



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MODELO BOOLEANO DEL DESARROLLO DE LA GÓNADA EN HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OSIRIS YURIKO RÍOS VARGAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MARZO, 2018.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MODELO BOOLEANO DEL DESARROLLO DE LA GÓNADA EN HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OSIRIS YURIKO RÍOS VARGAS

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. HORACIO MERCHANT LARIOS
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D.F. MARZO, 2018.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de enero del 2018, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **RÍOS VARGAS OSIRIS YURIKO** con número de cuenta **09528585-0** con la tesis titulada "**MODELO BOOLEANO DEL DESARROLLO DE LA GÓNADA EN HUMANO**", realizada bajo la dirección de la **DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**:

Presidente: DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
Vocal: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
Secretario: DR. LUIS ANTONIO MÉNDOZA SIERRA
Suplente: DRA. LEDA CAROLINA TORRES MALDONADO
Suplente: DR. HORACIO MERCHANT LARIOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 27 de febrero del 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por el apoyo recibido para continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT por la beca que otorgó con el número de CVU: 173000.

Al apoyo financiero por la modalidad B Recursos Fiscales del Instituto Nacional de Pediatría con número de registro 057/2014, como parte del protocolo de investigación titulado: Generación y validación *in vitro* e *in vivo* de un modelo dinámico de la red de regulación del desarrollo de la gónada en el humano, a cargo de la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado.

Agradezco a la Dra. Sara Frías Vázquez, tutora principal, por todo el apoyo recibido y por sus valiosos comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Luis Antonio Mendoza Sierra, miembro del comité tutor por la asesoría y comentarios recibidos durante todo el proyecto y en especial durante la elaboración del artículo.

Al Dr. Horacio Merchant Larios, miembro del comité tutor por sus comentarios y por todas las facilidades que recibí en su laboratorio para disecar gónadas de ratones y hacer ensayos de inmunofluorescencia.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezco a la Dra. Leda Carolina Torres Maldonado, Instituto Nacional de Pediatría, por su destacada participación a lo largo del proyecto.

Agradezco al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valencia, por el apoyo en la disección de gónadas de embriones de ratón y por el apoyo recibido en la elaboración de los ensayos de inmunofluorescencia.

Al M. en C. Pedro Cuauhtémoc Tonatiuh Collazo Saldaña por el apoyo recibido en la elaboración de los ensayos de inmunofluorescencia.

Agradezco al MVZ. Ramón García Cortés y a todo el personal del Bioterio del Instituto Nacional de Pediatría, por el apoyo recibido durante la fase experimental del proyecto.

Un agradecimiento especial a todos los ratones que participaron en este proyecto por brindar una luz al conocimiento. Su muerte significó su trascendencia.

Agradezco a todos los compañeros del Laboratorio de Biología Computacional por los comentarios recibidos durante la elaboración del modelo.

Gracias a todos los compañeros del Laboratorio de Citogenética, Instituto Nacional de Pediatría, por los comentarios recibidos durante la elaboración del proyecto.

También agradezco a todos los compañeros del Laboratorio del Dr. Horacio Merchant por los comentarios recibidos al presentar este proyecto.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi papá Marcos Ríos Trejo y mi mamá Guadalupe Vargas Marín por la confianza, paciencia y amor que han tenido durante todos estos años.

A mis hermanos Damián y Rodrigo. Espero que siempre estén llenos de motivación para alcanzar las metas que se propongan.

INDICE

Resumen

Abstract

1. Introducción	1
1.1 El desarrollo del sexo gonadal en mamíferos	1
1.1.1 Generalidades	1
1.1.2 Capacidad bipotencial de células somáticas del primordio gonadal	2
1.1.3 La señal de determinación de la vía masculina	5
1.1.4 El inicio de la vía femenina y patrones de expresión dimórficos	6
1.1.5 Alteraciones en el desarrollo del sexo (ADS)	11
1.2. Biología de sistemas como estrategia para entender los estados dinámicos en redes de regulación génica	19
1.2.1 Métodos desarrollados para modelar redes de regulación génica.....	20
1.2.2 Modelos Booleanos aplicados al desarrollo.....	21
2. Justificación	22
3. Objetivo general	22
3.1 Objetivos particulares	22
4. Materiales y Métodos	23
4.1 Diseño experimental	23
4.2 Materiales y métodos para elaborar el modelo Booleano del desarrollo de la gónada	24
4.2.1 Búsqueda de información e identificación de Interacciones	24
4.2.2 Esquematización del conjunto de interacciones identificadas a través de la revisión de artículos.....	24
4.2.3 Elaboración del conjunto de reglas lógicas para el Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada	24
5. Resultados de la sección de Biología de Sistemas	26
5.1 Búsqueda de información e identificación de interacciones	26
5.2 Esquema de la red de determinación del sexo y diferenciación hacia Sertoli o granulosa	28
5.3 Reglas lógicas del modelo Booleano	30
5.4 Resultados de la simulación del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada	31
5.4.1 Comportamiento dinámico de la red	31
5.4.2 Simulación de perturbaciones: ganancia o pérdida de función de los nodos de la red, ADS 46,XX (reversión del sexo femenino a masculino)	33
5.4.3 ADS 46,XY (reversión del sexo masculino a femenino).....	34
5.4.4 Simulación de pérdida de función de GATA4.....	35
5.4.5 Simulación de pérdida de función de WT1 o NR5A1	35
5.5 Redes aleatorias, pruebas de robustez y predicciones del modelo	36
6. Validación experimental de una predicción del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada	38
6.1 Validación de la unión de GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes <i>Wt1</i> , <i>Amh</i> , <i>Lrp4</i> , <i>Sp5</i> y <i>Spr2d</i>	38
6.2 Confirmación de la secuencia motivo [AT]GATA[AG] que reconoce GATA4	39
6.3 Especímenes para la validación experimental	40
6.4 Disección y preparación de gónadas de embriones de ratón E13.5 dpc, para ensayos ChIP	41

6.5 Fragmentación de la cromatina	41
6.6 Ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)	42
6.7 Diseño de oligonucleótidos utilizados para flanquear secuencias específicas de DNA donde está presente la interacción de GATA4 con los blancos de interés.....	43
6.8 Ensayos de inmunofluorescencia dirigidos a GATA4	44
7. Resultados de la validación experimental	46
7.1 Resultados del análisis bioinformático	46
7.2 Perfiles ChIP-seq para GATA4 en hígado de ratón adulto.....	49
7.3 Ensayos de inmunofluorescencia dirigidos a GATA4	50
7.4 Resultados de los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina.....	54
7.4.1 Sonicación de cromatina.....	54
7.4.2 Control positivo del ensayo ChIP con anticuerpo anti-RNA pol II y anticuerpo anti-GATA4 para testículos y ovarios de ratón 13.5 dpc	54
7.4.3 Validación de la predicción del modelo Booleano: GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción de <i>Wt1</i> en cromatina de testículo, pero no en cromatina de ovario de embriones de ratón 13.5 dpc	56
7.4.4 GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Amh</i> en cromatina de testículo	57
7.4.5 GATA4 no se une a la secuencia [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Lrp4</i> , en cromatina de testículos y ovarios de embriones de ratón 13.5 dpc.....	58
7.4.6 GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Sp5</i> en cromatina de ovario.....	59
7.4.7 GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Sprr2d</i> en cromatina de ovario.....	60
7.4.8 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para <i>Gapdh</i> en tejido hepático de embriones 13.5 dpc	61
7.4.9 Validación de otras interacciones: GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Sp5</i> en cromatina de tejido hepático.....	62
7.4.10 Validación de otras interacciones: GATA4 no se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Lrp4</i> en cromatina de tejido hepático	63
8. Discusión	64
8.1 Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada	64
8.2 Modelos computacionales alternos.....	65
8.3 Discusión del modelo de Sánchez y Chaouiya (2016)	67
8.3.1 Comentarios sobre el modelo de Sánchez y Chaouiya (2016)	68
9. Discusión de la validación experimental	70
9.1 Ensayos de inmunofluorescencia: El papel de GATA4 en el desarrollo de gónadas.....	70
9.2 Análisis bioinformático y validación experimental de la inferencia del modelo Booleano	71
9.3 El papel de GATA4 en otros genes asociados a vía ovárica/testicular	72
9.4 Relación de GATA4 con SOX9 y DMRT1	74
10. Integración de los resultados del modelo booleano y los resultados experimentales	76
11. Conclusiones	78
12. Perspectivas	79
13. Bibliografía	80
14. Apéndice	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes que se expresan durante el desarrollo de la gónada.....	10
Tabla 2. Alteraciones del Desarrollo Sexual (ADS) en pacientes 46,XY	16
Tabla 3. Alteraciones del Desarrollo Sexual (ADS), en pacientes 46,XX.....	17
Tabla 4. Revisión bibliográfica de interacciones para elaborar el Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada	26
Tabla 5. Reglas lógicas del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada.....	30
Tabla 6. Atractores de punto fijo correspondientes a la determinación del sexo y diferenciación hacia células de Sertoli o granulosa.....	32
Tabla 7. Atractores de punto fijo cuando se simula inactivación (0) de los nodos NR5A1 o WT1 en un genotipo 46,XY	36
Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos usados para validar unión de GATA4.....	44
Tabla 9. Condiciones de PCR de punto final para amplificar CHIP-DNA de gónadas e hígado de embriones 13.5dpc.....	44
Tabla 10. Resumen de motivos de DNA encontrados por análisis bioinformático	46
Tabla 11. Localización de los motivos de DNA que reconocen GATA4, SOX9 y DMRT1	47
Tabla 12. Localización de secuencias motivo de DNA en la región promotora proximal	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la red de determinación del sexo.....	29
Figura 2. Transiciones hacia el atractor de punto fijo que corresponde a células pre-Sertoli y pre-granulosa	32
Figura 3. Simulación ADS 46,XX (reversión del sexo de femenino a masculino).....	33
Figura 4. Simulación ADS 46,XY (reversión del sexo masculino a femenino).....	34
Figura 5. Simulación de pérdida de función de GATA4 en genotipo 46,XY.....	35
Figura 6. Señal de enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo GATA4 C-20 (Santa Cruz) y secuenciados (perfil ChIP-seq <i>Gapdh</i>)	49
Figura 7. Señal de enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo GATA4 C-20 (Santa Cruz) y secuenciados (perfil ChIP-seq <i>Sp5</i>).....	49
Figura 8. Señal de enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo GATA4 C-20 (Santa Cruz) y secuenciados (perfil ChIP-seq <i>Lrp4</i>).....	50

Figura 9. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas que convergen y proliferan en las crestas genitales de embriones de ratón (XY) a los 10.5 dpc.....	51
Figura 10. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas que convergen y proliferan en las crestas genitales de embriones de ratón (XX) a los 10.5 dpc.....	52
Figura 11. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas de ovario de ratón de 13.5 dpc y ovario de 10 días post parto.....	52
Figura 12. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas de testículo de ratón de 13.5 dpc y testículo de 10 días post parto.....	53
Figura 13. Cromatina fragmentada en un rango de 200 a 700pb, con un pico en 400pb.....	54
Figura 14. Fragmento de ChIP-DNA de 169pb, amplificado por PCR, en el que estaba formado el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], en la región promotora de <i>Gapdh</i>	55
Figura 15. Fragmento de ChIP-DNA de 141pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG], al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Wt</i>	56
Figura 16. Fragmento de ChIP-DNA de 108pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG], al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Amh</i>	57
Figura 17. El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina fue negativo para la secuencia motivo [AT]GATA[AG], identificada río arriba del gen <i>Lrp4</i>	58
Figura 18. Fragmento de ChIP-DNA de 105pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG], al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Sp5</i>	59
Figura 19. Fragmento de ChIP-DNA de 114pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG], al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Spr2d</i>	60
Figura 20. Fragmento de ChIP-DNA de 169pb, amplificado por PCR, en el que estaba formado el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], en la región promotora de <i>Gapdh</i> , en cromatina de hígado de embriones 40,XY y 40,XX.....	61
Figura 21. Fragmento de ChIP-DNA de 105pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG], al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen <i>Gapdh</i> , en cromatina de hígado.....	62
Figura 22. El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina fue negativo para la secuencia motivo [AT]GATA[AG], identificada río arriba del gen <i>Lrp4</i> , en cromatina de hígado.....	63

RESUMEN

En mamíferos, la determinación del sexo de la gónada sucede en una población de células somáticas NR5A1+ que se agrupan en el primordio de la gónada del embrión. En el núcleo de las células somáticas NR5A1+ de embriones 46,XY inicia la señal de determinación, que está dada por la expresión del gen *SRY* que está ligado al cromosoma Y. La expresión de *SRY* da inicio a un programa transcripcional masculino que tendrá como resultado la diferenciación del linaje de células de Sertoli, seguido de desarrollo testicular. En células somáticas NR5A1+ de embriones 46,XX (donde la expresión de *SRY* está ausente), otros factores de transcripción darán inicio al programa transcripcional femenino el cual conducirá a la diferenciación del linaje de células de la granulosa seguido de desarrollo ovárico. El mecanismo molecular que integra el proceso de determinación y diferenciación es complejo y está compuesto, en gran medida, por un conjunto de factores de transcripción que reconocen secuencias específicas de DNA, a las cuales se unen para promover el inicio, mantenimiento o bloqueo de la expresión de múltiples genes blanco. Las interacciones de factores de transcripción sobre este conjunto de genes blanco pueden ser entendidas como una red de regulación génica, que actúa dentro del núcleo de la célula.

En este trabajo se presenta el esquema de una red de regulación génica y un modelo computacional de tipo Booleano, como una alternativa para describir *In silico* la dinámica del proceso de determinación del sexo de la gónada y diferenciación de los linajes de Sertoli o de la granulosa. El modelo de la red contiene 19 nodos en total; 12 nodos corresponden a genes que codifican factores de transcripción, mientras que siete nodos representaron moléculas de señalización. La red contiene 78 interacciones, 42 están confirmadas en humano, 12 interacciones provienen de hallazgos experimentales reportados en ratón y 24 interacciones fueron inferidas a partir de la simulación del modelo dinámico. Por medio de simulaciones computacionales, se ensayaron todos los estados posibles de activación (1) o inactivación (0) de los elementos reguladores asociados a cada nodo de la red, hasta llegar a un estado estacionario en el cual el valor (0/1) de los 19 nodos de la red ya no cambió. Este estado estacionario conocido como atractor indicó el estado final (1) activo o (0) inactivo de cada uno de los nodos de la red. A partir de las simulaciones del modelo se obtuvieron tres atractores estables. El primer atractor es interpretado como el patrón de expresión génica que conduce a la diferenciación de células de Sertoli. El segundo atractor es interpretado como el patrón de expresión génica que conduce a la diferenciación de células de la granulosa, mientras que el tercer

atractor corresponde a un estado de la red sin actividad. Este estado se interpreta como una falla en el desarrollo de la gónada en la que no hay formación de linajes celulares. A nivel histológico, la falla puede observarse en individuos que carecen de gónadas y en su lugar se observan estrías de tejido fibroso.

Derivado de las simulaciones del modelo, se planteó una serie de inferencias que necesitan validación a nivel experimental. En este trabajo se presenta la validación de la unión del factor de transcripción GATA4 con la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen *Wt1*. De forma adicional, se analizó la unión de GATA4 a su secuencia motivo, río arriba del TSS de los genes *Lrp4*, *Amh*, *Sp5*, *Spr2d* y *Gapdh*. Para validar las interacciones se hicieron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), con testículos y ovarios de embriones de ratón de 13.5 días post coito (dpc). Los resultados de los ensayos indicaron que GATA4 se une a su secuencia motivo, río arriba del TSS de *Wt1* en cromatina de testículos embrionarios. La unión no se detectó en cromatina de ovarios embrionarios. El resultado experimental validó la predicción del modelo computacional en la vía masculina. Por otra parte, se sugiere que la actividad de *Wt1* en vía femenina pueda estar regulada por otros factores de transcripción. En los ensayos con cromatina testicular de ratones 13.5 dpc, se observó que GATA4 se une a su secuencia motivo río arriba del TSS del gen *Amh*. Este resultado confirmó evidencia experimental previa de la interacción de GATA4 con dicho gen. Por otra parte, en cromatina ovárica se observó que GATA4 se une a su secuencia motivo río arriba del TSS de los genes *Sp5* y *Spr2d*. Este resultado confirmó evidencia experimental previa de GATA4 como activador de la transcripción de dichos genes. Como hallazgo adicional, se pudo observar que GATA4 se une a una secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del gen *Gapdh*.

Además de la validación por ChIP, se hicieron ensayos de inmunofluorescencia dirigidos a GATA4, en diferentes etapas del desarrollo de la gónada. Con estos ensayos se observó que GATA4 está presente, desde la etapa de gónada bipotencial (10.5 dpc), durante la diferenciación testicular/ovárica (13.5 dpc) y en testículos y ovarios de ratones de 10 días post parto. La señal de GATA4, presente durante todo el desarrollo testicular y ovárico, indica que dicho factor tiene un papel relevante, ya que es considerado un activador transcripcional clave en la diferenciación gonadal.

Palabras clave: Determinación celular; Diferenciación celular; Diferenciación sexual; Modelos Booleanos; Testículo; Ovario; Gónada bipotencial; GATA4; *SRY*

ABSTRACT

In mammals, gonadal sex determination begins in a population of somatic cells that express the nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 (NR5A1) gene. These cells migrate and proliferate within the gonadal primordia of the embryo. In 46,XY embryos, the signal of sex determination is given by the expression of the Y-linked sex determining gene *SRY*, within the nucleus of NR5A1+ somatic cells, which sets a transcriptional male pathway that leads to differentiation of the Sertoli cell lineage, followed by testicular development. In 46,XX embryos (where *SRY* expression is absent), other set of transcription factors within the nucleus of NR5A1+ cells promote the beginning of a transcriptional female pathway, leading to differentiation of the granulosa cell lineage, followed by ovary development. The molecular mechanism of genetic sex determination and cell differentiation is complex and comprises a set of transcription factors that bind to specific DNA motifs to activate, maintain, or silencing of multiple genes. The interactions between transcription factors at a given set gene targets, form a gene regulatory network within the cell nucleus.

In this work, we present a Boolean network model as an alternative to describe, *In silico*, the dynamics of genetic sex determination and differentiation of Sertoli/granulosa cell lineages. The Boolean network model contains 19 nodes; 12 nodes represent genes encoding transcription factors, while seven nodes represented signaling molecules. The network contains 78 interactions, 42 were confirmed in human, 12 in mice, while 24 were inferred from direct simulation of the model. From simulations of the Boolean model, we obtained three attractors. First attractor is interpreted as the pattern of gene expression leading to differentiation of Sertoli cells; Second attractor is interpreted as the pattern of gene expression leading to differentiation of granulosa cells, while the third attractor corresponds to a vector without activity. This vector is interpreted as a dysfunction during the development of the gonad in which there is no formation of cell lineages. At the histological level, the dysfunction can be observed in individuals who lack gonads and have fibrous tissue instead of gonads.

We validated an inference derived from the Boolean network model by means of Chromatin Immunoprecipitation (ChIP), with testis and ovaries of mouse embryos of 13.5 days post coitum (dpc). Specifically, we analyzed the binding of the GATA4 transcription factor with the DNA sequence motive [AT]GATA[AG], upstream of the transcription start site of the *Wt1* gene. We also analyzed the binding of GATA4 upstream of the transcription start site of *Lrp4*, *Amh*, *Sp5*, *Sprr2d* and *Gapdh*. Experimental results indicate that GATA4 binds to the analyzed region, upstream of the *Wt1* gene from testicular chromatin however, the binding was not observed in ovaries. The former experimental result

validated the model prediction about the GATA4 binding upstream *Wt1* in the male pathway, although other transcription factors might be associated upstream *Wt1* in the female pathway. The binding of GATA4 was observed upstream of the *Amh* gene in the male pathway. Experiments with chromatin from ovaries indicated that GATA4 binds upstream of the *Sp5* and *Sprr2d* genes. As an additional finding, we observed the binding of GATA4 upstream of the *Gapdh* gene.

In addition, we elaborated immunostainings with the GATA4-C20 antibody on sections of gonads at different developmental stages. The GATA4 signal was detected as early as 10.5 dpc, at the bipotential gonadal primordium and continued at 13.5 dpc, in both testis and ovaries. The signal persisted in testis and ovaries at 10 days post-delivery. The persistent GATA4 signal in male and female pathways suggests that the factor plays an important role in the development of gonads due to the function of GATA4 as a transcriptional activator.

