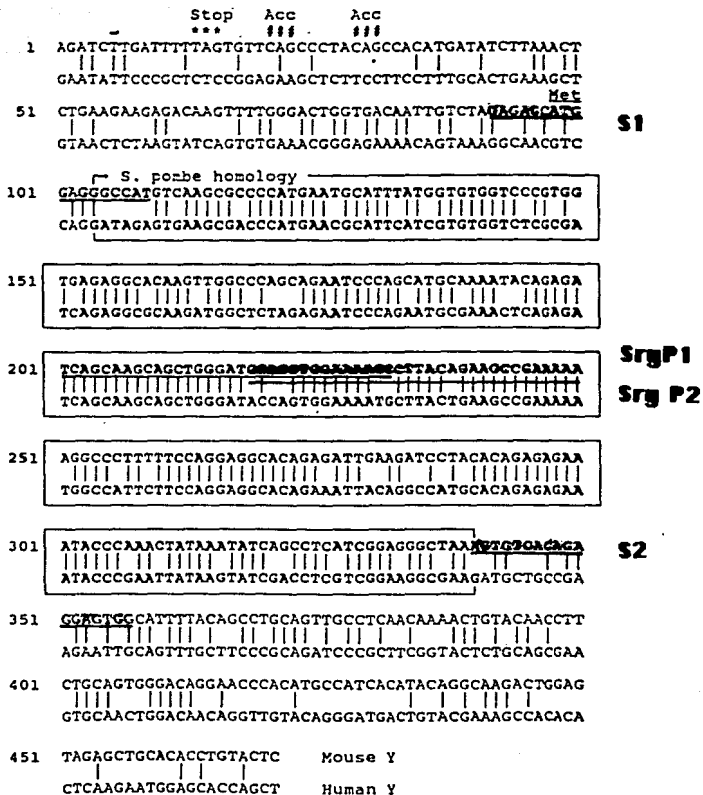


Figura 1. Secuencia parcial de SBV y Sry. La posición de los oligonucleótidos S1 y S2 utilizados para la amplificación del Sry, y de los oligos SrgP1 y SrgP2 usados para la hibridación interna de la banda amplificada. El cuadro marca la región de homología de aminoácidos con el gene Mc de *S. pombe*. Las líneas verticales muestran la homología nucleotídica entre la secuencia del SBV de humano y la de ratón.

genómico. A 55°C observamos la señal del Sry, como se puede ver en el carril A de la figura 2; aunque también aparecieron otras bandas. A mayores temperaturas, la banda correspondiente al Sry se perdió. Curiosamente otra banda de mayor peso molecular se mantuvo, (carriles B y C de la figura 2), a pesar de que se espera que tenga igual o menor homología. Creemos que esta banda se pueda deber a una de las secuencias de la familia del Sry que se encuentran en los cromosomas autosómicos, con muy alta similitud. Dado que hay dos copias de cada cromosoma autosómico por genoma, existe doble número de esta secuencia por lo que su señal pudiera ser mayor (figura 2). Bajo estas condiciones, el producto de la amplificación por PCR hibridizó, lo que comprobó que sí era el producto deseado (figura 3, carriles c y e).

Como control de que el fragmento correspondiente al Sry que detectamos no es producto del DNA cromosomal, amplificamos una reacción de síntesis de cDNA a la que no se le añadió transcriptasa reverse, no obteniendo producto de amplificación, tal como se esperaba (carriles - en la figura 3.)

Para comprobar la especificidad del transcrito detectado, se extrajo RNA de conjuntos de gónadas embrionarias masculinas y femeninas (con el método por precipitación con cloruro de litio), y se hizo cDNA a partir de éstos. El cDNA se amplificó y sólo encontramos el fragmento de amplificación en el cDNA de las gónadas masculinas, aún hibridizando con la sonda interna (figura 3)

La cuantificación de Sry se hizo relativa a la abundancia de HPRT (Hipoxantil- fosforibosil transferasa), un gene constitutivo que se encuentra en el cromosoma X. Para amplificar un fragmento de este gene se usaron los oligonucleótidos H1 y H2 descritos en el mismo reporte por Koopman et.al. (23). Estos delimitan un fragmento de 352 bases, cuando el templado proviene del RNA, y 598 bases cuando proviene del DNA cromosomal. En las reacciones de amplificación se añadieron al mismo tiempo los oligos del Sry y los del HPRT para obtener en la misma reacción los dos productos.

EXTRACCION DE RNA DE UNA SOLA GONADA

Al intentar purificar RNA de una sola gónada hubo que cambiar el protocolo de extracción de RNA, ya que el método con cloruro de litio no fue suficiente para eliminar totalmente el DNA. Hicimos una combinación del protocolo por extracción ácida y la precipitación con cloruro de litio, añadiendo DNasa para mayor seguridad. De esta forma logramos obtener RNA libre de DNA. Esto fue comprobado al someter a una reacción de PCR el RNA sin hacerle cDNA. El protocolo utilizado es el que se reporta en Materiales y Métodos.

²³ Koopman et.al. (1990) opus ibid.

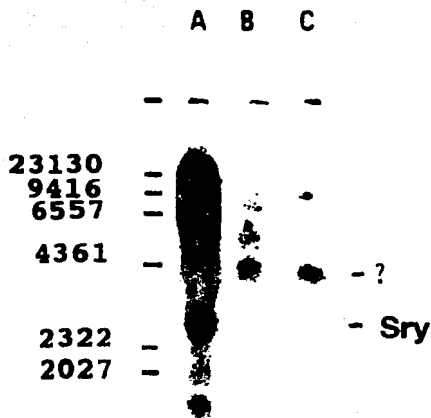


Figura 2.
 Hibridización de
 DNA genómico de
 ratón con la
 sonda interna del
 Sry (SryP1 y SryP2),
 hibridizado y lavado
 a distintas
 temperaturas:
 A. 55°C. B. 60°C.
 C. 65°C.

CULTIVOS DE GONADAS DISGREGADAS

Se utilizaron los cultivos de gónadas disgregadas como modelo de estudio porque nos permite distinguir el proceso de diferenciación celular del de morfogénesis. Haciendo reagregados podemos estudiar la expresión del Sry y la formación de los cordones testiculares durante la reorganización de la gónada y de esta forma establecer si hay alguna conexión entre estos procesos.

Se hicieron reagregados de gónadas masculinas de 11, 12 y 13 dpc., etapas críticas en la diferenciación del testículo, siguiendo el protocolo de Escalante y Merchant⁽²⁴⁾. Las gónadas fueron sexadas por morfología cuando ya eran distinguibles los testículos de los ovarios, o por tinción del corpúsculo de Barr. Cultivamos las gónadas disgregadas por distintos tiempos (0, 3, 6, 12 o 24 horas). A las gónadas recién disgregadas las consideramos el tiempo 0. El estado final de los cultivos se verificó por microscopía de luz en duplicados de los cultivos a los tiempos finales (figura 4).

²⁴ Escalante-Alcalá D. and H. Merchant (1992) opus ibid.