Key words: Cell determination; cell differentiation; sexual differentiation, Boolean model; Testis; Ovaries; bipotential gonad; GATA4; *SRY*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El desarrollo del sexo gonadal en mamíferos

1.1.1 Generalidades

En mamíferos, el desarrollo del sexo representa un proceso biológico complejo, el cual puede ser dividido en tres etapas cronológicas consecutivas que se mencionan a continuación: 1) determinación del sexo cromosómico; 2) determinación del sexo de la gónada, que tiene como resultado el desarrollo de testículos u ovarios, y 3) diferenciación fenotípica de genitales internos y externos. La primera etapa se establece desde la formación del cigoto con el complemento sexo-cromosómico XX para hembras o XY para machos. Mientras que la determinación del sexo de la gónada ocurre en etapas posteriores del desarrollo embrionario y requiere de: 1) establecimiento de un primordio de gónada que aparece sobre la superficie media-ventral del mesonefros (estructura que funciona como riñón en la etapa embrionaria, y que forma parte de la cresta urogenital del embrión) (Wilhelm *et al.*, 2007a; Hutson, 2012); 2) migración y agrupación de células somáticas NR5A1+ hacia el primordio de la gónada. Se ha observado que estas células NR5A1+ tienen su origen en el epitelio celómico y migran a las crestas genitales a través del adelgazamiento (discontinuidad) de la membrana basal que está por debajo del epitelio celómico (Karl y Capel, 1998; Albrecht y Eicher, 2001), y 3) expresión del gen *SRY* en el núcleo de las células somáticas NR5A1+. Es importante mencionar que el gen *SRY* está ligado al cromosoma Y. La expresión de este gen determinará el destino de las células somáticas NR5A1+ hacia el linaje células testiculares de Sertoli. Por otra parte, en ausencia del gen *SRY*, en embriones XX, la expresión de otros genes como *FOXL2* y la vía *WNT4/β*-catenina conducirá a la diferenciación del linaje de células ováricas de la granulosa.

En el ratón, que ha sido el modelo de estudio más utilizado, el primordio de la gónada bipotencial se establece alrededor de los 10.5 días post coito (dpc), mientras que en el humano el primordio de la gónada bipotencial se establece alrededor de la 4ª a 5ª semana de desarrollo. En ambas especies se ha observado migración y agrupación de células somáticas que provienen del epitelio celómico, así como células que provienen del mesonefros. Estas células proliferarán y formarán parte de poblaciones progenitoras que se diferenciarán hacia linajes de células especializadas de las gónadas (Albrecht y Eicher, 2001). Por ejemplo, las células somáticas NR5A1+ provenientes del epitelio celómico se diferenciarán hacia el linaje de células de Sertoli en testículo o el linaje de células de la granulosa en ovario. Estas células tendrán la función de proveer nutrientes y soporte a las células germinales. Por otra parte, se considera que una población de células proveniente del mesonefros se diferenciará hacia el primer linaje de células de Leydig, el cual tendrá la función de sintetizar

andrógenos y hormona tipo insulina 3 (INSL3). Los andrógenos son requeridos para la masculinización de genitales internos y externos, mientras que INSL3 tiene un papel en el descenso de los testículos (Wilhelm *et al.*, 2007a; Ungewitte y Yao 2013; Shima y Morohashi 2016).

Por otra parte, es importante mencionar el evento de migración de células germinales. En ratón, la migración inicia alrededor de los 7.25 dpc, desde la base del alantoides. Las células prosiguen a través del endodermo del intestino posterior y mesenterio dorsal, hasta agruparse en las crestas genitales del primordio de la gónada alrededor de los 10.5 dpc. Estas células se diferenciarán hacia ovocitos primarios en ovarios, o espermatogonias fetales en testículos (Saitou y Yamaji 2012). Por varios estudios se ha identificado que las células somáticas y germinales que convergen en el primordio de gónada, tienen el potencial de diferenciarse hacia linajes masculinos o femeninos, por lo que son consideradas células bipotenciales (Palmer y Burgoyne, 1991; Albrecht y Eicher, 2001). El conocimiento de la bipotencialidad de las células que convergen en el primordio de la gónada, ha representado un avance muy importante en el conocimiento de la etapa previa al inicio de la señal de determinación del sexo de la gónada. A continuación, se presentan evidencias experimentales sobre dicha propiedad.

1.1.2 Capacidad bipotencial de células somáticas del primordio gonadal

Taketo-Hosotani y colaboradores (1985) hicieron trasplantes de ovarios de ratón 12 dpc, por debajo de la cápsula renal de ratones masculinos adultos. El objetivo de los trasplantes fue identificar si las células del ovario embrionario, que aún no presentan características de ultraestructura específicas de linajes ováricos, podían cambiar su destino hacia células testiculares. Los investigadores observaron que los ovarios a los 12 dpc, están compuestos únicamente por células pre-granulosa y células germinales en proliferación. Con sus experimentos observaron desarrollo ovárico normal durante los primeros siete días de trasplante. Sin embargo, entre el día 11 y 14 de trasplante se observaron: 1) estructuras identificadas como túbulos seminíferos; 2) células foliculares envolviendo ovocitos, y 3) regiones de tejido con características transitorias. Es decir, cordones seminíferos y ováricos con ovocitos, la mayoría de éstos en procesos degenerativos. En las regiones en transición, se pudieron identificar a nivel histológico, células de Sertoli y pre-granulosas envueltas por lamina basal. Adicionalmente, se identificó un tercer tipo de células que presentaba características intermedias a Sertoli y pre-granulosa como: núcleo celular característico de Sertoli, pero con citoplasma parecido a pre-granulosa (células con poco citoplasma y sin retículo endoplásmico liso). Los ovocitos en la región de transición, se observaron en proceso de

degeneración y estaban principalmente rodeados de células de Sertoli. Otra observación relevante, fue la producción de testosterona a partir del tejido masculinizado y cultivado *In vitro*. Después de 30 días de trasplante, se observó que el tejido intermedio había desaparecido y solo se observó tejido con túbulos seminíferos. A partir de estos resultados, los autores sugirieron que el destino de las células ováricas pre-granulosa, podía ser revertido hacia linajes de células testiculares, aunque el mecanismo que permitía este cambio era desconocido para los autores (Taketo-Hosotani *et al.*, 1985). Lo relevante de este experimento fue el hecho de observar que, a partir de explantes de ovarios embrionarios, células pre-granulosas podían cambiar su destino hacia células de Sertoli.

Otra evidencia sobre la bipotencialidad, corresponde a un estudio que tuvo como objetivo analizar la contribución relativa de células XX a los linajes de células testiculares de Sertoli, Leydig, mioideas y pro-espermatogonias T1, a partir de ratones quiméricos (*i.e.*, fusión de mórulas XX-XY en etapa de 8 a 16 células, Palmer y Burgoyne, 1991). Para poder cuantificar la contribución de células derivadas de la mórula XX en ratones XX/XY, los investigadores insertaron el gen beta-globina en el cromosoma X que portaban las mórulas XX. Posteriormente revisaron testículos quiméricos de 13.5-16.5 dpc, testículos quiméricos en etapa de pre-pubertad y testículos quiméricos en etapa adulta. Se determinó por las observaciones en etapa embrionaria, que en promedio el 43% de células mioideas del testículo provenían de células derivadas de la mórula XX; el 48% de células de Leydig provenían de células derivadas de la mórula XX; el 65% de pro-espermatogonias T1 provenían de células derivadas de la mórula XX, mientras que solo 10% de células de Sertoli provenían de células derivadas de la mórula XX. También se cuantificó la proporción de células de la mórula XX en células somáticas del hígado de embriones XY quiméricos. Éstas representaron 47.5% de las células analizadas.

Los autores determinaron que las gónadas quiméricas XY, de ratones en etapa de pre-pubertad, presentaban una proporción mínima de células testiculares derivadas de la mórula XX, las cuales fueron identificadas en escasos parches. Por otra parte, en testículos quiméricos de etapa adulta, se observó una proporción mínima de células testiculares derivadas de la mórula XX. En algunos casos solo pudieron identificar algunas células de Sertoli derivadas de la mórula XX, en pequeños grupos que representaron el 1.6-2.1% de total de células de Sertoli observadas. También se observó ausencia de espermatogonias derivadas de células de la mórula XX. Los autores destacaron que la contribución de células derivadas de la mórula XX, al linaje de células de Sertoli, fue muy baja durante la etapa embrionaria, y sugirieron la posibilidad de una señal autónoma en las células XY precursoras de Sertoli. Dicha señal podía estar codificada en el cromosoma Y. Los autores sugirieron que la señal autónoma podía ser la expresión de *Sry*, que posiblemente desencadenaba una cascada de regulación

de la expresión génica que resultaba en la diferenciación del linaje de células de Sertoli. El estudio de Palmer y Burgoyne (1991), es relevante porque generó evidencia sobre la contribución de células XX hacia linajes de células testiculares, en las etapas embrionarias de desarrollo de la gónada.

Actualmente, se sabe que la expresión del gen *Sry* corresponde a la señal que determina el sexo en mamíferos. Su identificación requirió de varios estudios a nivel molecular. Un estudio relevante fue el de Guellaen y colaboradores (1984). Los investigadores identificaron por medio de enzimas de restricción e hibridación con sondas específicas del cromosoma Y, la presencia de fragmentos del Y en un grupo de pacientes con cariotipo 46,XX que presentaban testículos pequeños con presencia de células de Sertoli y ausencia de células germinales. Los autores identificaron estos fragmentos como la causa más posible de masculinización de los individuos. Sin embargo, no pudieron reportar a nivel molecular la identidad de estos fragmentos. Fue hasta 1990 que Andrew Sinclair y colaboradores reportaron la identidad del factor determinante testicular (*TDF* en humanos o *Tdy* en ratón). Los investigadores analizaron un fragmento de 35kb, en el borde de la región pseudoautosómica del cromosoma Y. Primero hicieron fragmentos de esta región de aproximadamente 4kb de longitud, que después clonaron y fragmentaron en segmentos más pequeños entre 500pb a 1kb. En total obtuvieron 50 fragmentos, los cuales fueron marcados radioactivamente y se usaron como sondas para hibridar con DNA extraído de humano, ratón y bovino (machos y hembras). De todas las sondas, se observó que una de 2.1kb correspondiente a pY53.3 hibridaba fuertemente con fragmentos del cromosoma Y de humano, ratón y bovino. Posteriormente, los investigadores usaron la sonda pY53.3 para hibridar en DNA genómico de humano, chimpancé, conejo, cerdo, caballo, bovino y tigre (machos y hembras). Los investigadores observaron que la sonda hibridaba solamente con DNA de machos. Este resultado indicó que la secuencia estaba conservada entre mamíferos machos, en consecuencia decidieron secuenciar la sonda pY53.3 e identificaron un marco abierto de lectura que codificaba una secuencia de 223 aminoácidos. Se observó que esta secuencia de aminoácidos tenía similitud con la proteína mat3-M de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* y con proteínas del grupo de alta movilidad (HMG). Con la información previa, los investigadores decidieron comparar el marco abierto de lectura que encontraron en humano con la secuencia homóloga en conejo y observaron que un fragmento de las secuencias de DNA comparadas entre las dos especies tenía un nivel de similitud muy alto (casi 90% de similitud). Se identificó que este fragmento de DNA codificaba una secuencia de 120 aminoácidos, 64 de los cuales fueron idénticos entre humano y conejo. Fuera de este fragmento conservado, la similitud entre secuencias fue baja (aproximadamente 54% de similitud). Los investigadores concluyeron que la secuencia nucleotídica que habían aislado

correspondía a un gen conservado en diferentes especies de mamíferos del sexo masculino. Los investigadores propusieron que ésta secuencia codificaba una proteína que funcionaba como factor de transcripción debido a su contenido rico en Arginina y Lisina y por contener un dominio HMG. El gen fue llamado sex-determining región Y, ubicado en Yp11.2 en el humano (Sinclair *et al.*, 1990). Un año después, el papel de *Sry* como gen que determina el sexo de la gónada hacia testículos, fue validado al obtener un ratón transgénico con cariotipo 40,XX, en el que su sexo fue revertido de femenino a masculino por la introducción del gen *Sry* de ratón (Koopman *et al.*, 1991).

1.1.3 La señal de determinación de la vía masculina

El gen *SRY* pertenece a la familia de genes *SOX* (SRY-related HMG box). Estos genes codifican una gama de factores de transcripción asociados a varios aspectos del desarrollo embrionario como: neurogénesis del sistema nervioso central, desarrollo de oligodendrocitos, desarrollo de células de la cresta neural, condrogénesis, desarrollo testicular, entre otros. El dominio HMG reconoce una secuencia motivo de DNA específica 5'-ATTGTT-3', distribuida a través del genoma (esta secuencia motivo se encuentra principalmente en el surco menor del DNA). La unión del factor de transcripción con la secuencia motivo resulta en un pliegue del DNA de 60-85°, lo que sugiere que *SRY* como producto proteico, funciona como un remodelador de la cromatina, que determina el inicio del programa transcripcional asociado a la vía masculina (Ukiyama *et al.*, 2001; Tanaka y Nishinakamura, 2014).

Por estudios experimentales, se ha reportado que *SRY* como factor de transcripción, promueve la expresión del gen *Sox9* mediante la unión del dominio HMG a su región potenciadora, conocida como TESCO (testis-specific enhancer of *Sox9* core). TESCO es una secuencia de 1.4kb, que se localiza 11-13kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Sox9*. Esta región está conservada en los genomas de rata, perro y humano. La región TESCO tiene un papel relevante en la regulación positiva de *Sox9*. Se han identificado secuencias motivo de DNA que son reconocidas por otros factores de transcripción como SF-1 y que interactúan para regular la correcta expresión de *Sox9* (Sekido y Lovell-Badge, 2008).

Por medio de estudios de inmunolocalización, se ha identificado la expresión de *Sry* únicamente en la población de células somáticas progenitoras SF-1+ que se agrupan en la cresta genital del embrión de ratón. Se ha observado que el destino de dichas células es hacia la diferenciación de células de Sertoli (Albrecht y Eicher 2001; De Santa Barbara *et al.*, 1998). Por estudios en ratón, se ha descrito un patrón de expresión característico ya que ocurre en forma de una onda espacio-temporal que inicia

en el centro de la cresta genital y se extiende hacia los polos. En ratón la expresión de *Sry* inicia aproximadamente a los 11.0 dpc, seguido de un máximo de expresión a los 11.25 dpc (12-15 somitas de la cola). Después la expresión disminuye hasta ya no ser detectada a los 13 dpc. En el humano, la expresión de *SRY* inicia aproximadamente en la etapa de desarrollo de Carnegie CS17 (41 días de desarrollo embrionario). El máximo de expresión se observa a los 44 días de desarrollo (CS18) y disminuye posteriormente, pero la expresión se mantiene en un nivel basal (Hanley *et al.*, 2000).

También en ratón, se ha encontrado que la expresión de *Sry* debe ocurrir en una ventana de tiempo muy precisa. Hiramatsu y colaboradores (2009) obtuvieron ratones XX transgénicos que contenían el gen *Sry* (HSP-*Sry*-Tg). El propósito de esta investigación fue inducir la expresión de *Sry* en gónadas de embriones XX (*Sry*+) en diferentes tiempos, e identificar los cambios en el desarrollo de la gónada. La expresión de *Sry* transgénico podía ser inducida por temperatura debido a que el gen fue asociado a un promotor Heat shock (Hsp70). Los autores indujeron la expresión de *Sry* en crestas genitales de embriones XX entre 11 y 11.25 dpc (12 y 14 somitas de la cola). Observaron un máximo de expresión de *Sry* después de las 3h de inducción, seguido de un mínimo que fue observado después de las 6h de inducción. Los autores indicaron que el 80% de las gónadas en las que se indujo la expresión de *Sry*, presentaban cordones testiculares con presencia de células de Sertoli, después de cuatro días de cultivo. También se pudieron identificar células con marcadores de Leydig como 3-betaHSD.

Por otra parte, si la inducción de *Sry* era posterior a los 11.25 dpc, se observó que sólo el 27% de las gónadas XX(*Sry*+) mostraban desarrollo testicular parcial. En este caso, la gónada contenía una mezcla de células SOX9+ al centro, con células en meiosis (SCP3+) a los bordes de la gónada. Lo anterior fue interpretado como tejido ovotesticular. Es decir, una mezcla de tejido testicular y ovárico presente en una gónada. Los investigadores observaron que si se inducía la expresión de *Sry* a los 11.5 dpc, no se daba desarrollo testicular, tampoco ovotesticular y la gónada continuaba hacia el desarrollo ovárico. Con estos estudios se determinó que la ventana crítica de la señal de determinación testicular en ratón es entre los 11.0 y 11.25 dpc (Hiramatsu *et al.*, 2009).

1.1.4 El inicio de la vía femenina y patrones de expresión dimórficos

Dado que la expresión del gen *Sry* es suficiente para dar inicio al desarrollo testicular, se consideró que este gen y otros identificados, tenían la función de oponerse de forma activa al desarrollo ovárico, el cual se consideraba como pre-definido. Esta idea se estableció por los resultados observados de los experimentos elaborados por Alfred Jost (1947). A grandes rasgos, el investigador elaboró microcirugías con fetos de conejos para identificar el papel que tenían las

gónadas en el desarrollo de genitales internos. El investigador removió las gónadas de fetos entre los días 15 y 24 de gestación. Los fetos operados prosiguieron su desarrollo y posteriormente se observaron las posibles alteraciones en genitales internos. El investigador identificó que, si las gónadas removidas pertenecían a un feto XX, los ductos de Müller se desarrollaban normalmente. Es decir, los genitales internos femeninos eran normales. Sin embargo, si el feto era XY y las gónadas eran removidas entre los 19 y 21 días de gestación, los ductos de Wolff degeneraban mientras que los ductos de Müller se desarrollaban. Si la castración de los fetos XY era posterior a los 23 días, se observaba desarrollo normal de genitales internos masculinos derivados de los ductos de Wolf y regresión normal de los ductos de Müller.

En otros experimentos, Jost elaboró trasplantes unilaterales de un testículo fetal cerca del ovario de un feto XX de 28 días de gestación. Se observó en el lado del trasplante, que el ducto de Wolff persistía mientras que el ducto de Müller degeneraba. Por otra parte, en el lado no operado el ducto de Müller permanecía y el ducto de Wolff degeneraba. En otro experimento, se implantó un cristal de propionato de testosterona cerca de un ovario de un feto XX y se observó que en ambos lados del feto los ductos de Wolf y de Müller permanecían y ninguno presentaba signos de regresión. A partir de estos experimentos el investigador dedujo lo siguiente 1) existía una ventana de tiempo en la que los genitales internos se diferenciaban hacia estructuras masculinas o femeninas y que, pasada esa ventana de tiempo, la diferenciación no podía ser revertida. Si los fetos XY eran castrados previamente a esta ventana de tiempo, la ausencia de hormonas testiculares conducía a la diferenciación de genitales internos femeninos; 2) las hormonas secretadas por los testículos (i.e, testosterona) tenían un efecto en la estabilización de genitales internos derivados de los ductos de Wolff, y 3) además de la testosterona, se predijo la existencia otra hormona que se esperaba que tuviera la función de revertir el desarrollo de los ductos de Müller en el feto masculino, ya que los experimentos en presencia de testosterona no pudieron revertir el desarrollo de estos ductos. De acuerdo con estos resultados, Alfred Jost consideró que el desarrollo hacia genitales internos masculinos se oponía al desarrollo hacia genitales internos femeninos, los cuales parecían estar predeterminados en el desarrollo embrionario, cuando había ausencia de hormonas testiculares (Jost, 1947). En la actualidad esta idea se ha modificado por estudios de patrones de expresión génica previo, durante y posterior a la determinación del sexo. En estos estudios se ha identificado que la diferenciación hacia el linaje de células de Sertoli en testículo o de la granulosa en ovario, está regulada por programas transcripcionales independientes que se caracterizan por tener patrones de expresión dimórficos y antagónicos. Ambos programas transcripcionales inician en el núcleo de las

células somáticas NR5A1+ provenientes del epitelio celómico. A continuación, se presentan las evidencias más relevantes sobre los programas transcripcionales que iniciarán el desarrollo de testículos u ovarios.