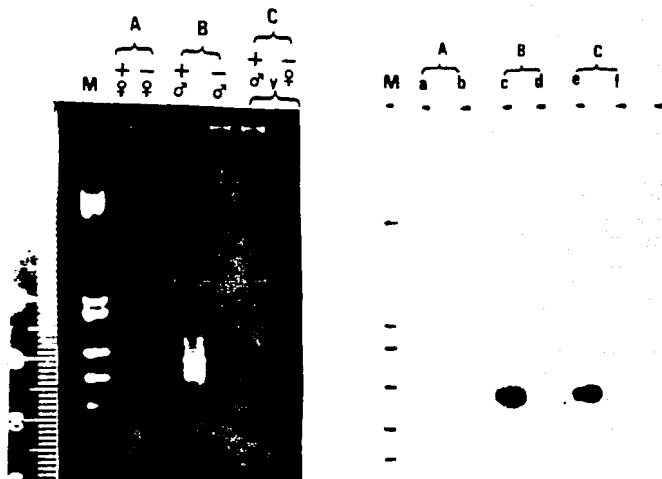


Figura 3. En el lado izquierdo se muestra la amplificación por PCR de cDNA de A) gónadas femeninas de embriones de 12.5 dpc con (+) y sin (-) transcriptasa reversa. B) gónadas masculinas de embriones de 12.5 dpc. con y sin transcriptasa reversa. C) gónadas mezcladas femeninas y masculinas de embriones de 11.5 dpc. con y sin transcriptasa reversa. En el lado derecho se muestra la misma amplificación hibridizada con la sonda interna del Sry, una hora a -70°C . a-f: los mismos carriles que en el lado izquierdo. M: PBR 326 digerido con HINF1 (1581, 517, 410, 396, 298, 221, 154 pb).

EXPRESION DEL Sry y AMH EN LOS REAGREGADOS:

A los reagregados cultivados por distintos tiempos les extrajimos el RNA. Este fue puesto en una reacción para hacer cDNA y una fracción de esta reacción fue amplificada por PCR, para detectar la expresión del Sry o del AMH. Para la detección del Sry se añadieron los oligos de Sry y los de HPRT. Hicimos dos tipos de cultivos de 11.5 dpc: de gónadas femeninas y masculinas mezcladas o de gónadas masculinas exclusivamente, sexadas por tinción del corpúsculo de Barr. No se formaron cordones en ninguno de los dos cultivos. En ambos, se detectó Sry al tiempo 0 (figura 5, A y B, carriles 0) y su expresión disminuye durante el cultivo, desapareciendo mas rápido en los cultivos de gónadas masculinas (figura 5, A y B). Por otro lado, en los cultivos de gónadas de 12.5 y 13.5 dpc., que sí forman cordones, no se detectó expresión del Sry en ninguno de los tiempos (figura 5, C). Ya que la disgregación destruye los cordones testiculares y estos se vuelven a formar sin que el Sry se exprese, parecería que expresión del Sry no es directamente necesaria para la formación de cordones testiculares.

En los mismos reagregados se buscó la expresión de AMH como marcador de la diferenciación de las células de Sertoli. Para la detección del AMH se diseñaron oligonucleótidos contra la región entre el cuarto y quinto exón de su gene. Estos delimitan un fragmento de 302 bases en el mRNA y de 402 bases en el DNA genómico (figura 6). Como su temperatura de apareamiento es similar a la de los oligonucleótidos del HPRT, decidimos probar las mismas condiciones utilizadas en la amplificación del Sry: al no obtener amplificación específica, aumentamos la temperatura de apareamiento, quedando las condiciones como se reportan en Materiales y Métodos.

Encontramos expresión de mRNA de AMH en los reagregados de 11.5 dpc. de gónadas masculinas y femeninas mezcladas desde el tiempo 0 hasta las 24 horas (figura 7, B 11.5 dpc). Sin embargo en los reagregados de gónadas exclusivamente masculinas, la expresión desaparece antes de las 12 horas (figura 7, A). En los reagregados de 12.5 y 13.5 dpc. encontramos expresión en todos los tiempos (figura 7, B 12.5 y 13.5 dpc). Estos resultados sugieren que la pérdida de los contactos celulares no modifican la diferenciación bioquímica de las células de Sertoli o que el mRNA de AMH es de vida media muy larga.



Figura 4.
Reagregado
de un
cultivo
de
gónadas
de 12 dpc.
después de
24 horas de
cultivo. Se
observan
claramente
los cordones
testiculares
(C).