Nef y colaboradores (2005) observaron por medio de análisis de microarreglos, patrones de expresión previo, durante y posterior a la determinación del sexo de la gónada, entre los 10.5 y 13.5 dpc, en células somáticas progenitoras NR5A1+, aisladas de la cresta genital de embriones de ratón. Los autores observaron a los 11.5 dpc (etapa que corresponde al máximo de expresión de *Sry* en ratón), activación de 61 genes asociados a la vía masculina. El aumento más significativo de expresión ocurrió en genes asociados al cromosoma Y como: *Sry*, *Smcy*, *Uty*, *Ddx3y*, *Eif2s3y* además de genes asociados a la vía masculina como: *Sox9*, *Dhh*, *Fgf9*, *Amh*, *Cst9*, *Spp1*, *Mmd2*, *Aard*, *Cbln1*, *Cbln4*, *Rgn*, entre otros. A los 12.5 dpc, se observó activación de 587 genes mientras que a los 13.5 dpc, el patrón de expresión de la vía masculina aumentó a 919 genes. Los autores indican que el aumento más significativo de expresión entre los 12.5 y 13.5 ocurrió en genes asociados a la génesis de esteroides como el gen *StAR* y varios genes de la familia *Cyp*.

En los núcleos de células somáticas NR5A1+ aisladas de la cresta genital de embriones XX, se observó activación de 25 genes asociados a la vía femenina a los 11.5 dpc, entre los que destacan: *Xist*, *Fst*, *Spr2d*, *Irx3*, *Wnt4*, *Bmp2*, *Dax1*, entre otros. Mientras que a los 12.5 dpc, la cantidad de genes activados para la vía femenina fue de 546 y llegó a 1029 genes a los 13.5 dpc. Los autores también hicieron hibridaciones *in situ* de toda la gónada en embriones de 13.5 dpc, para confirmar los datos de los perfiles de expresión y observaron claramente patrones dimórficos en testículos y ovarios. Por ejemplo, se observó expresión de *Wnt9a*, *Irx3*, *Gpr49*, *Runx1* en ovarios en desarrollo, mientras que estos factores estaban ausentes en testículos. Por otra parte, se observó expresión *Cbln1*, *Cbln4*, *Rerg*, *Grb14*, *Tesc*, *Nedd9*, en testículo en desarrollo y ausencia de los mismos en ovario. A partir de estos resultados, los autores proponen que la diferenciación de la gónada representa un mecanismo molecular complejo que puede ser coordinado en forma de módulos o redes de genes, que codifican factores de transcripción, y están asociados a funciones en común, como proliferación celular. Los autores también analizaron el lugar que ocupaban los genes de vía masculina y femenina dentro del genoma del ratón y observaron que estaban distribuidos a lo largo del mismo (la mayoría en autosomas). De hecho, se identificaron genes que estaban agrupados en el brazo largo del cromosoma 1 asociados a vía masculina, mientras que en el cromosoma 7 se observó un grupo de genes asociados a vía femenina.

Uno de los trabajos más recientes en relación a los patrones de expresión génica diferencial asociados a la vía masculina/femenina, es el de Munger y colaboradores (2013). Los autores hicieron perfiles de transcripción en células NR5A1+, aisladas de primordios de gónadas de embriones XX y XY, entre 11.0 dpc y 12.0 dpc. Se observó lo siguiente: 1) pérdida del estado bipotencial de la gónada; 2) patrón de activación común, de un conjunto de genes, tanto en embriones masculinos como femeninos, que fue inmediatamente posterior a la pérdida de bipotencialidad. Este patrón fue compartido entre adrenales y gónadas de embriones XX y XY; 3) patrones de expresión dimórficos entre gónadas de embriones XX o XY; 4) regulación negativa (antagónica) entre genes asociados a vía masculina o femenina. Para este estudio los investigadores analizaron la abundancia total de transcritos en gónadas de embriones de ratón, medidos en intervalos de cuatro horas, iniciando en el día 11.0 dpc, y terminando en el día 12.0 dpc (de 13 a 23 somitas respectivamente). Los autores analizaron estadísticamente la abundancia de los transcritos en relación al sexo, el intervalo de tiempo y las cepas de ratones usadas para su estudio. A partir de estos análisis identificaron 659 genes en los que su abundancia estaba relacionada con el sexo del embrión y el intervalo de tiempo analizado. Estos 659 genes están asociados con el inicio de patrones de expresión dimórficos entre testículos y ovarios. En relación a la pérdida del estado bipotencial, los investigadores identificaron regulación negativa de genes como *Hoxa7*, *Gfra3*, en ambos embriones XX ó XY. Por otra parte identificaron activación de *Hoxd10* y *Hs3st3a1* en embriones XX y XY así como activación de 14 genes en común que están asociados a células adrenales y gonadales NR5A1+ La expresión de genes específicos con patrón de expresión dimórfico hacia vía testicular u ovárica inició después de la pérdida del estado bipotencial a partir de 11.4 dpc. Ejemplos de estos son: *Sox9*, *Dhh*, *Cbln1*, *Fgf9*, *Amh*, *Col2a1* en vía masculina o *Wnt4*, *Irx3*, *Msx1*, *Fst*, *Zfp277*, *Igf2bp2* en vía femenina. En relación al papel antagónico entre ambas vías, se observó que 25 genes asociados a la vía masculina eran regulados negativamente en embriones XX, mientras que 148 genes asociados a vía femenina fueron regulados negativamente en la vía masculina. A partir de los estudios de expresión arriba citados, se puede decir que el proceso de determinación del sexo y diferenciación de linajes de células testiculares u ováricas está integrado por una red de regulación de la expresión génica. En la Tabla 1 se presentan genes que codifican factores de transcripción que han sido considerados como elementos clave, aunque es importante mencionar que se desconoce el número total de genes que integran esta red y el papel que cada uno desempeña.

Tabla1. Genes que se expresan durante el desarrollo de la gónada en humano

Gen	Nombre	Locus	Tipo de proteína	Función	Tiempo-espacio de expresión
<i>LHX1</i>	LIM Homeobox gene 1	17q12	FT	AT	CU
<i>LHX9</i>	LIM Homeobox gene 9	1q31.3	FT	AT	CU
<i>EMX2</i>	Empty spiracles homeobox2	10q26.11	FT	AT	CU
<i>PAX2</i>	Paired box gene 2	10q24.31	FT	AT	CU
<i>CBX2</i>	Chromobox homolog 2	17q25.3	Complejo Polycomb	AT	GB; Vm
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1	11p13	FT	AT	CU; GB; Vm; Vf
<i>GATA4</i>	GATA binding protein 4	8p23.1	FT	AT	GB; Vm; Vf
<i>NR5A1 (SF1)</i>	Nuclear receptor subfamily 5 group A member 1	9q33.3	RN	AT	GB; Vm
<i>NROB1 (DAX1)</i>	Nuclear receptor subfamily 0 group B member 1	Xp21.2	RN	RAT	GB; Vm; Vf
<i>SRY</i>	Sex-determining region on the Y chromosome	Yp11.2	FT	Señal de determinación	Vm
<i>SOX9</i>	SRY-like, HMG-box-containing gene family, member 9	17q24.3	FT	Diferenciación Sertoli Represión del programa femenino	Vm
<i>FGF9</i>	Fibroblast growth factor 9	13q12.11	Señalización	Mantenimiento del programa masculino	Vm
<i>DMRT1</i>	Doublesex and mab-3 related Transcription factor 1	9p24.3	FT	Diferenciación hacia Sertoli	Vm
<i>PTGDS</i>	Prostaglandin D2 synthase	9q 34.3	Señalización	Señal de diferenciación	Vm
<i>DHH</i>	Desert hedgehog	12q13.12	Señalización	Señal de diferenciación	Vm
<i>DKK1</i>	Dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1	10q21.1	Inhibidor	Inhibidor de la señal de WNT4	Vm
<i>AMH</i>	Anti-Müllerian Hormone	19p13.3	Hormona (glicoproteína)	Regresión del ducto de Müller	Vm
<i>CTNNB1</i>	Cadherin associated protein beta	3q22.1	Proteína transmembranal	Vía WNT4-β-catenina	Vf
<i>FOXL2</i>	Forkhead box L2	3q23	FT	Diferenciación hacia granulosa	Vf
<i>RSPO1</i>	R-spondin-1	1p34.3	Activador vía canónica WNT4-β-catenina	Vía WNT4-β-catenina	Vf
<i>WNT4</i>	Wingless-type MMTV integration site family, member 4	1p36.23	Señalización	Vía WNT4-β-catenina	Vf

Cresta Urogenital (CU) entre los 35 y 49 días de desarrollo; Gónada Bipotencial (GB) entre los 42 y 49 días de desarrollo; Vía Masculina (Vm) a partir de los 49 días de desarrollo; Vía Femenina (Vf) a partir de los 49 días de desarrollo; Factor de Transcripción (FT); Activador Transcripcional (AT); Receptor Nuclear (RN); Regulador Actividad Transcripcional (RAT). Fuente: UniProt: <http://www.uniprot.org/>

En resumen, la gónada tiene su origen a partir de un primordio bipotencial, en el que convergen poblaciones de células somáticas como las NR5A1+ provenientes del epitelio celómico, entre otras poblaciones de células. A nivel molecular, el proceso de desarrollo de la gónada transita por los siguientes pasos: 1) pérdida de la bipotencialidad del primordio; 2) inicio de la señal de determinación, que corresponde a la expresión de *SRY*, en embriones XY o ausencia de expresión de *SRY* en embriones XX; 3) inicio de programas transcripcionales independientes y antagónicos; 4) proliferación-diferenciación de los primeros linajes celulares (i.e., células pre-Sertoli a Sertoli, durante el desarrollo testicular); 5) proliferación-diferenciación de otros linajes de células somáticas (i.e., células pre-Leydig a Leydig, durante el desarrollo testicular), y 6) cambios histológicos de las gónadas (hacia tejido ovárico o testicular) (Brennan y Capel 2004; Munger y Capel, 2012).

1.1.5 Alteraciones en el desarrollo del sexo (ADS)

Las alteraciones en el desarrollo sexual (ADS), son definidas como alteraciones congénitas en las que el sexo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico. En 2006 las asociaciones Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) y European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) publicaron un manual consenso en el que cambiaron las categorías de “intersexo”; “hermafrodita” o “pseudohermafrodita”, debido a que se consideraron términos que llevaban a confusión entre médicos y por ser interpretados como términos peyorativos. En la nueva clasificación las alteraciones en el desarrollo del sexo fueron agrupadas en: ADS a nivel cromosómico; ADS en individuos con cariotipo XY; ADS en individuos con cariotipo XX (Lee *et al.*, 2006). Los individuos clasificados dentro de estas tres categorías pueden tener un rango muy amplio de alteraciones morfológicas, histológicas y fisiológicas.

Las ADS a nivel cromosómico agrupan a individuos que presentan aneuploidias de cromosomas sexuales. Por ejemplo, la monosomía del cromosoma X descrita como síndrome de Turner. Los individuos con esta alteración pueden presentar un amplio espectro de alteraciones como: edema de pies y manos, cuello alado, orejas rotadas, displasia de uñas, mandíbula pequeña, estatura baja, anomalías cardíacas y renales además de retraso en el inicio de la pubertad en casi el 90% de los pacientes. Es importante mencionar que cada individuo puede presentar una o varias de las características ya mencionadas dependiendo si el individuo portador es 45,X en su cariotipo o presenta mosaicismo como: 45,X/46,XX; 45,X/46,XY; 46,X,i(Xq)/46,XX; 46,X,del(Xp)/46,XX, entre otros. Los pacientes con mosaicos que involucren el cromosoma Y pueden presentar ambigüedad en

genitales externos y tener estrías gonadales intra-abdominales que pueden derivar en tumores (Zhong *et al.*, 2012).

Otra alteración relacionada con cromosomas sexuales, es el síndrome de Klinefelter. En esta alteración el cariotipo predominante es el 47,XXY aunque también hay pacientes que pueden presentar otras variantes consistentes en ganancias del X por ejemplo, 48,XXY o presentar mosaicos como 46,XY/47,XXY entre otros. Las características indicativas de este síndrome son: criptorquidismo, falo pequeño, retraso en habilidades de lenguaje en la etapa infantil, retraso en el inicio de la pubertad, ginecomastia, testículos pequeños e infertilidad en adultos, entre otros (Visootsak y Graham, 2006).

Por otra parte, las ADS en pacientes con cariotipo 46,XY o 46,XX fueron subdivididas en disgenesia gonadal parcial o disgenesia gonadal completa. Las alteraciones en estos individuos están asociadas a mutaciones puntuales de genes asociados con el establecimiento del primordio gonadal y al proceso de determinación y diferenciación de células somáticas como las NR5A1+ que llegan a formar los linajes de Sertoli o de la granulosa en testículos u ovarios respectivamente (Tabla 2 y Tabla 3). En todos los casos, los individuos 46,XY ADS o 46,XX ADS pueden presentar un rango muy amplio de alteraciones observables en genitales internos y externos, además de otras alteraciones morfológicas, histológicas y fisiológicas. A continuación se describirá a detalle las características que permiten distinguir entre disgenesia gonadal parcial y/o completa.

En el caso de individuos 46,XY ADS con disgenesia gonadal parcial, se pueden observar testículos pequeños con diferentes grados de disfunción debido a la alteración de uno o varios tipos de líneas celulares (i.e, Sertoli, Leydig, germinales). A nivel histológico es común observar túbulos testiculares poco desarrollados (hipoplásicos) con pocas células de Sertoli. En algunos pacientes, se puede observar criptorquidia es decir, que las gónadas no hayan descendido al escroto y se encuentren en el canal inguinal. Los genitales externos pueden estar bien desarrollados o pueden presentar diferentes grados de alteración por ejemplo, falo hipoplásico (poco desarrollado) con presencia de hipospadias pene-escrotales es decir, apertura de la uretra en la parte ventral del pene o del glande que puede ser leve a severa. Adicionalmente, los pacientes pueden presentar problemas de fertilidad y alteraciones renales (Hewitt y Warne, 2012). Ejemplos de genes asociados a disgenesia gonadal parcial son: *WT1*, *NR5A1*, *GATA4*, *SOX9*, *DMRT1*, *DHH*, *AMH*, entre otros. (Tabla 2). Por ejemplo, en el caso de mutaciones en pacientes 46,XY donde se ha observado alteraciones en la función de la hormona anti-Mülleriana (AMH), los individuos pueden presentar persistencia de estructuras derivadas de los ductos de Müller. Es decir, presencia de genitales internos femeninos y defectos en la masculinización

de ductos de Wolff, los pacientes pueden presentar criptorquidia a veces asociada a hernia inguinal (Rey, 2005). En el caso de disgenesia gonadal completa en pacientes con cariotipo 46,XY (también conocida como reversión del sexo de masculino a femenino), se puede observar estrías de tejido fibroso que indican gónadas carentes de desarrollo. Debido a la ausencia de células de Sertoli, que secretan hormona anti-Mülleriana, el paciente presenta estructuras derivadas del ducto de Müller (tubas uterinas, útero, cérvix, tercio superior de la vagina) y genitales externos femeninos. Muchos pacientes son identificados tardíamente ya que al nacimiento las características no son evidentes y los pacientes acuden cuando hay un claro retraso en el inicio de la pubertad; además, estos pacientes presentarán infertilidad (Hewitt y Warne, 2012). Ejemplos de genes asociados a disgenesia gonadal completa son: *WT1*, *NR5A1*, *NROB1*, *CBX2*, *SRY*, *SOX9* (Tabla 2). Algunos genes pueden estar asociados a disgenesia gonadal parcial o completa y el tipo de alteración en el desarrollo dependerá del sitio en el DNA donde ocurra la mutación. Los ejemplos más claros son: *SRY* y *SOX9*. Si la mutación ocurre en el dominio HMG y/o en el dominio encargado de la activación transcripcional se perderá la funcionalidad de los factores de transcripción. Dado que estos genes son clave para el inicio de vía masculina, la pérdida de función impedirá la activación del programa transcripcional masculino que resultará en un fallo en la diferenciación de células de Sertoli, así como ausencia de diferenciación de otros linajes de células del testículo. De forma alternativa, si una mutación en el DNA altera la secuencia del transcrito pero la proteína mantiene cierto grado de funcionalidad, entonces se esperaría disgenesia gonadal parcial.

En el caso de individuos 46,XX ADS las alteraciones son subdivididas en disgenesia gonadal con presencia ó ausencia de útero; 46,XX testicular (también conocida como reversión del sexo de femenino a masculino); 46,XX ADS por exposición a andrógenos; 46,XX ovotesticular (pacientes que presentan tejido ovárico y testicular en sus gónadas). Algunas de las alteraciones arriba mencionadas se deben a mutaciones puntuales de genes asociados a la vía ovárica de desarrollo. Por ejemplo, mutaciones en el gen *FOXL2* están asociadas al síndrome Blepharofimosis-ptosis-epicanto inverso (BPES, por sus siglas en inglés). El síndrome es dividido en BPES-I o BEPES-II. Los pacientes con BPES tipo I presentan una mutación que genera un codón de paro prematuro, lo que genera una proteína trunca de un dominio rico en alanina/prolina. Los pacientes se caracterizan por presentar alteraciones palpebrales, falla ovárica prematura (inicio prematuro de la menopausia) e infertilidad, mientras que los pacientes con BPES tipo II solo presentan una mutación que hace más grande el dominio rico en alanina/prolina, los cuales presentarán anomalías en párpado pero no problemas de fertilidad. Otro ejemplo de una mutación puntual asociada a disgenesia gonadal con ausencia de útero y vagina fue

reportada por Biason-Lauber y colaboradores (2004). En este caso, la paciente 46,XX presentó una mutación en el codón 226 del exón 5 del gen *WNT4*. Esta mutación sustituyó al aminoácido glutamato por glicina. Los autores consideraron que esta mutación impide el correcto plegamiento de la proteína y evita su salida del retículo endoplásmico. Es importante mencionar que se han descrito otras alteraciones asociadas a *WNT4*. Por ejemplo, Jordan y colaboradores (2001) reportaron un paciente 46,XY con disgenesia gonadal completa (estrías fibrosas en lugar de gónadas, restos de estructuras derivadas de ductos de Müller y Wolff, presencia de un útero y vagina rudimentaria). En este paciente se observó una duplicación de un fragmento del cromosoma 1 reportada como: 46,XY,dup(1)(p31-p35). Los investigadores identificaron que al final del fragmento duplicado está el gen *WNT4* (localizado en 1p36.12) y consideraron que la causa más probable de la disgenesia gonadal completa de este paciente se debía a la duplicación del gen *WNT4* que podía estar asociada a sobreexpresión del gen durante las etapas tempranas del desarrollo de la gónada.

Por otra parte, se debe mencionar que los pacientes 46,XX testiculares fueron de gran importancia en el conocimiento de los procesos de determinación y diferenciación testicular. Guellaen y colaboradores (1984) fueron los primeros en reportar pacientes 46,XX con material del cromosoma Y. Estos pacientes estaban masculinizados; presentaban testículos reducidos, niveles muy bajos de testosterona y azoospermia. Posteriormente Sinclair y colaboradores (1990) identificaron el gen responsable (*SRY*) y el lugar donde se encontraba dentro del cromosoma Y, así como algunas de las propiedades de la proteína como el dominio HMG y su capacidad para unirse al DNA como posible factor de transcripción. También se sabe que la duplicación de regiones reguladoras río arriba del gen *SOX9* ocasionan reversión del sexo de femenino a masculino en pacientes 46,XX. Los pacientes con esta duplicación presentan testículos reducidos aunque también pueden tener estrías gonadales y genitales externos masculinos con diferentes grados de hipospádias e irregularidades en el escroto, etc. (Benko *et al.*, 2011).

En resumen, las ADS son causadas, en una proporción de casos, por aneuploidias de cromosomas sexuales, por mutaciones puntuales de genes asociados al proceso de determinación-diferenciación y por duplicaciones de genes que tengan un efecto de dosis sobre la expresión de otros genes asociados al desarrollo de la gónada. Estas alteraciones serán evidentes en el fenotipo del individuo a nivel histológico, morfológico y fisiológico. Finalmente, para un diagnóstico adecuado el médico debe seguir un algoritmo de diagnóstico que considere: a) características de genitales internos-externos; b) cariotipo; c) características bioquímicas como: nivel de hormona anti-Mülleriana, testosterona, LH/FSH; e) estudios a nivel molecular para identificar alteraciones a nivel genético del individuo; f)

estudios moleculares de los familiares más cercanos como padres y hermanos; g) historia de los familiares como: problemas reproductivos, menopausia temprana, retraso en la pubertad, etc. En cualquier caso el diagnóstico y manejo del paciente debe ser coordinado por varios médicos especializados en la atención de estas alteraciones, siempre en contacto con los padres y otros miembros de la familia incluyendo al paciente.