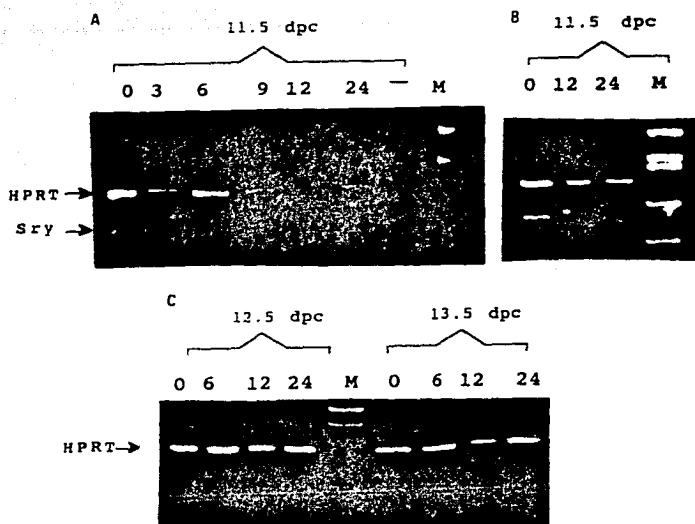


Figura 5. Amplificación de la expresión del Sry en reagregados de distintos tiempos de gónadas de A: ♀ y ♂ mezclados; B: sólo ♂; C: sólo ♀. M: marcador de peso molecular pBR 326 digerido con HinfI (de la banda de abajo a la de arriba 221, 298, 396, 410, 517).

ccagctccttggagggtttctattgtcctgcttggagcctattaacagcctccccctgtctccctgtctgctgtatttggtagtggggggggatga 100
 atactcgtctgtctccttggagcttggctcctgggagctctccagcttggctcctcccaagctcctcccaagcagcctcccaagcagcctccagctcga 200
 gttatgggcccagctcttggagacagaaagccctttgagcagctgctccccctctgtggacatgaaaagtctggcagctgtccccaggctcacttt 300
 ggtttgtagtgggggctcccccccagcagcaatctggctcagcctacatctaaagcaggaccaccggagccttctgtctaccacatTCAGCGGGCCACA 400
 CCTCTCTCCACTGGTACTGCTGCTACGGACTATGGGGCTGTGTITACAGCCTGAGCGGTGTAAAACCTGGCCACCAATACCAGGGGGCTCATCTTCCT 500
 L S P L V L W F L L A T M G A V L Q P E A V E N L A T N T R G L L I F L
 GAAGATGAGCTGTGGCCCCAGCAGCCGCCCTGAACCTTGTCCCTGGTACAGTGAAGGAGAGGGGAGACAAACAGCAGACTTCCTCGAGGGTGGTG 600
 E D E L W P F S S P P E P L C L V Y V R G E G N T S R A S O L T R L R V V G
 GGGCTGAACAGCTATGATGCTTCTCGAGAGCTCCAGGAGTCTCGCTGGGACCCCAAGAGCTGGCCACTCTGGAGTCTCCAGCAGTGAATC 700
 G L N S W Y E Y A F L E A V Q E S R W G P Q D L A T F G V S S T D S
 CCAGGCTACCTCGCTGCCCTGCAGCGCTTGGGGCTGGTATGGGGAGACTGGAGACAGCAGTGTCTAGTCTACATCTGGTGAAGTgaegtggag 800
 Q A T L P A L Q R L G A W L G E T G E Q Q L L V L L H L A E V
 actctctccagccctatgacttggagcttgaagttagttagggcagagccttgggggaggggggagttggggggaggggggagcttggagttgctaggcc 900
 gaaccttatacacttccaggaactgttagtggcagagtgagagccaccaccctaatgatacacccttccagacagactgacagcagagctgtgtgtct 1000
 tcaagcagggttcccacactttgtagcagggatccccctcagctacatggccccagagatctccagtgaaagctcagtaggggaatttctgtaggac 1100
 agactttaggggactgaagcttaagcctccagcctcagcctcagtcaggaatattgccccagTGATATGGGAGCCGGAGCTCTTCTGTAAGTTCCAAGAGC 1200
 I W E P E L L L K F Q E P
 CTCACCTGGGGAGCCAGCCGTGGGAGCAGCCGCTGTATGCTATACTCTGGACCAGGGCCCAAGCTCAGACTCAGAGGACTGGACTGGGGGAC 1300
 P F G A S R W E Q A L L V L Y S G F G P G V T G A T T G G T G G G
 ACAGtagaccagagactggcattggccctccccctaacaccctctctggttgggttggcctaatggagggtttggtgggttggaggtacacattgggag 1400
 Q
 ctattccccagtaggcagggttggctgctgtagccttaccctctccccagctctgctgacaaagctccctgtgtccacagAACCTCTGCCCTACTCGG 1500
 N L C P T R D
 ACACCCGCTATTGGTGTACTAACCTGGACTTCCACCCGGGGCTGGAGCGGCTTCGGGCTCATGTTAACCTTCAACCAAGCAGGAGAAgtaggtcttg 1600
 T R Y L V L T V D F P A G A W S G F G L I L T L Q P S R E G
 agcaggggggggggcagagttggaggagctgaccttaaccacccctccagcagcagctgcccaccctctacagTGCCACCCCTGAGCATGATCAG 1700
 A T L S I D Q
 CTGCAAGCCTTGTATTGGCTGTGATTCGGCTGTTTACGGGGTGAAGTCCCACTTGGTGGTGTGGCACCGCCGGAGCCGTCAAGCCAGCCAGCAC 1800
 L Q A L F G S D S R C P T R M Y P T L V L W P P A E P S P Q P A H
 ACCGCAAGCTGGACCACTGCTTTCCCGCAGCCTGGtgctgcacagggatggaggaggaactggagcgtttggaggggggaggttggctccaccatgacctc 1900
 G Q L D T H F F P Q P G
 ttgtactcagagctggccacccttctcttattccagACTGTCCCTGGAGCCTGAGCGCCTGCACACAGCCGGCAGCCCTTCTTAGAGACCCCTCACTGC 2000
 L S L E P E A L P H S A D P F L E T L T R
 TTGGTGGTGTCTGGGGACCTCTGACCCAGGCTTGCAGACCCCACTGGCCCTGGACCTGGAGTGGCTGGCCCTGCCACCTCCACAGGGCCCTGGTCAACC 2100
 L V R A L R G L P T Q A S N T Q A L D P G A L D P G A L A S F P Q G L V N L
 TGTCAGACCCCGCAGCAGCTGGACGCTTCTGCACTGGAGGAAACCCCTATTACTGCTGCTGTACCACCTCGCGCCACGGAGGGGAACTATCCGGCT 2200
 S D P A A L G R L L D W E E P L L L L S P T A A T E R E P I R L
 GCACGGCCCGGCTTCTGCTCGTGGCAGCGGGCCCTGCAGCGAGGGTGGCACTGGAGTGGAGTGGAGGGGACCTTCASAGTGGGGGACCTCCGGGCTG 2300
 H G P A S A P W A A G L Q R R V A V E L Q A A S E L R D L P G L
 CCACCCAGCTCCCGGCTGCTGGCGGCTTCTGCAAGGCTTGTCCCAACGACTCCCGCAGCTCCGGGACCCGCTCGCGCGGCTGCTGCTGCTAAAGG 2400
 P P T A P P L L A R L L A L C P N D S R S S G D P L R A L L L L K A
 CGCTGCAGGGCTTACGTGGGAGTGGCATGGCGGGAGGGGCTGGGAGAAACCGGGCCAGCGCCGGGACAAGGGCAAGACGGGCTTGGCGGCTGG 2500
 L Q G L R A E W H G R E G R G R T R A Q R G D K Q D G P C A L R
 CGAGCTGAGTGTAGATTCGCGCGGGAGCGGCTTCAAGTGTGATCCGGAGACTTCCAAACCAACACTGCCAGCGGCTCGCGGCTGGCCGAGTCTGAC 2600
 E L S V D L R A E R S V L I P E T Y Q A G N C C Q G A C R W P Q S D
 CGTAAATCCGGCTACCGAAACCAGCTGGTGTCTGCTGCTAAAAATGCAGGCTCCCGGGGCTCGCCTGGCGGCTCGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 2700
 R N P R Y G N H V V L L L L H Q A R G A A L G R L P C V P T A Y A
 CGGCAAGCTGCTCATAAGCTTCCGAGGAGCCCATCAGCGGAGCAGCTTCCCAACATGTAGTCCAGCGAGTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCTGGCGGCT 2800
 G K L I S L S E E R I S A D H V P M H V A T E C G C R *
 ctccggcctccccccccccccccagctcagcctcctantggagctcagcaaacactcaaaaaaa 2870