Tabla 2. Alteraciones del Desarrollo Sexual (ADS) en pacientes 46,XY

Gen	Alteración en el Desarrollo del Sexo (ADS)	Ejemplos de algunas mutaciones	Alteración en genitales externos	Síndromes asociados	Referencias
WT1	Disgenesia gonadal parcial/completa	Sustitución de aminoácido (exón 2) p.P181S Codón de paro (exón 8) p.R362X Mutación en sitio de splicing (intrón 9) c.1228-4C >T	Ambiguos/femeninos	Frasier Denis-Drash WAGR	Köhler <i>et al.</i> , 2011
NR5A1	Disgenesia gonadal parcial/completa	Codón de paro p.E11X p.C16X	Ambiguos/femeninos Hipospadias pene-escrotales	Falla adrenal primaria	de-Mello <i>et al.</i> , 2011
NROB1	Disgenesia gonadal completa	Duplicación 46,XY,dup(Xp21.2)	Femeninos	Falla adrenal primaria	Barbaro <i>et al.</i> , 2007
CBX2	Disgenesia gonadal completa	Sustitución de nucleótido (exón 5) c.293C>T c.1370G>C	Femeninos	Reversión del sexo de masculino a femenino	Biason-Lauber <i>et al.</i> , 2009
GATA4	Disgenesia gonadal parcial	Sustitución de aminoácido p.G221R	Normales-ambiguos	Alteraciones cardíacas	Laurenco <i>et al.</i> , 2011
SRY	Disgenesia gonadal completa	Sustitución de aminoácido en el dominio HMG p. M64R p. F67V p. R75N p. R76P	ambiguos- femeninos	Reversión del sexo de masculino a femenino	Mitchell y Harley, 2002

SOX9	Disgensia gonadal parcial/completa	Sustitución de nucleótido c. 334T>C c. 356C>T c. 430A>C c. 442G>T	ambiguos-femeninos	Reversión del sexo de masculino a femenino	Cameron y Sinclair, 1997
DMRT1	Disgensia gonadal parcial	Inserción 3'UTR+11insT	Hipospadias pene-escrotales		de Mello <i>et al.</i> , 2010
DHH	Disgensia gonadal parcial	Sustitución de aminoácido (exón 2) p. L162P	Ambiguos/femeninos		Canto <i>et al.</i> , 2004
AMH	Disgensia gonadal parcial Criptorquidia bilateral	Codón de paro R95X (exon1) R191X (exón 3) E382X (exón 5) Sustitución de aminoácido (exón 5) A515V	Normales	Ductos Mullerianos persistentes	Belville <i>et al.</i> , 1999

Tabla 2. Alteraciones del Desarrollo Sexual (ADS) en pacientes 46,XX					
Gen	Alteración en el Desarrollo del Sexo (ADS)	Alteración a nivel genético	Alteración en genitales externos	Síndromes asociados	Referencia
WT1	Aparentemente normal (femeninos)	Sustitución de nucleótido c. 14 C>T	Aparentemente normal (femeninos)	Frasier	Demmer <i>et al.</i> , 1999

NR5A1	Aparentemente normal	Sustitución de aminoácido p. R255L	Aparentemente normal (femeninos)	Insuficiencia adrenal Falla ovárica prematura	Biason-Lauber y Schoenle, 2000 Laurenco <i>et al.</i> , 2009
NROB1	Aparentemente normal	Delección 46,XX,del(Xp21.2)	Aparentemente normal (femeninos)	Falla adrenal primaria	Shaikh <i>et al.</i> , 2008
WNT4	Ovarios ectópicos	Sustitución de aminoácido p. E226G	Vagina y útero ausentes		Biason-Lauber <i>et al.</i> , 2004
FOXL2	Falla ovárica prematura	Sustitución de nucleótido c. 892 C>T c. 848G>A Duplicación de nucleótidos c. 909_938dup29 c. 1092_1108dup16	Aparentemente normal (femeninos)	Blepharofimosis-ptosis-epicanto inverso (BPES)	Crisponi <i>et al.</i> , 2001
SRY	Disgencia gonadal completa	Translocación 46,XX, Xp22.3(SRY+)	Genitales externos masculinos	Reversión del sexo de femenino a masculino	Velasco <i>et al.</i> , 2010
SOX9	Disgencia gonadal completa	Duplicación 46,XX,dup(17)(q23.1q24.3)/46,XX	Genitales externos masculinos ambiguos hipospadias	Reversión del sexo de femenino a masculino	Huang <i>et al.</i> , 1999

1.2. Biología de sistemas como estrategia para entender los estados dinámicos en redes de regulación génica

La biología de sistemas es una disciplina que analiza, a partir de la propuesta de redes y modelos computacionales, la dinámica de una serie de elementos relevantes en un sistema biológico (Kauffman, 1993). Una forma común de definir redes en biología de sistemas, es a partir de la función a la que están asociadas. Por ejemplo, redes de regulación de la expresión génica. Este tipo de redes pueden ser representadas a partir de la elaboración de un esquema compuesto por nodos y conectores. Los nodos representarían genes o elementos relevantes de la red que se interese analizar, mientras que los conectores son la forma de representar una interacción de regulación entre nodos. A nivel biológico, la interacción entre genes (regulación) puede estar dada por el producto de la expresión de un gen, por ejemplo un factor de transcripción, sobre un determinado gen blanco.

Para analizar la dinámica de los elementos que integran una red biológica, se elaboran modelos computacionales que pueden ser continuos o discretos. En los modelos continuos, el estado de cada nodo es analizado a partir de un sistema de ecuaciones diferenciales, que son elaboradas a partir del conocimiento detallado de parámetros cinéticos de activación o inactivación de la expresión de un gen de interés, debido a la acción de uno o varios elementos reguladores. También es posible incorporar a las ecuaciones otros parámetros relevantes, observados experimentalmente, como la tasa de degradación de un producto de interés, entre otros. Los modelos continuos utilizan datos relacionados con la cinética de activación-inactivación de cada elemento, lo que requiere de muchos datos experimentales de tipo cuantitativo. Como desventaja a estos modelos, se puede mencionar que el análisis de los elementos de una red está simplificado a unos cuantos elementos que son clave, ya que es difícil obtener la cinética de regulación de cada nodo de una red de interés, e incluirla en el sistema de ecuaciones diferenciales.

Por otra parte, los modelos discretos analizan la dinámica de los elementos de una red biológica de forma cualitativa. En este caso los nodos son tratados de acuerdo a alguna propiedad observada. Por ejemplo, presencia o ausencia de expresión génica, a la que se puede asignar valores binarios 1 (estado activo) o 0 (estado inactivo). Los modelos discretos son útiles cuando se dispone de poca información sobre parámetros cinéticos de regulación de los nodos de la red. En este caso, los nodos transitan entre estados activos o inactivos a partir de un conjunto de funciones de regulación, que pueden contener operadores lógicos AND, OR, NOT. Las funciones de un modelo discreto ensayan todos los posibles estados de activación/inactivación, hasta que el estado de los nodos de la red quede estacionado. Es decir, que el estado de actividad de cada nodo de la red ya no cambie. El

estado estacionario, también conocido como atractor, representa un estado estable de activación de los elementos que integran una red.

1.2.1 Métodos desarrollados para modelar redes de regulación génica

La elaboración de un modelo requiere de varios pasos a seguir, y el más importante de estos corresponde a la selección del tipo de modelo que se usará, para simular el comportamiento dinámico entre elementos. En la actualidad, se han propuesto dos aproximaciones teórico-metodológicas para construir y modelar redes de regulación génica. La aproximación Bottom-up (de abajo hacia arriba) y la aproximación Top-down (de arriba hacia abajo). La primera requiere evidencia experimental sobre los elementos que integran el sistema de regulación y las interacciones que mantienen. La información debe obtenerse a partir de estudios que indiquen una relación de causa-efecto entre las interacciones que mantienen los elementos del sistema. Por ejemplo, 1) estudios moleculares que indiquen que la interacción de un factor de transcripción, en una región reguladora, promueva o inhiba la actividad de un gen dado. 2) inducción de mutaciones que causen cambio en la actividad de uno o varios genes asociados al sistema (Kulasiri, *et al.* 2008). Mientras que la aproximación llamada Top-down (arriba hacia abajo), también conocida como ingeniería reversa, se basa en la inferencia de redes a partir del análisis computacional de datos generados por técnicas de alto rendimiento como microarreglos de expresión (Bansal, *et al.* 2007; Gardner y Faith, 2005). De manera simultánea a la elección de la aproximación teórica-metodológica, se deben identificar los elementos clave de la red que se quiere modelar y las interacciones que mantienen entre ellos. En el caso de la aproximación de abajo hacia arriba, la identificación de interacciones entre elementos de una red, puede iniciar a partir de una búsqueda de estudios experimentales en artículos científicos. El siguiente paso en la elaboración de modelos, sin importar el tipo de aproximación, consiste en la formulación del conjunto de ecuaciones o funciones, que serán procesadas por medio de una computadora. Se espera que el sistema de funciones pueda describir el proceso o parte del proceso biológico observado. Posteriormente, se pueden simular perturbaciones en el estado de uno o varios nodos con la finalidad de identificar que tan robusto es el modelo creado. Además de identificar aspectos de interés que no hayan sido examinados experimentalmente. Es importante mencionar que el análisis de los estados de los nodos puede servir para hacer inferencias sobre el funcionamiento del sistema biológico, dichas inferencias pueden ser validadas experimentalmente y los resultados servirán de retroalimentación para incrementar la precisión del modelo.

En resumen, con un modelo computacional se pretende: 1) organizar la información proveniente de diversas fuentes de forma coherente; 2) reducirla a un lenguaje de algebra Booleana; 3) ensayar todos los estados posibles de activación/inactivación de los nodos de la red; 4) identificar elementos clave y sus interacciones en el sistema que se está analizando; 5) hacer inferencias que permitan plantear preguntas al sistema que se está estudiando.

1.2.2 Modelos Booleanos aplicados al desarrollo

Mendoza y Alvarez-Buylla (1998) presentaron un modelo computacional que consideraba interacciones entre 11 genes asociados al desarrollo de sépalos, pétalos, estambres y carpelos. Las interacciones entre dichos elementos fueron inferidas a partir de la recopilación de estudios experimentales previos, relacionados con la inducción de mutaciones y observación de fenotipos resultantes, además de análisis moleculares relacionados al cambio en los niveles de expresión génica en condiciones silvestres y en mutantes. En el modelo computacional se consideraron asas de retroalimentación positiva y negativa, además se asignó un valor numérico para indicar el peso de cada interacción en la red.

El estado de activación-inactivación de cada nodo de la red, fue evaluado a partir de la elaboración de una ecuación general, que consideraba el estado (activo/inactivo) de los otros nodos con los que interacciona, más un parámetro de activación. La ecuación fue resuelta a partir de análisis computacional que generó seis atractores, de los cuales cinco tenían un equivalente con los patrones de expresión génica observados experimentalmente. Un aspecto importante del modelo computacional es que tiene la virtud de ser consistente con un modelo de desarrollo de estructuras florales conocido como ABC, propuesto por Weigel y Meyerowitz, 1994. Dicho modelo consideraba que el desarrollo de estructuras florales estaba asociado a una red de regulación génica. Dicha red fue inferida a partir de estudios de mutantes experimentales y observación de fenotipos. Con la propuesta de Weigel y Meyerowitz (1994), se identificaron los elementos clave en el desarrollo de la flor. Sin embargo, la dinámica de interacción entre dichos elementos fue empírica. Con el modelo computacional de Mendoza y Alvarez-Buylla (1998), se pudo simular la dinámica de interacción de los elementos. Con su modelo, los autores distinguen entre nodos en el que su estado inicial afecta el estado del atractor final y nodos en los cuales su estado inicial no afecta el estado del atractor final. Esta información es muy importante porque identifica a los genes clave en el desarrollo de las estructuras de la flor.

2. JUSTIFICACION

Los modelos computacionales en el área de las ciencias biológicas representan una herramienta que permite un mejor entendimiento de procesos complejos. La determinación del sexo es un proceso conservado en mamíferos. Implica un mecanismo molecular integrado por múltiples genes que forman una red. Estos genes se expresan de forma precisa en la gónada bipotencial, durante la determinación del sexo y diferenciación hacia el linaje de células de Sertoli o de la granulosa. Sería relevante describir -a través de un modelo- la dinámica de regulación de genes que son clave en este proceso que dará inicio al desarrollo de testículos u ovarios. El Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada servirá para describir dicha dinámica de regulación en condiciones de tipo silvestre, así como en condiciones alteradas de ganancia o pérdida de función de elementos de la red. Con los resultados del modelo, se espera hacer inferencias que deriven en el planteamiento de hipótesis que puedan ser validadas experimentalmente.

3. OBJETIVO GENERAL

Elaborar un modelo computacional de tipo Booleano, que describa la dinámica de estados de activación/inactivación, de genes clave para el proceso de determinación y diferenciación hacia linajes de células de Sertoli o de la granulosa.

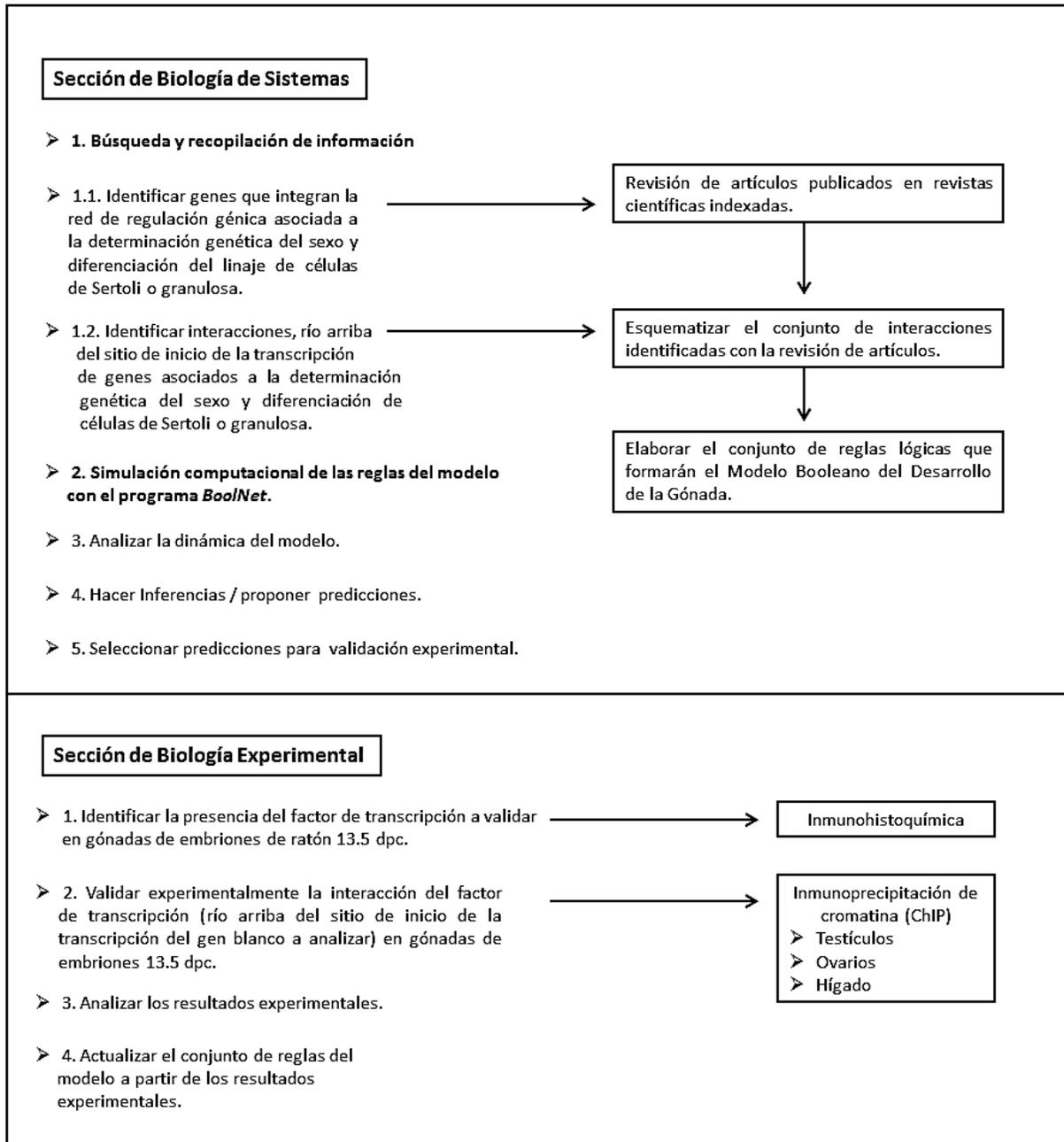
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Inferir la red de desarrollo de la gónada humana a partir de la revisión de datos experimentales reportados en revistas indexadas.
- 2.** Elaborar el Modelo Booleano del desarrollo de la gónada en humano.
- 3.** Simular perturbaciones en los componentes de la red (ganancia o pérdida de función), con el fin de identificar la dinámica que pueda estar asociada a alteraciones en el desarrollo gonadal.
- 4.** Hacer predicciones con el modelo dinámico y validar alguna de estas por la vía experimental.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

A continuación se resumen los pasos que se siguieron en el campo de la Biología de Sistemas y Biología Experimental para la elaboración del Modelo Booleano de Desarrollo de la Gónada y validación de una de sus predicciones.



4.2 MATERIALES Y MÉTODOS PARA ELABORAR EL MODELO BOOLEANO DEL DESARROLLO DE LA GÓNADA

4.2.1 Búsqueda de información e identificación de interacciones

Para elaborar el modelo, se buscó de forma sistemática y exhaustiva artículos que presentaban resultados experimentales de los genes más relevantes asociados al establecimiento de la cresta urogenital y primordio de la gónada; al proceso de determinación del sexo y durante la etapa temprana de diferenciación hacia Sertoli o granulosa. Los artículos se buscaron en diferentes bases de datos como: GoPubMed (<http://www.gpubmed.org>); Web of Science (<http://www.webofknowledge.com>) Específicamente, se revisaron: 1) artículos que reportaron a nivel experimental interacciones de regulación de la expresión génica, especialmente por factores de transcripción; 2) Se revisaron estudios de mutaciones asociadas a pérdida o ganancia de función, y el efecto que tenían en la expresión de otros genes asociados a la red de desarrollo de la gónada; 3) Se revisaron patrones de expresión espaciales y temporales, dirigidos a mRNA y factores de transcripción presentes durante la etapa de gonadal bipotencial, durante la ventana de determinación y durante la diferenciación hacia Sertoli o granulosa. Cabe mencionar que se incluyeron algunas interacciones reportadas en estudios con ratón, esto ocurrió especialmente en la vía femenina, porque no se encontró información en el humano.

4.2.2 Esquematización del conjunto de interacciones identificadas a través de la revisión de artículos

Se elaboró un esquema de red con el programa yEd versión 3.10.2 para visualizar el conjunto de interacciones compiladas a través de la revisión de artículos. El esquema de la red contiene 19 nodos, los cuales son una representación gráfica de los genes que se expresan en la etapa bipotencial, durante la determinación y diferenciación hacia células de Sertoli o de la granulosa. Por otra parte, los conectores representan la interacción molecular entre los nodos de la red, que generalmente está mediada por productos de la expresión génica. Por ejemplo, por factores de transcripción. En el esquema de la red, los conectores indican activación o inactivación de un nodo dado.

4.2.3. Elaboración del conjunto de reglas lógicas para el Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada

Se decidió hacer un modelo computacional discreto porque se desconocen los parámetros cinéticos de activación o inactivación de la mayoría de los genes asociados al proceso de desarrollo de la gónada. El modelo discreto requiere información de tipo cualitativo sobre el estado de actividad de

un gen dado, y asigna un valor binario (1) o (0). Para modelar la dinámica del estado activo (1) o inactivo (0) de los nodos de la red, fue necesario elaborar una serie de funciones. Las funciones del modelo contienen operadores de tipo lógico AND, OR, NOT que representan producto, suma y complemento en algebra Booleana. Las simulaciones del modelo se hicieron con el programa BoolNet (Müssel *et al.*, 2010). El tipo de modelación fue síncrona. Es decir, que el estado de activación de todos los nodos de la red se actualiza de forma simultánea. El nodo UGR corresponde al inicio de la simulación en un estado activo (1). Como una forma de evaluar lo robusto del modelo, se simularon 1000 redes independientes. Cada red contenía 19 nodos conectados aleatoriamente. La finalidad de esta prueba fue para comparar los atractores generados por redes aleatorias contra los atractores que resultaron del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada. Por otra parte, con las funciones del modelo se simularon perturbaciones en los nodos de la red. Es decir, se determinó un estado activo o inactivo de uno o varios nodos con la finalidad de simular mutaciones *In silico* como las que han sido observadas a nivel biológico. Para mutaciones asociadas con ganancia de función se determinó el estado activo (1) del nodo de interés. Mientras que para mutaciones asociadas con pérdida de función se determinó el estado inactivo (0) del nodo de interés.

5. RESULTADOS DE LA SECCIÓN DE BIOLOGÍA DE SISTEMAS

5.1 Búsqueda de Información e Identificación de Interacciones

La compilación de las interacciones de factores de transcripción como activadores o represores de la transcripción para un gen blanco, se presenta en la Tabla 4. En total se presentan 44 interacciones. El 73% de las interacciones se obtuvo a partir de la revisión de estudios clínicos, moleculares y observaciones de patrones de expresión en humano. Mientras que el 27% de las interacciones se obtuvo a partir de estudios con ratón. Las interacciones abarcan las etapas de desarrollo de la cresta urogenital; gónada bipotencial; proceso de determinación; inicio de diferenciación hacia Sertoli o granulosa.

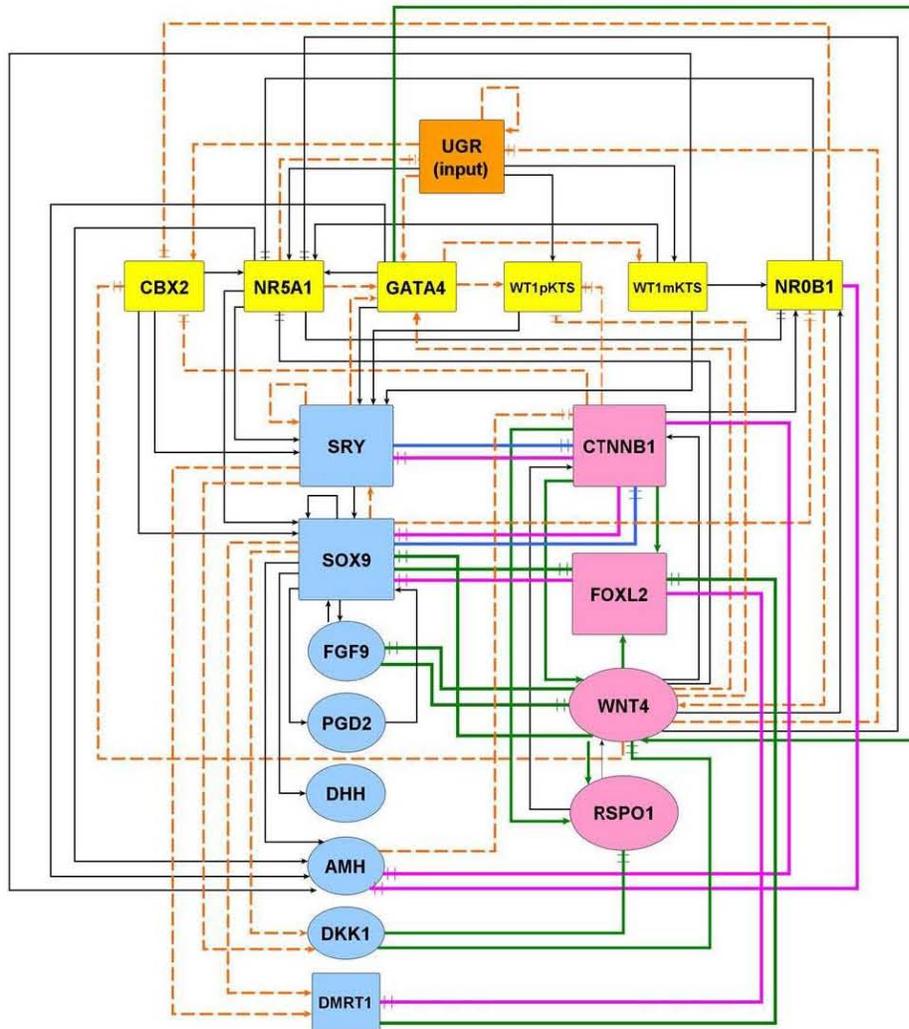
Tabla 4. Revisión bibliográfica de interacciones para elaborar el Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada.				
Factor de transcripción	Interacción	Gen blanco	Especie	Referencias
EMX2	Activa	Cresta urogenital	<i>Mus musculus</i>	Pellegrini <i>et al.</i> , 1997; Ostrer <i>et al.</i> , 2007
LHX1	Activa	Cresta urogenital	<i>Homo sapiens</i>	Kobayashi <i>et al.</i> , 2004
LHX9+WT1mKTS	Activa	<i>NR5A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Wilhelm y Englert, 2002; Ostrer <i>et al.</i> , 2007
PAX2	Activa	<i>WT1</i>	<i>Homo sapiens</i>	McConnell <i>et al.</i> , 1997; Torres <i>et al.</i> , 1995
PAX8	Activa	<i>WT1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Fraizer <i>et al.</i> , 1997
CBX2	Activa	<i>NR5A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Biason-Lauber <i>et al.</i> , 2009
CBX2	Activa	<i>SRY</i>	<i>Homo sapiens</i>	Biason-Lauber <i>et al.</i> , 2009
CBX2	Activa	<i>SOX9</i>	<i>Homo sapiens</i>	Biason-Lauber <i>et al.</i> , 2009
GATA4/FOG2+NR5A1	Activa	<i>AMH</i>	<i>Homo sapiens</i>	Tremblay y Viger, 1999; Tremblay <i>et al.</i> , 2001 White <i>et al.</i> , 2011
GATA4+FOG2	Activa	<i>SRY</i>	<i>Homo sapiens</i>	Lourenco <i>et al.</i> , 2011; Su y Lau, 1993
GATA4+WT1pKTS	Activa	<i>SRY</i>	<i>Homo sapiens</i>	Miyamoto <i>et al.</i> , 2008
GATA4	Activa	<i>Wnt4</i>	<i>Mus musculus</i>	Manuylov <i>et al.</i> , 2008
WT1mKTS	Activa	<i>NR5A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Nachtigal <i>et al.</i> , 1998; Wilhelm y Englert, 2002
WT1mKTS	Activa	<i>NROB1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Kim <i>et al.</i> , 1999
WT1mKTS	Activa	<i>SRY</i>	<i>Homo sapiens</i>	Shimamura <i>et al.</i> , 1997; Hersmus <i>et al.</i> , 2012
WT1mKTS+NR5A1	Activa	<i>AMH</i>	<i>Homo sapiens</i>	Shimamura <i>et al.</i> , 1997; Wilhelm y Englert, 2002
WT1mKTS+NR5A1	Activa	<i>SRY</i>	<i>Homo sapiens</i>	Achermann <i>et al.</i> , 1999; De Santa Barbara <i>et al.</i> , 2000;

NR5A1	Activa	<i>NR0B1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Tantawy <i>et al.</i> , 2014
DAX1	Inhibe	<i>NR5A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Achermann <i>et al.</i> , 2001; Burris <i>et al.</i> , 1995 Mizusaki <i>et al.</i> , 2003; Vilain <i>et al.</i> , 1997
NR5A1+GATA4+Wt1	Activa	<i>AMH</i>	<i>Homo sapiens</i>	Achermann <i>et al.</i> , 1999 Crawford <i>et al.</i> , 1998 Ito <i>et al.</i> , 1997
SRY+NR5A1	Activa	<i>SOX9</i>	<i>Homo sapiens</i>	Nachtigal <i>et al.</i> , 1998; Tremblay y Viger, 2001
SRY	Activa	<i>SOX9</i>	<i>Homo sapiens</i>	Sekido y Lovell-Badge, 2008 Klower <i>et al.</i> , 2011
SRY	Inhibe	<i>CTNNB1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2008
SOX9	Activa	<i>Sry</i>	<i>Mus musculus</i>	Daneau <i>et al.</i> , 2002; Ross <i>et al.</i> , 2008
SOX9	Activa	<i>Fgf9</i>	<i>Mus musculus</i>	Colvin <i>et al.</i> , 2001
SOX9	Activa	<i>PGD2</i>	<i>Homo sapiens</i>	Wilhelm <i>et al.</i> , 2007b; Moniot <i>et al.</i> , 2009
SOX9+NR5A1	Activa	<i>AMH</i>	<i>Homo sapiens</i>	De Santa Barbara <i>et al.</i> , 1998 De Santa Barbara <i>et al.</i> , 2000
SOX9	Inhibe	<i>CTNNB1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2008
SOX9	Inhibe	<i>FOXL2</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hersmus <i>et al.</i> , 2008
FGF9	Activa	<i>Sox9</i>	<i>Mus musculus</i>	Colvin <i>et al.</i> , 2001; Schmahl <i>et al.</i> 2004 Kim <i>et al.</i> , 2006
FGF9	Inhibe	<i>Wnt4</i>	<i>Mus musculus</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006
PGD2	Activa	<i>SOX9</i>	<i>Homo sapiens</i>	Wilhelm <i>et al.</i> , 2007 Moniot <i>et al.</i> , 2009
DKK1	Inhibe	<i>Ctnnb1</i>	<i>Mus musculus</i>	Manuylov <i>et al.</i> , 2008
DKK1	Inhibe	<i>Rspo1</i>	<i>Mus musculus</i>	Manuylov <i>et al.</i> , 2008
WNT4	Activa	<i>NR0B1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Jordan <i>et al.</i> , 2001
WNT4	Inhibe	<i>NR5A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Jordan <i>et al.</i> , 2003
WNT4	Inhibe	<i>Fgf9</i>	<i>Mus musculus</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006
WNT4	Inhibe	<i>Sox9</i>	<i>Mus musculus</i>	Kim <i>et al.</i> , 2006
RSPO1	Activa	Vía <i>Wnt4/B-catenina</i>	<i>Homo sapiens</i>	Tomaselli <i>et al.</i> , 2011; Bernard <i>et al.</i> , 2008
FOXL2	Inhibe	<i>NR5A1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Park <i>et al.</i> , 2010
FOXL2	Inhibe	<i>SOX9</i>	<i>Homo sapiens</i>	Hersmus <i>et al.</i> , 2008
FOXL2	Inhibe	<i>DMRT1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Matson <i>et al.</i> , 2011
B-catenina	Activa	<i>Foxl2</i>	<i>Mus musculus</i>	Manuylov <i>et al.</i> , 2008
B-catenina	Inhibe	<i>Sry, Sox9, Amh</i>	<i>Mus musculus</i>	Maatouk <i>et al.</i> , 2008

5.2 Esquema de la red de determinación del sexo y diferenciación hacia Sertoli o Granulosa

La red (Figura 1), contiene 19 nodos y un total de 78 interacciones. 42 fueron confirmadas en el humano; 12 fueron confirmadas en ratón; mientras que 24 interacciones fueron inferencias del análisis de los estados de transición simulados con el modelo Booleano. La red incluye un nodo especial llamado UGR que corresponde a la cresta urogenital (estructura precursora de riñones y gónadas). Este nodo agrupa la expresión de los genes *LHX1*, *LHX9*, *EMX2*, *PAX2* y *PAX8*. Se ha identificado que la expresión de estos genes es esencial para el establecimiento y mantenimiento de la cresta urogenital, debido a que la pérdida de función compromete el desarrollo de riñones y/o gónadas. Dado lo anterior, el nodo UGR marca el inicio en el esquema de la red y sirve como entrada en las simulaciones del modelo Booleano siempre en estado activo, es decir (1).

En el esquema de la red, se describen dos fases en el desarrollo de la gónada. La primera fase corresponde a las interacciones entre los nodos UGR, CBX2, NR5A1, GATA4, WT1pKTS, WT1mKTS, en la etapa de cresta urogenital y primordio gonadal bipotencial. La segunda fase corresponde al establecimiento de la vía masculina/femenina. El nodo SRY en estado activo, conducirá a la activación de nodos asociados al linaje de células de Sertoli en testículo. En ausencia de SRY, la vía Wnt4- β -catenina conducirá a la activación de nodos asociados a la diferenciación del linaje de células de la granulosa en ovario. Los nodos en color azul (Figura 1) corresponden a la señal de determinación y vía de diferenciación hacia células de Sertoli. Los nodos son: SRY, SOX9, FGF9, PGD2, DHH, AMH, DKK1, DMRT1. Mientras que los nodos en color rosa corresponden a la vía de diferenciación hacia células de la granulosa. Los nodos son: CTNNB1, WNT4, FOXI2 y RSPO1. Se consideró la vía Wnt4/ β -catenina como elemento regulador clave de los nodos femeninos, debido a que en estudios con ratón se ha observado que la pérdida de esta vía resulta en la pérdida de expresión de genes asociados a la diferenciación hacia células de la granulosa como: *Fst*, *Gng13*, *Foxl2*, *Irx3* y *Sp5* (Manuylov *et al.*, 2008). El modelo considera a la vía masculina y femenina como vías independientes y antagónicas. El mantenimiento de la vía masculina o femenina está determinado por asas de retroalimentación positiva establecidas con elementos propios de cada vía y por inactivación de nodos de la vía contraria.



Simbología de nodos	Simbología de líneas
Cresta urogenital	Interacción validada en humano
Gónada bipotencial	Regulación negativa de genes de la vía masculina a genes de la vía femenina
Vía masculina	Regulación negativa de genes de la vía femenina a genes de la vía masculina
Vía femenina	Interacción validada en ratón
	Activación Inactivación
	Predicción del modelo

Figura 1. Esquema de la red de determinación del sexo. La red requiere del nodo de entrada UGR que activará a nodos en la etapa de gónada bipotencial. La vía masculina/femenina son representadas como vías independientes y antagónicas, El punto de divergencia entre ambas vías está dado por el estado de activación de nodo SRY en la vía masculina, o por el mantenimiento de los nodos de la vía Wnt4/ β -catenina en la vía femenina.

5.3 Reglas Lógicas del Modelo Booleano

El modelo contiene 19 reglas lógicas, una para cada nodo de la red (Tabla 5). El nodo UGR representa el inicio (input) de la simulación y el programa BoolNet asigna valores (0) o (1) a cada elemento dentro de la regla lógica. La simulación del modelo ensaya todos los estados posibles de activación o inactivación hasta llegar a un estado estacionario es decir, que los valores (0) o (1) de cada elemento dentro de un nodo ya no cambien. Cuando todos los nodos alcanzan un estado estable, se llega a un atractor que resume el estado final de cada nodo (resultado de la simulación). El atractor resultante puede ser interpretado a nivel biológico como un patrón de expresión génica en una etapa de desarrollo dada. En el caso del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada, se espera que los atractores resultantes correspondan al patrón de expresión que se observa en células que están en diferenciación hacia Sertoli o granulosa, alrededor de los 28-44 días de desarrollo embrionario en el humano, o entre 10.5 dpc y 13.5 dpc, en ratón.

Tabla 5. Reglas lógicas del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada. En rojo se indican las interacciones inferidas a partir de simulaciones, las cuales requieren de validación experimental.
&= AND; |= OR; != NOT

UGR, **UGR** & ! (**NR5A1** | **WNT4**)
CBX2, **UGR** & ! (**NR0B1** & **WNT4** & **CTNNB1**)
GATA4, (**UGR** | **WNT4** | **NR5A1** | **SRY**)
Wt1mKTS, (UGR | **GATA4**)
WT1pKTS, (UGR | **GATA4**) & ! (**WNT4** & **CTNNB1**)
NR5A1, (UGR | CBX2 | WT1mKTS | GATA4) & ! (NR0B1 & WNT4)
NR0B1, (WT1mKTS | (WNT4 & CTNNB1)) & ! (NR5A1 & **SOX9**)
SRY, ((NR5A1 & WT1mKTS & CBX2) | (GATA4 & WT1pKTS & CBX2 & NR5A1) | (**SOX9** | **SRY**)) & ! (CTNNB1)
SOX9, ((SOX9 & FGF9) | (SRY | PGD2) | (SRY & CBX2) | (GATA4 & NR5A1 & SRY)) & ! (WNT4 | CTNNB1 | FOXL2)
FGF9, SOX9 & ! WNT4
PGD2, SOX9
DMRT1, (**SRY** | **SOX9**) & ! (FOXL2)
DHH, SOX9
DKK1, (**SRY** | **SOX9**)
AMH, ((SOX9 & GATA4 & NR5A1) | (SOX9 & NR5A1 & GATA4 & WT1mKTS)) & ! (NR0B1 & CTNNB1)
WNT4, (GATA4 | (CTNNB1 | RSPO1 | **NR0B1**)) & ! (FGF9 | DKK1)
RSPO1, (WNT4 | CTNNB1) & ! (DKK1)
FOXL2, (WNT4 & CTNNB1) & ! (DMRT1 | SOX9)
CTNNB1, (WNT4 | RSPO1) & ! (SRY | (SOX9 & **AMH**))

5.4. Resultados de la simulación del Modelo Booleano del desarrollo de la gónada

5.4.1 Comportamiento dinámico de la red

El comportamiento dinámico de la red fue analizado de forma exhaustiva al simular 2^{19} estados iniciales. La simulación resultó en tres vectores o atractores de punto fijo (Tabla 6). El primer atractor presenta los siguientes nodos en estado activo: GATA4, WT1mKTS, NR0B1, WNT4, RSPO1, FOXL2, CTNNB1 y presenta la cuenca de atracción más grande (50.95%). Este patrón de activación puede ser interpretado como el patrón de expresión génica observado en células pre-granulosa a granulosa. El segundo atractor presenta los siguientes nodos en estado activo: GATA4, WT1mKTS, WT1pKTS, NR5A1, SRY, SOX9, FGF9, PGD2, DMRT1, DHH, DKK1, AMH y presenta una cuenca de atracción de 48.91%. Este patrón de activación puede ser interpretado como el patrón de expresión génica observado en células pre-Sertoli a Sertoli. Mientras que el tercer atractor resultó ser un vector con sus 19 nodos inactivos (0) y una cuenca de atracción pequeña de 0.14% (Tabla 6). Este atractor en ceros puede ser interpretado a nivel biológico como una estructura ausente de desarrollo y por lo tanto carente de células de Sertoli o granulosa. En el humano se ha observado una forma de disgenesia gonadal completa. Es decir, en lugar de una gónada se observa sólo una estría fibrosa de tejido conectivo.

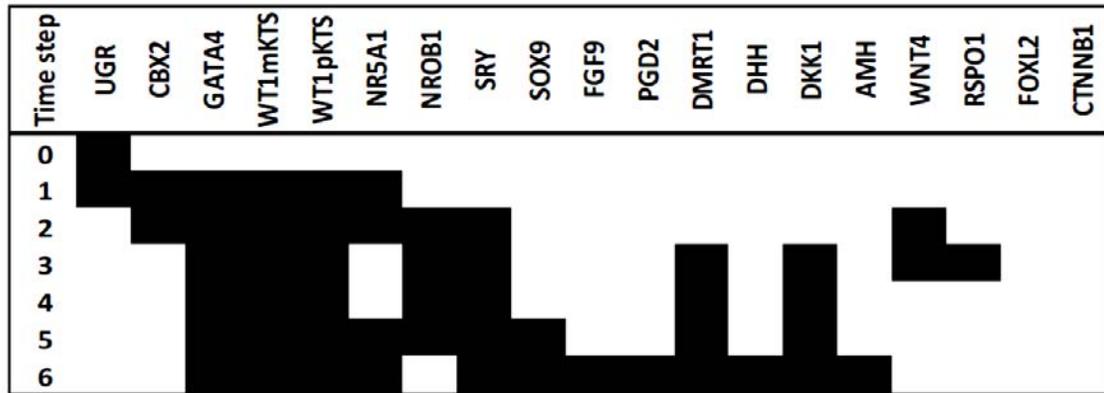
Para modelar la vía masculina de tipo silvestre, se asignó la activación (1) del nodo UGR al inicio de la simulación (Figura 2a). En el siguiente paso de la simulación se puede observar la activación de los nodos que corresponden a la gónada bipotencial seguido de la activación del nodo SRY, que conduce a la activación del nodo SOX9 y a la activación de los nodos asociados a la diferenciación hacia Sertoli (Figura 2a). Para la simulación 46,XX de tipo silvestre, se buscó la condición inicial entre el nodo UGR y los nodos de la vía femenina que dieran como resultado el atractor hacia células de la granulosa (Tabla 6). Se identificó el estado activo de los nodos UGR y WNT4 como condición inicial suficiente para transitar hacia dicho atractor (Figura 2b). En el paso 2 de la simulación se observó la activación de los nodos que corresponden a la gónada bipotencial mientras que un asa de retroalimentación positiva entre WNT4 y CTNNB1 conduce a la activación de los nodos asociados a la diferenciación hacia granulosa en el paso 3 de la simulación (Figura 2b). Nótese que en todas las simulaciones, el nodo UGR debe estar activo como condición inicial. Es importante mencionar que las transiciones que se presentan en la Figura 2a y 2b coinciden con los patrones de expresión génica observados en la etapa de gónada bipotencial, durante el proceso de determinación y en la etapa temprana de diferenciación hacia Sertoli o granulosa. Los atractores que resultaron de la simulación de tipo silvestre (Tabla 6 y Figura 2), corresponden a la etapa de desarrollo embrionario entre los 41-52 días

en humano. Mientras que en el ratón corresponde a los 10.5-13.5 dpc. Por estar confinados a esta etapa de desarrollo, los resultados del modelo deben ser considerados como una imagen instantánea del proceso de regulación de la expresión génica.