M1

M2

Figura 6. Posición de los oligonucleótidos M1 y M2, para la amplificación del AMH. Las mayúsculas corresponden a los exones y las minúsculas a los intrones.

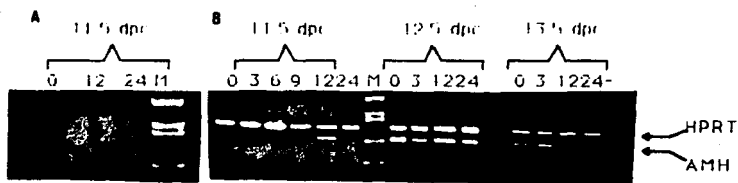


Figura 7. Amplificación de la expresión de AMH en los reagregados de distintos tiempos de gónadas de A: ♀ y ♂ mezclados; B: sólo ♂; y C: sólo ♂. -; Control sin RNA. M; marcador de peso molecular PBR 326 digerido con HINF1.

DISCUSION

Dado que la inactivación coincide con la formación de los cordones testiculares, ¿existe alguna conexión entre el proceso de morfogénesis y la expresión del Sry?, ¿podría ser ésta una señal para su inactivación? De ser así, esperaríamos reactivación de la expresión del Sry al disgregar los cordones de gónadas de 12.5 y 13.5 dpc. sin apagarse en los reagregados de gónadas de 11.5 dpc., sino hasta formarse los cordones testiculares en el cultivo. Encontramos en cambio que la expresión del Sry no se reactivó al disgregar los cordones de las gónadas de 12.5 y 13.5 dpc. y que ésta fue apagada antes de la formación de cordones testiculares en los reagregados de gónadas de 11.5 dpc. Esto nos permite sugerir que el Sry determina las células como masculinas, pero su presencia no es directamente necesaria para la formación de los cordones testiculares. Además, que la formación de cordones testiculares no es una señal para la inactivación del Sry porque se apaga antes de que éstos se formen en los cultivos de 11.5 dpc.

La expresión de AMH a los 11.5 dpc. en el tiempo 0, pudiera reflejar el estado basal de una gónada intacta de esta edad. Münsterberg, *et. al.* (25) reporta el patrón de expresión de AMH, obtenida por hibridación in situ, y encuentra una alta expresión a los 12.5 dpc, pero ninguna a los 11.5 dpc. Nosotros pudiéramos estar detectando el inicio de la expresión del mRNA de AMH por la mayor sensibilidad de la metodología de PCR; sin embargo, no podemos descartar que esta diferencia sea debida a diferencias intrínsecas entre las cepas usadas (Parkes vs. CD1), o, a la edad precisa a la que se tomaron los embriones. Es interesante que exista expresión de AMH a los 11.5 dpc., cuando todavía no se han formado cordones testiculares, sugiriendo que la diferenciación molecular de las células de Sertoli es independiente y anterior a la morfogénesis de los cordones testiculares. La detección de AMH en cultivos primarios de células de crestas gonadales de embriones de 10.5 dpc. serviría para aclarar si las células de Sertoli se diferencian independientemente de la morfogénesis. El hecho de haber encontrado expresión de AMH en los reagregados de gónadas de 12.5 y 13.5 dpc. sugiere que la diferenciación de las células de Sertoli no está siendo afectada en los reagregados.