Tabla 6. Atractores de punto fijo correspondientes a la determinación del sexo y diferenciación hacia células de Sertoli o granulosa.

UGR	CBX2	GATA4	WT1mKTS	WT1pKTS	NR5A1	NROB1	SRY	SOX9	FGF9	PGD2	DMRT1	DHH	DKK1	AMH	WNT4	RSPO1	FOXL2	CTNNB1	% Simulación	Destino
0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	50.9	Granulosa
0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	48.9	Sertoli
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.14	Estría

a



b

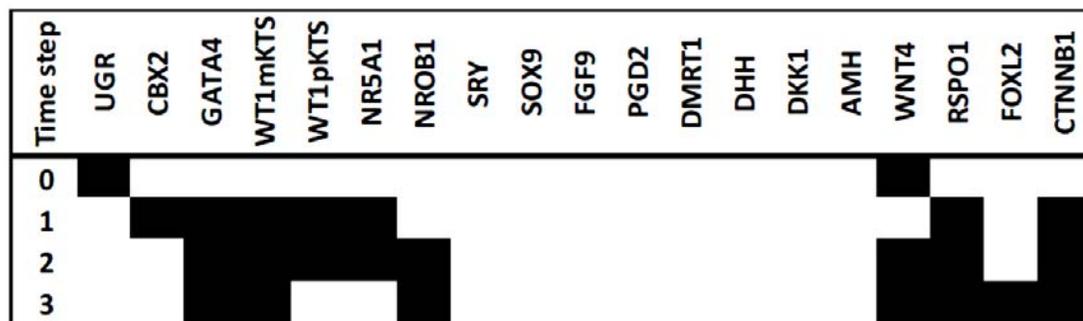


Figura 2. Transiciones hacia el atractor de punto fijo que corresponde a células pre-Sertoli y pre-granulosa. La determinación del sexo de la gónada está dada por la activación del nodo SRY (a). Esta señal marcará el inicio de la vía masculina, que conducirá a la diferenciación de Sertoli. La diferenciación hacia células de la granulosa está dada por el estado inactivo de SRY y por la activación de los nodos UGR y WNT4 (b). Las celdas en negro corresponden al estado activo, mientras que las celdas en blanco corresponden al estado inactivo. El nodo UGR marca el inicio de la simulación y el estado final (en el último renglón) puede ser interpretado como un patrón de expresión génica estable.

5.4.2 Simulación de perturbaciones: ganancia o pérdida de función de los nodos de la red, ADS 46,XX (reversión del sexo femenino a masculino).

Las simulaciones de ganancia o pérdida de función se hicieron con la finalidad de inferir posibles patrones de expresión génica que conduzcan a alteraciones en el desarrollo de la gónada. Se simuló una alteración conocida como ADS 46,XX testicular (también conocida como reversión del sexo de femenino a masculino). Para simular esta alteración, se mantuvo el nodo SRY o el nodo SOX9 en un estado activo (1) durante toda la simulación. En la Figura 3a se puede observar la simulación que correspondería a la alteración 46,XX (*SRY+*). El nodo SRY activa al nodo SOX9 en coordinación con los nodos CBX2, GATA4, WT1 y NR5A1. Mientras que el nodo SOX9 inhibe la vía femenina a través de la inactivación del nodo CTNNB1 que corresponde a β -catenina. En la Figura 3b se puede observar la simulación para el nodo SOX9 en un estado inicial activo (1) que correspondería a la duplicación de SOX9. En ambas simulaciones (Figuras 3a y 3b) se obtiene un estado final semejante al de Sertoli, el cual tiene activados los nodos SRY, SOX9, FGF9, PGD2, DMRT1, DKK1, AMH. Los pacientes que presentan estas alteraciones a nivel genético desarrollan testículos y genitales internos y externos masculinos.

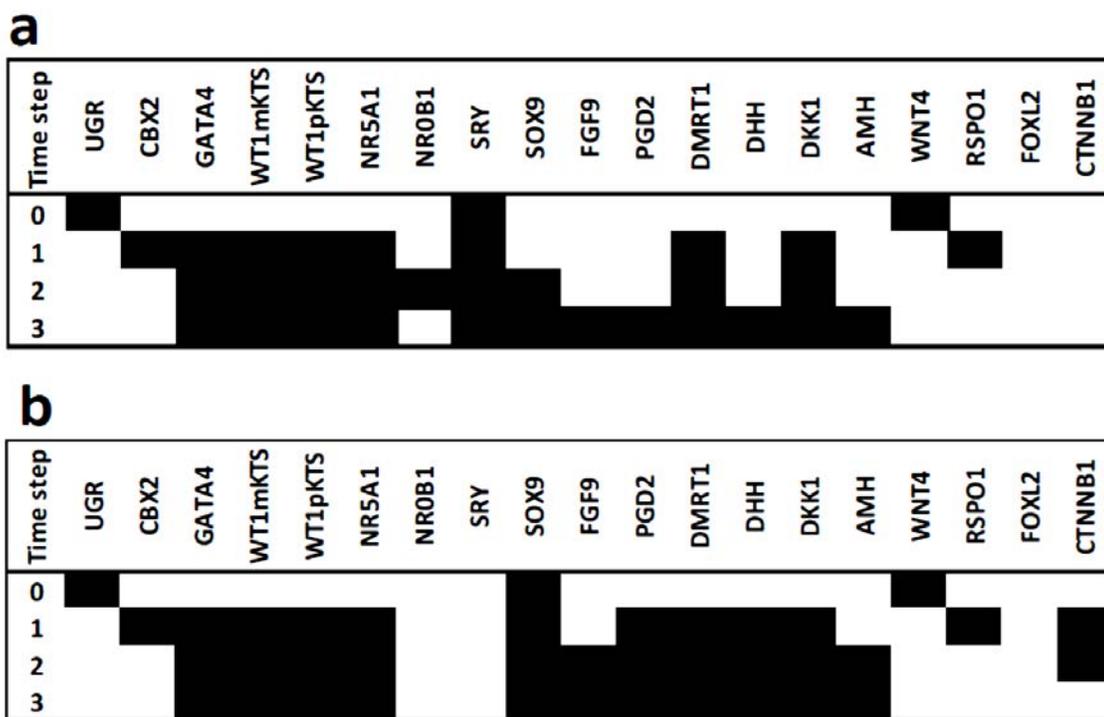


Figura 3. Simulación ADS 46,XX (reversión del sexo femenino a masculino). El nodo SRY se mantuvo en estado activo (1), para simular translocación de SRY en un fondo 46,XX (a). Para simular duplicación de SOX9 en un fondo 46,XX se mantuvo en estado activo (1) al nodo SOX9) (b). Los estados de activación finales son similares a los observados en la vía de diferenciación hacia Sertoli.

5.4.3 ADS 46,XY (reversión del sexo masculino a femenino)

En la Figura 4 se presentan tres simulaciones que resultan en la activación de los nodos de la vía femenina. La primera corresponde a la inactivación del nodo CBX2, que corresponde a la pérdida de función (Figura 4a). La segunda corresponde a la simulación, siempre en estado activo, del nodo NROB1, que corresponde a la duplicación de dicho gen (Figura 4b). La tercera simulación corresponde a inactivación del nodo SRY, que corresponde a la pérdida de función. En los tres casos la vía femenina es activada por los nodos WNT4 y CTNNB1, mientras que la vía masculina es bloqueada a través de los nodos WNT4, CTNNB1 y FOXL2 que inactivan a los nodos de la vía masculina.

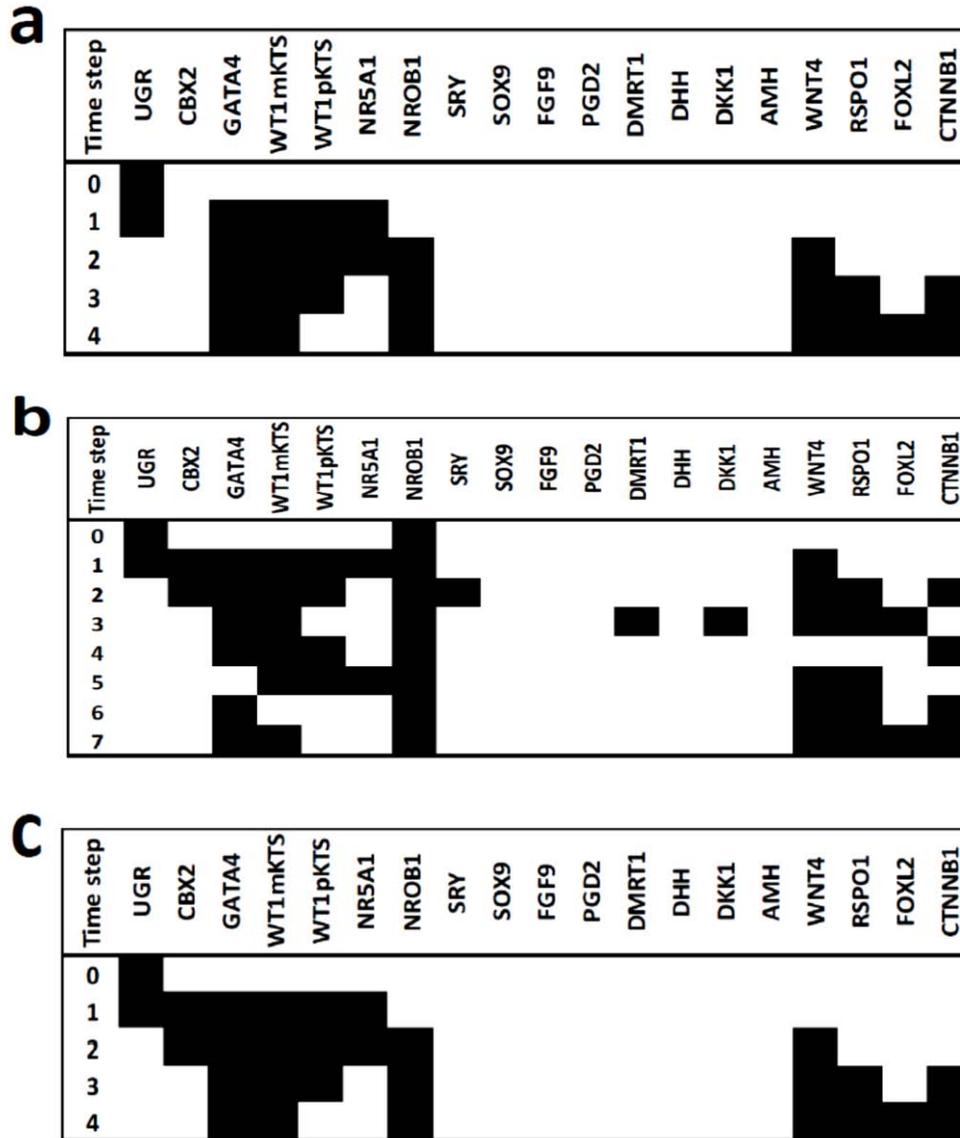


Figura 4. Simulación ADS 46,XY (reversión del sexo masculino a femenino). El nodo CBX2 se mantuvo en estado inactivo (0) con la finalidad de simular una mutación de pérdida de función, lo que resultó en la activación estable de nodos femeninos (a). Para simular ganancia de función por duplicación de NROB1, se mantuvo éste nodo en estado activo (1) y resultó en inactivación de nodos de la vía masculina y activación de nodos de la vía femenina (b). Para simular pérdida de función de SRY se fijó este nodo en estado inactivo (0). Como resultado se obtuvo la inactivación de la vía masculina y activación de nodos femeninos (c).

5.4.4 Simulación de pérdida de función de GATA4

La Figura 5 presenta la simulación de pérdida de función del nodo GATA4 en la vía masculina. Nótese la alteración en los patrones de activación comparado con la simulación de tipo silvestre de la Figura 2. Al final de la simulación se puede observar el estado inactivo de los nodos WT1mKTS, WT1pKTS, NR5A1, AMH debido a que el nodo GATA4 es su regulador positivo. El nodo SRY pudo ser activado debido a interacciones adicionales con los nodos NR5A1, WT1mKTS, CBX2 y una posible asa de retroalimentación con el nodo SOX9, de esta forma el estado de activación alterado que se presenta en la Figura 5 puede interpretarse como el patrón de expresión que conduce a una ADS. Al respecto, el espectro clínico de alteraciones por mutaciones asociadas al gen *GATA4* en pacientes masculinos es variable. Hay pacientes que pueden presentar testículos disgenéticos bilaterales que contienen células de Sertoli pero con ausencia de células de Leydig. Los genitales internos son masculinos mientras que los genitales externos pueden ser normales o ambiguos.



Figura 5. Simulación de pérdida de función de GATA4 en genotipo 46,XY. Se puede observar como resultado la inactivación del nodo AMH aunque persiste el estado activo de los nodos de la vía masculina.

5.4.5 Simulación de pérdida de función de WT1 o NR5A1

La expresión del gen *WT1* en el humano, puede ser observada desde la gónada bipotencial, durante el proceso de determinación y diferenciación hacia células de Sertoli o de la granulosa. Sin embargo, mutaciones en este gen pueden alterar profundamente el desarrollo testicular debido a que participa en la activación de los genes *NR5A1*, *SRY* y *AMH*. Se ha observado que pacientes 46,XY con mutaciones en el gen *WT1* pueden presentar disgenesia gonadal parcial o completa y genitales externos ambiguos a femeninos. El grado de afectación dependerá en gran medida del sitio donde ocurra la mutación, que determinará la funcionalidad del factor de transcripción. Los resultados de la simulación de pérdida de función del nodo *WT1* muestran un atractor con un patrón de activación

similar al de la vía femenina. Por otra parte, se simuló la pérdida de función del nodo NR5A1 y se observó que el patrón de activación era similar al de la vía femenina. Esto se debe a que el nodo NR5A1 participa en la activación de los nodos SRY, SOX9 y AMH. Dado que los nodos de la vía masculina no son activados, la vía Wnt4- β -catenina prosigue con la activación de nodos de la vía femenina.

Tabla 7. Atractores de punto fijo cuando se simula inactivación (0) de los nodos NR5A1 o WT1 en un genotipo 46,XY

Fixed state	UGR	CBX2	GATA4	WT1mKTS	WT1pKTS	NR5A1	NROB1	SRY	SOX9	FGF9	PGD2	DMRT1	DHH	DKK1	AMH	WNT4	RSPO1	FOXL2	CTNNB1
WT1=0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
NR5A1=0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

5.5 Redes aleatorias, pruebas de robustez y predicciones del modelo

Para probar si la topología de la red y los atractores de tipo silvestre del modelo Booleano podían ser obtenidos de forma aleatoria, se hicieron tres pruebas computacionales independientes. En cada prueba se crearon y analizaron 1000 redes consistentes de 19 nodos cada una. A cada red se le asignó una conexión aleatoria entre sus nodos. Con estos parámetros se analizó el número de atractores finales para cada red. En promedio se obtuvieron 103,000 atractores para cada prueba independiente y ninguna de las redes al azar obtuvo tres atractores de punto fijo como los obtenidos en el Modelo Booleano (Tabla 6). Estos resultados indican que los atractores del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada no pueden ser recreados en una red hecha con interacciones al azar. Por esta razón los atractores de la Tabla 6 y las simulaciones de tipo silvestre (Figura 2) pueden ser consideradas con significado biológico y no un artefacto computacional. Por otra parte, con la prueba de robustez del Modelo Booleano, se observó en el 95% de las redes perturbadas, que menos del 30% de los atractores de la Tabla 6 podía ser recuperado. Estos resultados indican que el modelo es sensible a la perturbación, debido en parte a la poca redundancia en la función de los nodos de la red. Se esperaría que la inclusión de más nodos con asas de retroalimentación positiva pueda incrementar la robustez del modelo.

Respecto a las predicciones del modelo el 66% (16 interacciones), corresponden a los nodos de la cresta genital y gónada bipotencial. Este resultado indica que se deben enfocar esfuerzos de investigación a los genes que se expresan previo a *SRY*. Por ejemplo, los genes *WT1*, *NR5A1*, *NROB1* y

GATA4 se expresan desde la gónada bipotencial, pero se sabe poco sobre los elementos que promueven y mantienen su activación. Por ejemplo, el gen *LHX1* promueve la activación de *NR5A1* (Wilhelm y Englert, 2002; Ostrer *et al.*, 2007), mientras que otros factores de transcripción de la familia PAX promueven la activación de *WT1* (McConnell *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 1995).

En resumen, el modelo Booleano describe la dinámica de regulación de la expresión de genes asociados al desarrollo de la gónada. Solo fueron necesarios 19 nodos para activar y mantener las vías de desarrollo masculino/femenino. Por lo tanto, consideramos que estos elementos forman el núcleo de la red. Para la activación de la vía masculina, se requiere de la activación del nodo SRY, que activará al nodo SOX9. El mantenimiento de la vía es posible por asas de retroalimentación positiva entre los nodos SOX9, FGF9 y PGD2 e inactivación de los nodos femeninos, especialmente de los nodos WNT4 y CTNBB1. En ausencia de SRY, los nodos WNT4, CTNBB1 y RSPO1 mantienen un asa de retroalimentación positiva y activan a nodos río abajo como FOXL2. Este nodo mantiene la vía femenina al inactivar a los nodos SOX9 y DMRT1. Es importante mencionar que la vía femenina está menos caracterizada en el humano y la información disponible proviene de estudios experimentales con ratón. El presente modelo debe ser considerado como un punto de inicio para futuros modelos ya que es posible integrar nueva información experimental. El modelo puede seguir creciendo en complejidad conforme se integren nuevos nodos y conforme se integren al modelo otros linajes de células como las germinales, las células de Leydig en testículo o las células de la teca en ovario.

6. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE UNA PREDICCIÓN DEL MODELO BOOLEANO DEL DESARROLLO DE LA GÓNADA

El gen *WT1* tiene un papel importante en la vía masculina porque interacciona con otros factores de transcripción para activar la expresión de los genes *NR5A1*, *SRY* y *AMH*. A partir del análisis de los estados de activación de los nodos de la red, se infirió que el nodo GATA4 participaba en la activación del nodo WT1. Por otra parte, por estudios experimentales en ratón, se reportó que *Gata4* y su regulador *Fog2* tienen un papel importante en la activación de genes de la vía femenina como: *Fst*, *Wnt4*, *Sprr2d*, *Foxl2*, *Gng13*. Dado lo anterior, consideramos que *Gata4* puede ser un elemento clave en la activación de genes asociados a vía masculina y femenina. Por lo tanto, consideramos relevante analizar experimentalmente la predicción relacionada al factor de transcripción GATA4 como elemento activador del gen *WT1*. Para que esto pueda suceder GATA4 debe reconocer un motivo de DNA, río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *WT1*. Consideramos como primer paso experimental, identificar en el ratón, el reconocimiento y unión del factor de transcripción GATA4 río arriba de del gen *Wt1*, entre otros genes asociados el desarrollo de la gónada como *Amh*, *Lrp4* en vía masculina y *Sp5*, *Sprr2d* en vía femenina.

6.1. Validación de la unión de GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *Wt1*, *Amh*, *Lrp4*, *Sp5* y *Sprr2d*.

El factor de transcripción GATA4 tiene la capacidad de reconocer y unirse a la secuencia motivo de DNA [AT]GATA[AG]. El objetivo de la validación consiste en identificar si GATA4 se une al motivo de DNA, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Wt1* y otros genes asociados a la vía testicular como *Amh* y *Lrp4* o a la vía ovárica como *Sp5* y *Sprr2d* en el ratón. La validación experimental consistió en 1) Identificación a nivel bioinformático de la secuencia motivo [AT]GATA[AG] en los blancos arriba mencionados; 2) Ensayos de inmunofluorescencia con el anticuerpo GATA4, en la cresta genital de embriones de ratón 10.5dpc; en gónadas en vía de diferenciación de embriones de ratón 13.5 dpc; en gónadas diferenciadas de ratones 10 días post parto; 3) Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de testículos y ovarios de embriones de ratón 13.5 dpc. Es importante mencionar que también se hicieron ensayos de ChIP en células de tejido hepático de embriones XY y XX de 13.5 dpc. Los ensayos en tejido hepático se hicieron para obtener resultados independientes de gónadas. Se seleccionó el hígado porque está disponible un estudio de ChIP-secuenciación con el anticuerpo anti-GATA4 C-20 (Santa Cruz) en hígado de ratón adulto (Zheng *et al.*, 2013), Este estudio es útil porque permitió visualizar *-a priori-* posibles sitios de

unión del factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes que se interesa analizar. Los materiales y métodos se presentan a continuación.

6.2 Confirmación de la secuencia motivo [AT]GATA[AG] que reconoce GATA4

Para analizar experimentalmente la predicción del modelo, fue necesario confirmar en primer lugar que existiera la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Wt1*. La confirmación de la secuencia motivo se obtuvo después del análisis bioinformático de la secuencia de referencia del gen *Wt1* del genoma de ratón (NCBI37/mm9), depositada en Genome Browser. Además, se buscó 1) secuencia consenso que reconoce TFIIIB; 2) secuencia consenso TATA box; 3) secuencia consenso de inicio; 4) secuencia consenso del elemento promotor río abajo; 5) secuencia consenso que reconoce SOX9; 6) secuencia consenso que reconoce DMRT1. Las secuencias arriba mencionadas se buscaron por las siguientes razones: 1) Para identificar la combinación de secuencias asociadas a la región promotora proximal; 2) Para saber que tan distal es la secuencia motivo [AT]GATA[AG] de la región promotora proximal; 3) Para identificar posibles interacciones entre los factores de transcripción GATA4, SOX9 y DMRT1. El análisis bioinformático abarcó hasta 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Wt1*. Adicionalmente, se consideró útil identificar a nivel bioinformático las secuencias promotoras arriba mencionadas y las secuencias motivo que reconocen GATA4, SOX9 y DMRT1, en otros genes asociados a la diferenciación de Sertoli o de la granulosa, que se caracterizan por tener un patrón de expresión dimórfico como: *Amh* y *Lrp4* en Sertoli o *Sp5* y *Sprr2d* en células de la granulosa (Munger *et al.* 2013). Todos los análisis bioinformáticos fueron elaborados con las secuencias de referencia del genoma de ratón (NCBI37/mm9) de julio 2007, disponibles en UCSC Genome Browser Gateway. Para la búsqueda de las secuencias motivo arriba mencionadas se utilizó el programa Find Individual Motif Occurrences (FIMO) versión 4.12.0 (Grant *et al.*, 2011). Por otra parte, se consultaron los perfiles de ChIP-seq que se hicieron con el anticuerpo anti-GATA4 C-20 (Santa Cruz) en hígado de ratón adulto, elaborados por (Zheng *et al.*, 2013) y depositados en la base de datos WashU EpiGenome Browser (<http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/>). Con un perfil de ChIP-seq, se puede identificar enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados, en este caso con el anticuerpo arriba mencionado. Los fragmentos enriquecidos corresponden a diferentes regiones del genoma a la que estaba unido el factor de transcripción GATA4, con su secuencia motivo de DNA la cual es: [AT]GATA[AG]. Dado que GATA4 funciona como activador de la transcripción, se buscó señal de enriquecimiento río arriba de los genes *Wt1*, *Amh*, *Lrp4*, *Sp5* y *Sprr2d*.

6.3 Especímenes para la validación experimental

Para la validación experimental de la predicción del modelo, se requirió de la cresta genital y la gónada en desarrollo de embriones de ratón de 10.5 dpc y 13.5 dpc, con la finalidad de hacer ensayos de inmunohistoquímica e inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Para cumplir con este objetivo, se usó como modelo de estudio a ratones de laboratorio *mus musculus* de la cepa CD-1 (20 hembras y 2 machos). La población de ratones fue alojada en las instalaciones del bioterio del Instituto Nacional de Pediatría, con previa autorización del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), con folio de oficio de autorización INV/B/RGC/064/16. Todos los especímenes se mantuvieron con alimento y agua suministrada *ad libitum*, en un ambiente controlado con 12h de luz y 12h de oscuridad y fueron manejados de acuerdo a los requerimientos que determina la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio, SAGARPA 1999. Todos los especímenes fueron suministrados por la empresa Envigo RMS S. A de C. V (antes Harlan Laboratories). Se cruzaron hembras y machos adultos en condición silvestre durante las 12h correspondientes al periodo de oscuridad. Al día siguiente se observó la presencia o ausencia de tapón vaginal. En caso de observarse el tapón, se determinó ese día como el día cero posterior al coito. Las hembras gestantes fueron sacrificadas a 10.5 dpc y 13.5 dpc, con la finalidad de diseccionar los complejos urogenitales de los embriones, para hacer ensayos de inmunofluorescencia en ambas etapas de desarrollo y de inmunoprecipitación de cromatina en la etapa de 13.5 dpc. Adicionalmente, se disecó hígado de los embriones 13.5 dpc, con la finalidad de tener otro tejido de comparación en los ensayos de ChIP. El sacrificio y las disecciones se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Horacio Merchant Larios; Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. El método de sacrificio se realizó de acuerdo a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999. Todos los residuos biológicos se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental- salud ambiental- residuos peligrosos biológico-infecciosos- clasificación y especificaciones de manejo. SSA, 2002.

6.4 Disección y preparación de gónadas de embriones de ratón 13.5 dpc, para ensayos CHIP

Se siguió el método de disección y manejo de gónadas de embriones de ratón 13.5 dpc, reportado por Li y colaboradores (2014), que se describe a continuación: las gónadas se disecaron con ayuda de un estereomicroscopio, pinzas y tijeras de disección. Se realizó un corte en el embrión a lo largo de la línea media ventral a la altura del complejo urogenital, el cual es visible sobre la pared dorsal del embrión. Los complejos urogenitales de embriones 40,XY o embriones 40,XX se disecaron y agruparon en cajas de Petri separadas que contenían medio Dubelcco (DMEM), adicionado con suero fetal bovino al 10% y se mantuvieron en frío hasta agrupar todos los complejos. Posteriormente, se removió el mesonéfrs para quedar con testículos agrupados u ovarios agrupados. Las gónadas se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5ml y se suspendieron en 500µl de medio DMEM + 500µl de tripsina al 0.05% y con ayuda de una jeringa para insulina se disgregó el tejido. Posteriormente, se centrifugaron los tubos a 5000rpm por 4 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 900µl de medio DMEM al 1% de formaldehido para inducir enlaces covalentes cruzados de proteínas asociadas con DNA (cross links). El tiempo de fijación fue de 10 minutos a temperatura ambiente y agitación constante. Pasado este tiempo, la acción del formaldehido fue detenida al agregar 100µl de glicina 1.25M. El tejido permaneció en agitación constante por 5 minutos. Posteriormente, el tejido se centrifugó a 5000rpm durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante y se agregaron 900µl de PBS (1X) frío para lavar el tejido. Posteriormente, el tejido se centrifugó a 6000rpm por 4 minutos. El sobrenadante se descartó y el tubo con el botón de gónadas disgregadas y fijadas se colocó en hielo seco por unos minutos para después guardarse en un ultracongelador a -70°C.

6.5 Fragmentación de la cromatina

Los botones de gónadas disgregadas y congeladas (aproximadamente 50 testículos y 50 ovarios de embriones 13.5 dpc) se resuspendieron y agruparon en un tubo Eppendorf de 1.5ml para testículos y otro para ovarios. A cada tubo se agregó 500µl de Buffer de Lisis (Epigentek Group Inc.) y se dejó en incubación en hielo y agitación ocasional durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Después se agregaron 400µl de buffer ChIP (Epigentek Group Inc.). Las muestras se sonicaron con un sonicador Branson, en dos pulsos de 30 segundos por un minuto de descanso entre pulsos y 30% de intensidad de sonicación. Para visualizar la fragmentación de la cromatina, se tomó una alícuota del sonicado y se extrajo el DNA. El DNA purificado se visualizó por medio de un gel de agarosa al 1.5%. Los fragmentos de cromatina debían estar en un rango de 200 a 700pb con un pico en 300pb. El resto de la cromatina se centrifugó a

12,000rpm a 4°C por 10 min y el sobrenadante se traspasó a un tubo nuevo que fue almacenado a -70°C hasta el ensayo de ChIP (Rizzo y Buck, 2011).

6.6 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Para el ensayo de ChIP se siguió el protocolo de Dahl y Collas (2008) con modificaciones. Cada ensayo se elaboró con 25µl de perlas magnetizadas (Dynabeads Protein G, Life Technologies) y con tubos Eppendorf de 1.5ml. Las perlas se re-suspendieron en 300µl de buffer RIPA (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 1% (vol/vol) Triton X-100, 0.1% (wt/vol) SDS, 0.1% (wt/vol) deoxicolato de sodio y BSA (5mg/ml). Se agregó seroalbúmina bovina (BSA) para hacer un bloqueo de las perlas y evitar unión inespecífica de cromatina. Las perlas se incubaron en un rotor durante 2h a 4°C a 25rpm. Después del tiempo de bloqueo se hizo un lavado con buffer RIPA sin BSA. Posteriormente, las perlas bloqueadas y lavadas se aforaron en 300µl de buffer RIPA sin BSA, con 1µg de cromatina fragmentada y 2.4µg del anticuerpo de interés. Para todos los ensayos se utilizaron los siguientes anticuerpos: anticuerpo monoclonal GATA4 (G4): sc25310 (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo monoclonal RNA pol II CTD4H8 (Epigentek) como control positivo del ensayo; inmunoglobulina no específica (IgG) (Epigentek) como control negativo del ensayo. De forma adicional se realizó un control negativo extra que consistió en cromatina que no fue expuesta a anticuerpos (MOC). La mezcla de perlas, cromatina y anticuerpo se mantuvo en rotación (25rpm) a 4° toda la noche. Posteriormente se hicieron tres lavados con 500µl buffer RIPA frío (5 minutos por lavado, en rotación a 25rpm). Después se hizo un lavado con 500µl de Buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA). El contenido de los tubos se transfirió a un tubo nuevo, se removió el buffer TE y se agregaron 300µl de buffer de elusión (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% (wt/vol) SDS, 5µl de proteinasa K por muestra ensayada). Los tubos se incubaron a 55°C por 2h con agitación constante a 1000rpm. Después de la incubación se enfrió en hielo y posteriormente se agregaron 200µl de solución precipitadora de proteínas (Qiagen). Todas las muestras se mantuvieron en hielo por 10 minutos con agitación ocasional. Posteriormente, se centrifugó a 12700rpm a 4°C durante 5min. La fase acuosa se tomó con jeringas de insulina y se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5ml con 500µl de isopropanol más 2µl de glicógeno y 45µl de acetato de sodio 3M. Los tubos se guardaron a -70°C toda la noche. Al día siguiente se descongelaron las muestras y se mantuvieron en rotación (25rpm) a 4°C durante 20minutos. Posteriormente se centrifugó a 13,000rpm a 4°C durante 10minutos. Con ayuda de jeringas de insulina se removió el isopropanol con cuidado de no tocar el botón de DNA precipitado. Después se agregaron 500µl de etanol al 70% a cada tubo y se mantuvo en

agitación por 15min a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13,000rpm a 4°C durante 7 minutos. El etanol se removió con ayuda de jeringas de insulina con cuidado de no tocar el botón de DNA. Los tubos se dejaron secar durante 10 minutos aproximadamente y finalmente el botón de DNA precipitado y lavado se resuspendió en 22µl de buffer AE (Qiagen). Las muestras permanecieron a 4°C hasta su uso. 2µl del CHIP-DNA de cada muestra fue usado para cuantificar cantidad y calidad de DNA con nanodrop.

6.7 Diseño de oligonucleótidos utilizados para flanquear secuencias específicas de DNA, donde está presente la interacción de GATA4 con los blancos de interés

Para el diseño de los oligonucleótidos se usaron las secuencias de referencia del genoma de ratón NCBI37/mm9 de julio 2007. Primero se bajó la secuencia de los blancos de interés, más 1000pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción y se procedió a la búsqueda del motivo de DNA [AT]GATA[AG]. Ya identificado el motivo, se usó un fragmento de secuencia entre 150pb río arriba y 150pb río debajo de la secuencia motivo. Los fragmentos sirvieron como templados para el diseño de oligonucleótidos. Se usó el programa Primer3Plus <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi> y el programa Primer-Blast del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI por sus siglas en inglés), para el diseño *In silico* de los oligonucleótidos <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> Los oligonucleótidos seleccionados se analizaron con el programa NetPrimer con la finalidad de identificar con precisión la temperatura de alineación y estructuras secundarias como: *hairpins*, *dimers* y *cross dimers* de los oligonucleótidos. <http://www.premierbiosoft.com/netprimer/> Finalmente, las secuencias se sintetizaron en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM. Todos los oligonucleótidos (con excepción de los correspondientes a *Gapdh*) se hicieron específicamente para este trabajo. La temperatura óptima de alineación para cada oligonucleótido se determinó a partir de una PCR con gradiente de temperatura. La Tabla 8 presenta la secuencia de los oligonucleótidos y sus características, mientras que la Tabla 9 indica las condiciones de PCR de punto final para amplificar CHIP-DNA de gónadas e hígado de embriones 13.5 dpc.

Tabla 8. Secuencias de oligonucleótidos usados para validar unión de GATA4.

Blanco	Oligo Forward	Oligo Reverse	Longitud del amplicón (pb)	Tm °C PCR
<i>Sprr2d</i>	5'-TGAGGTTATCATCATTGGTGAGT-3'	5'-GCCCTTCATAGCAGAGACTAATG-3'	114	65°C
<i>Sp5</i>	5'-GTTACCCTCATCCGGTCTC-3'	5'-CCAAGGCAGTGCTCAAAGT-3'	105	66°C
<i>Wt1</i>	5'-CTCAACCTGCGAACCCAGA-3'	5'-GAACCAGAGAGCCAGAGAACT-3'	142	66°C
<i>Lrp4</i>	5'-GCTGAGAGTTGCCAGTACGA-3'	5'-GCTCGCCTTAGCTCCTACTCA-3'	132	66°C
<i>Amh</i>	5'-GAGACAGTCGCCTCCACC-3'	5'-TGAGCCAGATTGCTTGCTTG-3'	108	68°C
<i>Gapdh</i>	5'-TGGAACAGGGAGGAGCAGAGAGCA-3'	5'-TACTCGCGCTTTACGGG-3'	169	69°C

Tabla 9. Condiciones de PCR de punto final para amplificar ChIP-DNA de gónadas e hígado de embriones 13.5dpc.

Concentración inicial	Concentración final 20µl/reacción	*Condiciones de PCR
Buffer 10X sin magnesio	1X= 2 µl	94°C x 5min 94°C x 30s Tm x 15s 72°C x 30s 72°C x 3min 10°C (fin)
MgCl ₂ [25mM]	2mM= 1.6µl	
dNTPs [10mM]	0.25mM= 0.5µl	
Oligo F [10µM]	0.25µM= 0.5µl	
Oligo R [10µM]	0.25µM= 0.5µl	
Glicerol 100%	1%= 0.2µl	
Taq 5u/µl	1u= 0.2µl	
H ₂ O	12 µl	
DNA	2.5µl=6-7ng/Rxn aprox.	

*Todos los blancos se analizaron bajo las mismas condiciones aplicando 15s la temperatura de alineación específica para cada par de oligonucleótidos.

6.8 Ensayos de inmunofluorescencia dirigidos a GATA4

Para los ensayos de inmunofluorescencia se siguieron las recomendaciones de los métodos descritos por Renshaw (2013) en relación al tratamiento y manejo de las muestras previo, durante y posterior al ensayo de inmunofluorescencia. Los métodos se describen a continuación: Se hicieron cortes histológicos de gónadas de ratón para elaborar ensayos de inmunofluorescencia en la etapa de primordio gonadal bipotencial (10.5 dpc); gónadas en vía de diferenciación (13.5 dpc); testículos y ovarios diferenciados (10 días post parto). Se disecaron los complejos urogenitales de embriones 10.5 dpc y 13.5 dpc. En el caso de los ratones de 10 dpp, se disecaron testículos u ovarios. Los tejidos se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 12hrs a 4°C. Posteriormente, el tejido se deshidrató gradualmente al pasar por disoluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30% respectivamente. El tejido se incluyó en medio para congelación (Tissue-Tek O.C.T., Sakura Finetek USA) y se mantuvo a -20°C. Posteriormente, se hicieron cortes seriados transversales de la región urogenital, en un criostato. Los

cortes se montaron en laminillas tratadas con Sulfato de Cromo y grenetina. Las laminillas se desecaron y guardaron a -20°C hasta ser procesadas.

Para el ensayo de inmunofluorescencia, se lavaron las laminillas con PBS 1X pH7.4 (3 veces por cinco minutos). Después se agregó Buffer Tris pH10 (10mM Tris Base, 0.05% Tween 20, pH 10). Las muestras se incubaron a 85°C por 35 minutos, después se dejaron enfriar en hielo. Posteriormente, se dieron tres lavados con PBS 1X pH 7.4. Después se agregaron 100µl de Triton 0.5% en PBS a cada laminilla para permeabilizar membranas. Posteriormente se agregó suero de bloqueo (0.6% Triton, 2%BSA, 10% suero de caballo) y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante dos horas. Pasado ese tiempo se agregó el anticuerpo policlonal GATA-4 (C-20): sc-1237 Santa Cruz Biotechnology, elaborado en cabra, en una dilución 1:300. Las muestras permanecieron en incubación a 4°C toda la noche. Después fueron lavadas con PBS 1X pH7.4 (3 veces por cinco minutos). Posteriormente se agregó el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 488, anti-cabra) en dilución 1:200 con PBS y se dejó en incubación por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñó el núcleo de las células con TOTO (Life Technologies) y se cubrieron con medio para montar tejidos teñidos con fluorocromos (Dako). Las muestras se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su observación en un microscopio confocal (Zeiss LMS Pascal 5).

7. RESULTADOS DE LA VALIDACION EXPERIMENTAL

7.1 Resultados del análisis bioinformático

Los resultados de los análisis bioinformáticos se resumen en los siguientes puntos:

1. En relación a la predicción del modelo, el motivo de DNA que reconoce GATA4 está ubicado a -318pb de la secuencia consenso de inicio del gen *Wt1* (Tabla 10 y Tabla 11). *Wt1* también contiene un motivo que reconoce TFIIB a -127pb la secuencia consenso de inicio (Tabla 12). No se identificaron otros motivos en la región promotora proximal.
2. El motivo de DNA que reconoce GATA4, está presente en todos los genes considerados para la validación experimental. En todos los casos, la localización del motivo fue distal a la región promotora proximal (Tabla 10 y Tabla 11).
3. La localización del motivo que reconoce SOX9 o DMRT1, fue distal a la región promotora proximal. No se encontró cercanía entre la secuencia motivo que reconoce DMRT1 y las secuencias motivo que reconocen SOX9 o GATA4. Sin embargo, en el gen *Spr2d* se encontró cercanía (separación de seis pares de bases), entre el motivo de DNA que reconoce SOX9 y el motivo de DNA que reconoce GATA4. El hallazgo se observó alrededor de 600pb río arriba de TATA box en *Spr2d* (Tabla 11). Esta característica puede sugerir una posible sinergia entre GATA4 y SOX9, con efecto en la regulación de la expresión de *Spr2d*.
4. Cada gen se caracteriza por tener una combinación de secuencias promotoras/reguladoras. La Tabla 10 representa un resumen de las secuencias encontradas para cada gen. En la Tabla 11 se presenta la ubicación de las secuencias motivo que reconocen los factores de transcripción GATA4, SOX9 y DMRT1. Mientras que la Tabla 12 presenta la ubicación en el genoma de las secuencias que forman la región promotora proximal de cada gen.

Tabla 10. Resumen de motivos de DNA encontrados por análisis bioinformático.