Los reagregados 12.5 y 13.5 dpc se encuentran muy bien caracterizados morfológicamente (26); a este nivel, falta caracterizar los de 11.5 dpc. ¿Son éstos un buen sistema de estudio in vitro? ¿Reproducen los procesos moleculares que se observan in vivo? Entre los dos tipos de reagregados de 11.5 dpc. que realizamos en este trabajo, hubo una

²⁵ Münsterberg A. and R. Lovell-Badge. (1991) Expression of the anti-Müllerian Hormone Gene Suggests a Role in Both Male and Female Sexual Differentiation. *Development* 113:613-624.

²⁶ Escalante-Alcalde D. and Merchant-Larios H. (1992) opus ibid.

pequeña diferencia en cuanto a la velocidad de inactivación de la expresión del Sry, y la del AMH. Los cultivos con gónadas mezcladas de hembras y machos reprimen al Sry hasta las 24 horas mientras que la expresión de AMH no se reprime. Sin embargo, en los cultivos de exclusivamente machos, las actividades tanto de Sry como de AMH se reprimen antes de las 12 horas. Esta diferencia pudiera deberse a la presencia de células femeninas, aunque se tiene que tomar en cuenta que el tiempo que toma sexar los embriones pudiera dañar las células, especialmente las de Sertoli. Falta caracterizar mas a fondo estos reagregados para saber si con mas tiempo de cultivo logran aparecer cordones testiculares.

Se ha propuesto que el Sry es producido por las células de Sertoli basados en que no puede ser producido por las células germinales porque aún en ausencia de éstas, el testículo se desarrolla ⁽²⁷⁾ y en la observación por Burgoyne de ratones quiméricos XX/XY, en donde las células de Sertoli eran exclusivamente XY ⁽²⁸⁾. Sin embargo falta evidencia directa que pruebe que realmente la expresión del Sry está en este tipo celular, ya que las hibridizaciones in situ hasta ahora realizadas no han sido de suficiente resolución como para aclarar este punto. Por otro lado, recientemente dos grupos ⁽²⁹⁾ (uno de ellos el mismo Burgoyne) reportaron que en quimeras XX/XY, las células de Sertoli pueden ser tanto XX como XY, aunque no se ha determinado si la producción de AMH se da en ambos tipos de células. Como ya se mencionó en la introducción, la producción de AMH por las células de Sertoli es fundamental para el futuro desarrollo del tracto genital masculino, ya que de ella depende la degeneración de los conductos femeninos (conductos de Müller). Existe el caso de los "freemartins" ⁽³⁰⁾, hembras bovinas unidas in utero a gemelos macho, que se masculinizan al parecer por el paso de AMH de su gemelo macho a través del torrente sanguíneo ⁽³¹⁾. Se ha postulado que el Sry pudiera ser la señal para la diferenciación de las células de Sertoli y/o el

²⁷ Merchant H. (1975). opus ibid .

²⁸ Burgoyne, P.S. et al. (1988). Cell-autonomous action of the testis determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX/XY chimaeric mouse testes. *Development* 102, 443-450.

²⁹ Patek C.E. et al. (1991). Sex chimaerism, fertility and sex determination in the mouse. *Development* 113, 311-325.

Palmer S.J. and P.S. Burgoyne (1991). In situ analysis of fetal, prepuberal and adult XX/XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. *Development* 112, 265-268.

³⁰ Jost, A., Perchellet, J. P., Preplin, J. and Viglier, B. (1975). The prenatal development of bovine freemartins. In *Symposium on Intersexuality* (ed. R. Reinborn), pp. 392-406. Berlin: Springer-Verlag.

³¹ Viglier, B., Watrin, F., Magre, S., Tran, D. and Jossio, N. (1987). Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* 100, 43-55.

activador directo de AMH ⁽³²⁾. Para que éste funcionara como el tal, se esperaría que las células de Sertoli XX de los ratones quiméricos antes mencionados, no expresen AMH, sugiriendo que la actividad de Sry se mantiene en sus células productoras, es decir, las células de Sertoli XY. Si, por el contrario, se encontrara que las células de Sertoli XX de los ratones quiméricos son productoras de AMH, la activación de AMH por Sry tendría que ser mediante un mecanismo indirecto; en este último caso la expresión de Sry pudiera estar en tipos celulares distintos a los de Sertoli. Hibridizaciones *in situ* del Sry con mas resolución pudieran establecer en que tipo celular se da la expresión de este gene.

Recientemente se reportó que la proteína codificada por el gene SRY/Sry contiene una "caja consenso" de las proteínas del grupo de alta movilidad (GAM) semejante a la que presenta la proteína TCF-1 (proteína específica de las células T), la cual reconoce específicamente la secuencia AACAAAG. Se observó que una proteína recombinante que contiene el GAM del SRY es también capaz de unirse a esta misma secuencia. Adicionalmente, en mujeres XY se encontraron mutaciones puntuales en la región de la caja de GAM, lo que al parecer evita la unión a la secuencia mencionada. Estas evidencias sugieren que la interacción entre la proteína SRY y la secuencia regulatoria AACAAAG se requiere para el desarrollo del testículo ⁽³³⁾. Si el Sry es un regulador directo del AMH, sería interesante buscar esta secuencia en la región de control de este gene. Un experimento interesante sería agregar a cultivos de gónadas oligonucleótidos que se aparean a los mensajeros del Sry para bloquear su expresión y observar si esto afecta la expresión de AMH. De esta forma se obtendrían evidencias sobre si el Sry regula al AMH.

¿Cómo se activa el Sry? Hasta el momento no tenemos ninguna respuesta a esta pregunta. Se ha encontrado que en la región 5' del gene del Sry se encuentra una caja GAM igual a la reconocida por la proteína Sry ⁽³⁴⁾. Tal vez el Sry se autoregula o su regulación dependa de proteínas de este mismo grupo. Habrá que buscar otras secuencias consenso de factores de transcripción para tratar de inferir los factores involucrados en la activación de este gene, e identificarlos, por ejemplo, mediante geles de retardamiento.

En cascadas de regulación mejor conocidas, como la de la determinación sexual en *Drosophila* o *C. elegans*, se sabe bien la forma en que estos genes interactúan entre sí. Sin embargo todavía se desconoce como es que éstos actúan para determinar la forma de las células, la organización de un órgano, la fisiología y el comportamiento de un organismo. Faltan conocer muchas piezas del rompecabezas y no sólo su lugar en las cascadas de regulación, sino también la función de cada una

³² Behringer, R. R., Cate, R. L., Froelick, G. J., Palmiter R. D. and Brinster, R. L. (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing Müllerian inhibiting substance. *Nature* 345, 167-170.

³³ Harley, V. R. *et al.* (1992) *opus ibid.*

de las piezas. Será muy interesante conocer la función del Sry, ya que parece ser un gene sumamente importante para la conservación de muchas especies.

CONCLUSIONES

- 1) Se detectó mRNA de Sry en reagregados de 11.5, desapareciendo su expresión aún sin la formación de cordones testiculares, sugiriendo que la formación de estos cordones no es señal para su inactivación.
- 2) En reagregados de 12.5 y 13.5 dpc. no se detectó expresión de Sry indicando que la morfogénesis in vitro es independiente de su expresión.
- 3) Se encontró expresión de AMH a los 11.5 dpc, en contraste con la detección a los 12.5 dpc por hibridización in situ reportada anteriormente. Este resultado sugiere que la diferenciación de las células de Sertoli es independiente y anterior a la morfogénesis.
- 4) Se detectó expresión de AMH en reagregados de 12.5 y 13.5 dpc., lo que apoya que la disgregación de las gónadas no afecta el estado diferenciado de las células de Sertoli.