Gen	Chr	GATA4	SOX9	DMRT1	TFIIB	TATAbox	Inicio	Elemento promotor río abajo (DPE)
<i>Wt1</i>	2	-318		-531	-127		104,966,625	
<i>Amh</i>	10	-92	-365				80,268,004	
<i>Lrp4</i>	2	-86		-349	91,297,723			91,297,517
<i>Sp5</i>	2	-243	-98 +25		-369 -364	-92	70,312,997	
<i>Spr2d</i>	3	-628 -438	-617 +84	+935		92,143,033	+443 +945	+1
<i>Gapdh</i>	6	-178	-426 -232		-285		125,116,390 125,117,284	

Tabla 11. Localización de los motivos de DNA que reconocen GATA4, SOX9 y DMRT1.

Gen	Región analizada (NCBI37/mm9) julio 2007	Secuencia consenso que reconoce GATA4 [AT]GATA[AG]	Secuencia consenso que reconoce SOX9 [TC]TTG[TA]G	Secuencia consenso que reconoce DMRT1 [AT]ACA[TA]TGT[TA][GT]
<i>Wt1</i>	Chr 2; hebra (+) 104,965,685 104,966,684	-318 a -313	Ausente	-531 a
<i>Amh</i>	Chr 10; hebra (+) 80,266,992 80,268,011	-92 a -87	-365 a -360	Ausente
<i>Lrp4</i>	Chr 2; hebra (+) 91,296,687 91,297,736	-86 a -81* *Respecto al motivo 1 del elemento promotor río abajo	Ausente	-349
<i>Sp5</i>	Chr 2; hebra (+) 70,311,979 70,313,028	-243 a -238	(-98 a -93) (+25 a +30)	Ausente
<i>Spr2d</i>	Chr 3; hebra (+) 92,142,061 92,143,110	-628 a -623* -433 a -438* *Respecto a TATA box	-617 a -612* +84 a +89* +449 a +453* +478 a +483* *Respecto a TATA box	+935* *Respecto a TATA box
<i>Gapdh</i>	Chr 6 hebra (-) 125,116,390 125,117,613	-178 Respecto al motivo 1 de inicio	-232* -426* *Respecto al motivo 1 de inicio	Ausente

Tabla 12. Localización de secuencias motivo de DNA en la región promotora proximal.

Gen	Región analizada (NCBI37/mm9) julio 2007	Secuencia consenso que reconoce TFIIB [CG][CG][AG]CGCC	TATA box TATA[AT]A[AT][GA]	Secuencia consenso inicio [CT][CT]A[ATGC][TA][CT][CT]	Secuencia consenso elemento promotor río abajo (DPE) [AG]G[AT][CT][ACG]
<i>Wt1</i>	Chr 2; hebra (+) 104,965,685 104,966,684	-127 a -121 Respecto al inicio	Ausente	Posición +1 104,966,625	Ausente
<i>Amh</i>	Chr 10; hebra (+) 80,266,992 80,268,011	Ausente	Ausente	Posición +1 80,268,004	Ausente
<i>Lrp4</i>	Chr 2; hebra (+) 91,296,687 91,297,736	91,297,723	Ausente	Ausente	Motivo 1 91,297,517 Motivo 2 91,297,652
<i>Sp5</i>	Chr 2; hebra (+) 70,311,979 70,313,028	Motivo 1 -369 a -363* Motivo 2 -364 a 358* *Respecto al inicio	-92 a -85 Respecto al inicio	Posición +1 70,312,997	Ausente
<i>Sprr2d</i>	Chr 3; hebra (+) 92,142,061 92,143,110	Ausente	92,143,033	+443 +945 Respecto a TATA box	+1 respecto a TATA box
<i>Gapdh</i>	Chr 6; hebra (-) 125,116,390 125,117,613	-285 Respecto al inicio del motivo 1	Ausente	Posición +1 motivo 1 125,116,390 Posición +1 motivo 2 125,117,284	Ausente

7.2 Perfiles de CHIP-seq para GATA4 en hígado de ratón adulto

Con los perfiles de CHIP-seq elaborados por (Zheng *et al.*, 2013) y depositados en la base de datos WashU EpiGenome Browser <http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/> se identificó enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo anti-GATA4 C-20, río arriba del sitio de inicio de *Gapdh*, *Sp5* y *Lrp4* en hígado de ratón adulto. No se identificó enriquecimiento río arriba de los genes *Amh* y *Sprr2d*. La interacción de GATA4 con los blancos arriba mencionados representa una evidencia *a priori*, que será confirmada con los ensayos de CHIP en hígado embrionario.

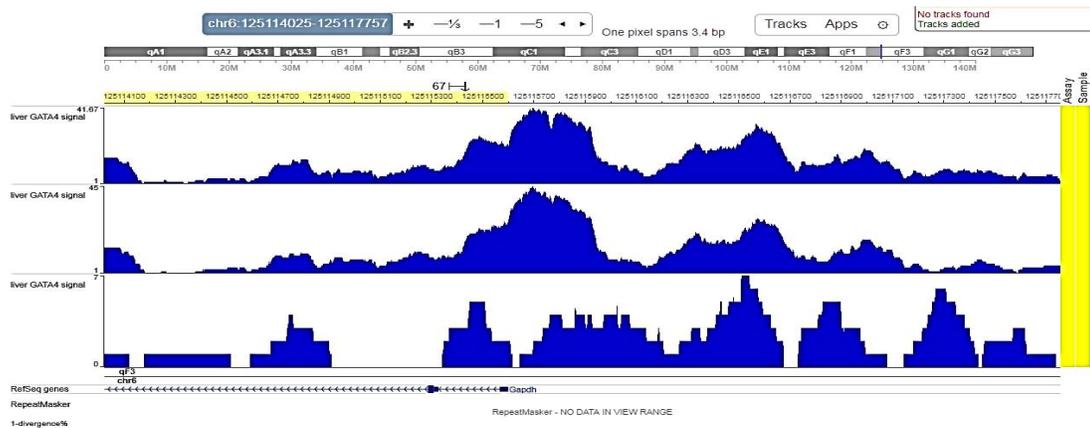


Figura 6. Señal de enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo GATA4 C-20 (Santa Cruz) y secuenciados (perfil ChIP-seq *Gapdh*). La señal sugiere que el factor de transcripción GATA4 estaba unido a la secuencia motivo de DNA [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Gapdh*. El resultado se obtuvo a partir de cromatina de hígado de ratón adulto. Fuente: EpiGenomegateway.wustl.edu: <http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/> consulta: marzo 2017.

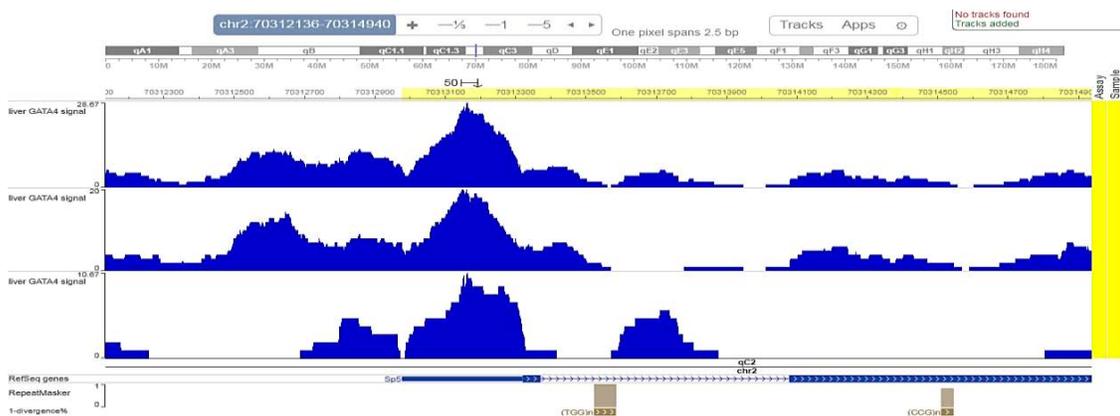


Figura 7. Señal de enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo GATA4 C-20 (Santa Cruz) y secuenciados (perfil ChIP-seq *Sp5*). La señal sugiere que el factor de transcripción GATA4 estaba unido a la secuencia motivo de DNA [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Sp5*. El resultado se obtuvo a partir de cromatina de hígado de ratón adulto. Fuente: EpiGenomegateway.wustl.edu: <http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/> consulta: marzo 2017.

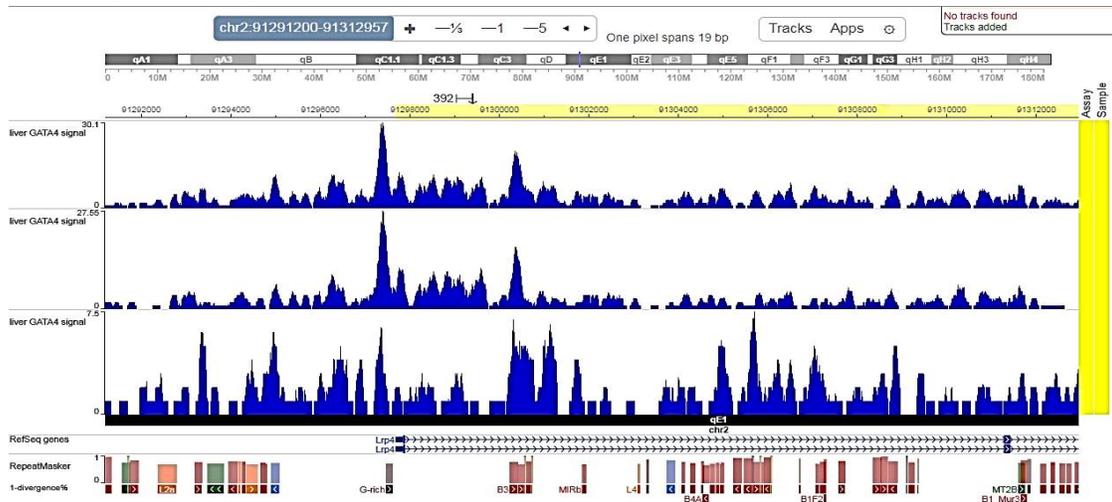


Figura 8. Señal de enriquecimiento de fragmentos de DNA inmunoprecipitados con el anticuerpo GATA4 C-20 (Santa Cruz) y secuenciados (perfil ChIP-seq *Lrp4*). La señal sugiere que el factor de transcripción GATA4 estaba unido a la secuencia motivo de DNA [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Lrp4*. El resultado se obtuvo a partir de cromatina de hígado de ratón adulto. Fuente: Epigenomegateway.wustl.edu: <http://epigenomegateway.wustl.edu/browser/> consulta: marzo 2017.

7.3 Ensayos de inmunofluorescencia dirigidos a GATA4

En embriones 10.5 dpc, se localizó al factor de transcripción GATA4 en núcleos de células de las crestas genitales y núcleos de células del mesenterio dorsal (Figuras 9 y 10). A los 13.5 dpc, se puede observar que la señal de GATA4 se mantiene con mucha intensidad en ovarios y testículos en desarrollo (Figuras 11a-c y 12a-c). En esta etapa, se puede observar que las células GATA4+ rodean a las células germinales para formar cordones ovígeros o testiculares. A los 10 días post parto, se observa que la expresión de GATA4 persiste aunque con menor intensidad, en comparación con lo observado en etapas embrionarias (Figuras 11d-f y 12d-f). Nótese que en esta etapa, la expresión de GATA4 se localiza en los núcleos de células de la granulosa, que se distinguen por adoptar una forma cuboidal, en los folículos primarios de los ovarios. En testículos, los núcleos de células GATA4+ se encuentran en los bordes que forman las paredes de los túbulos seminíferos, debido a esta posición se puede inferir que los núcleos GATA4+ corresponden a células de Sertoli.

Crestas genitales embrión 10.5 dpc (XY)

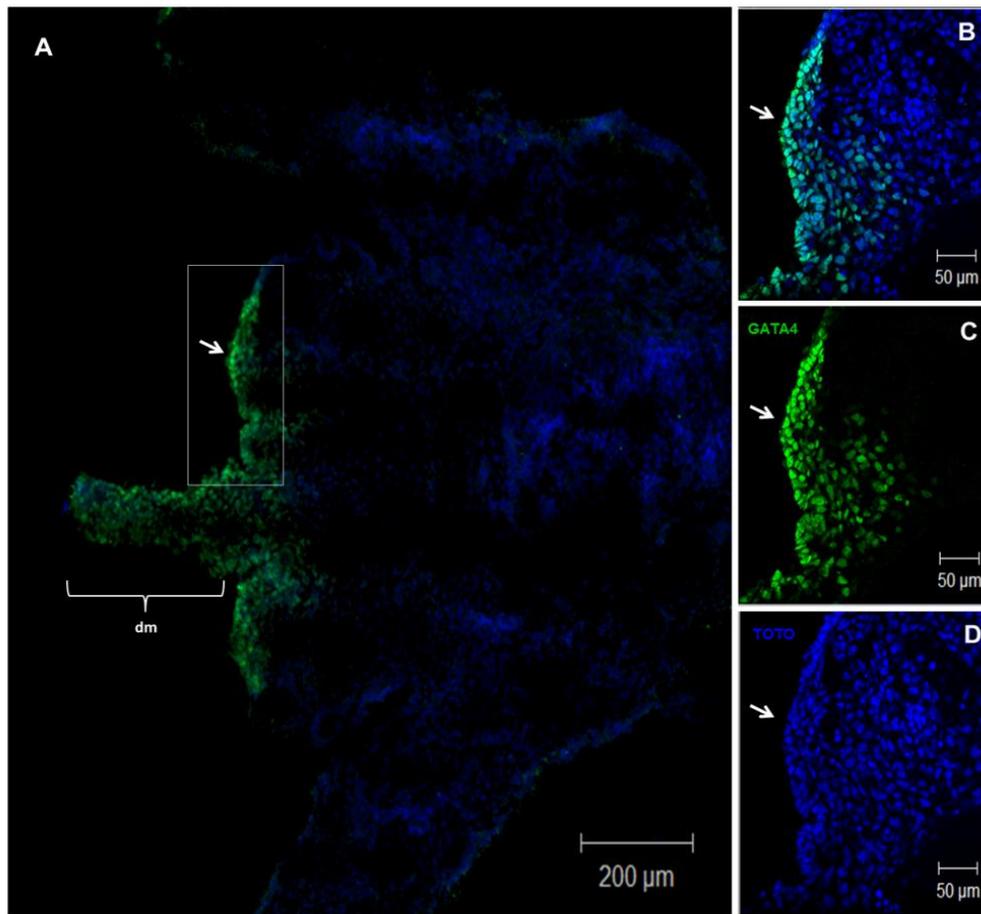


Figura 9. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas que convergen y proliferan en las crestas genitales de embriones de ratón (XY) a los 10.5 dpc. La flecha dentro del recuadro señala una cresta genital y el detalle de la misma puede observarse a la derecha (B, C y D). La señal de GATA4 es intensa en los núcleos de células somáticas que convergen en la cresta (B y C). Durante esta etapa de desarrollo, no es posible identificar diferencias histológicas en las crestas genitales de embriones XX o XY. La imagen en (B) corresponde a la combinación de la señal de GATA4 en verde (C) y la señal de núcleos contrastados con TOTO en azul (D). Nótese la presencia de núcleos de células somáticas GATA4+ en el mesenterio dorsal del embrión (dm).

Cresta genital de embrión 10.5 dpc (XX)

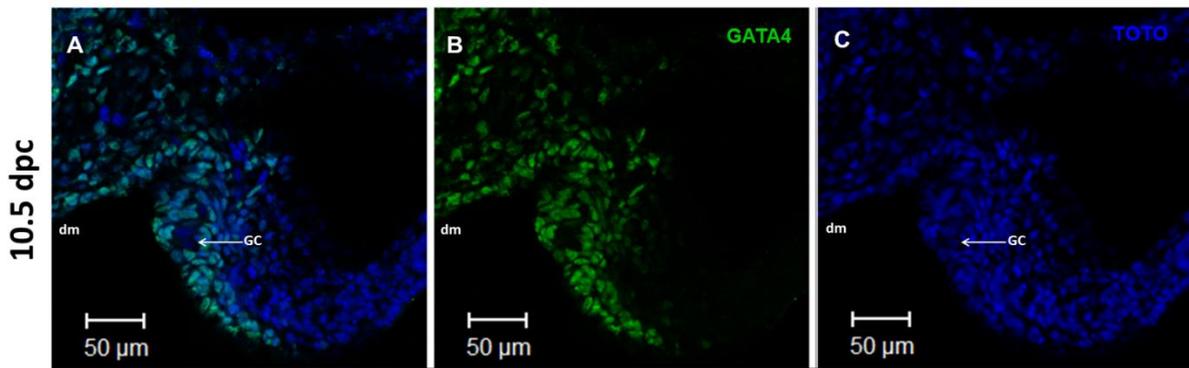


Figura 10. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas que convergen y proliferan en las crestas genitales de embriones de ratón (XX) a los 10.5 dpc. Nótese el arribo de las primeras células germinales (GC) por el borde de la cresta, a través del mesenterio dorsal (dm). Imágenes de microscopía confocal 40X. (A) corresponde a la combinación de la señal de GATA4 en verde (B) y la señal de núcleos contrastados con TOTO en azul (C).

Ovarios de ratón

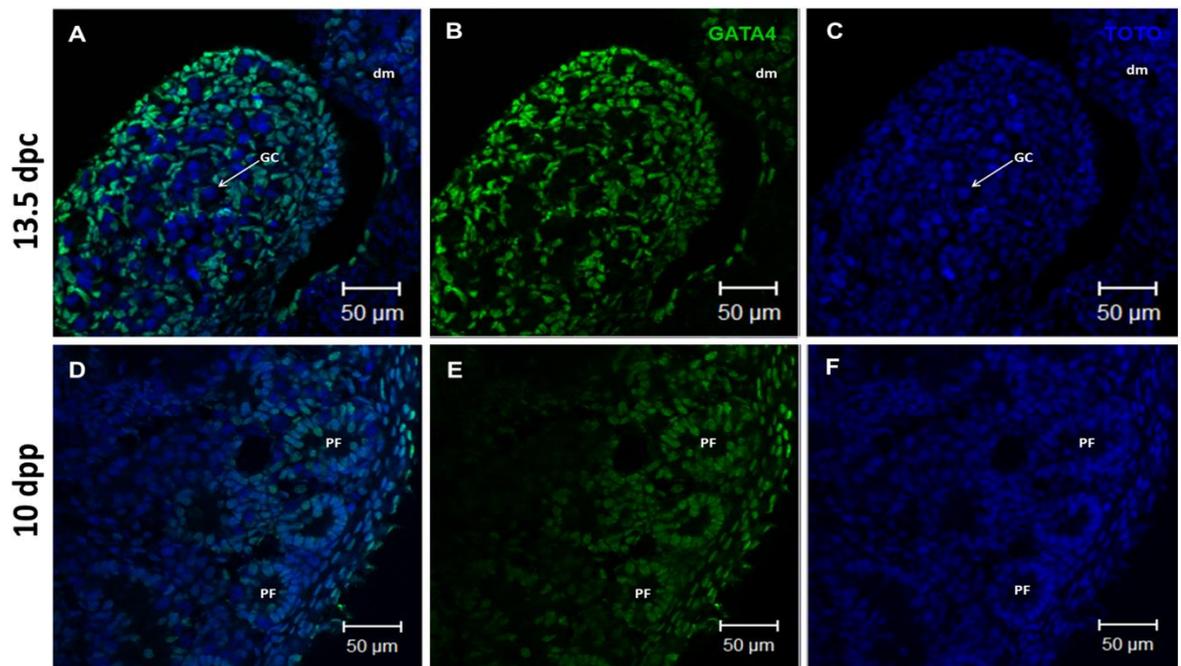


Figura 11. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas de ovario de ratón de 13.5 dpc y ovario de 10 días post parto. A los 13.5 dpc, se observan núcleos GATA4+ que corresponden a células somáticas (A y B, señal en verde) y núcleos esféricos GATA4- (A y C, señal en azul) que corresponden a células germinales (GC). En esta etapa de desarrollo se observan abundantes células germinales en proliferación, que permanecen interconectadas debido a una citocinesis que aún no se completa (cistos de células germinales). A los 10 días post parto (10 dpp), se observa tejido ovárico completamente diferenciado, con presencia de folículos primarios (PF). Los folículos primarios se caracterizan por tener una sola capa de células granulosa GATA4+ con núcleos que adoptan una forma cuboidal (D y E). Imágenes de microscopía confocal 40X. (A y D) corresponden a la combinación de la señal de GATA4 (verde), con la señal (azul) de núcleos contrastados con TOTO (C y F). mesenterio dorsal (dm).

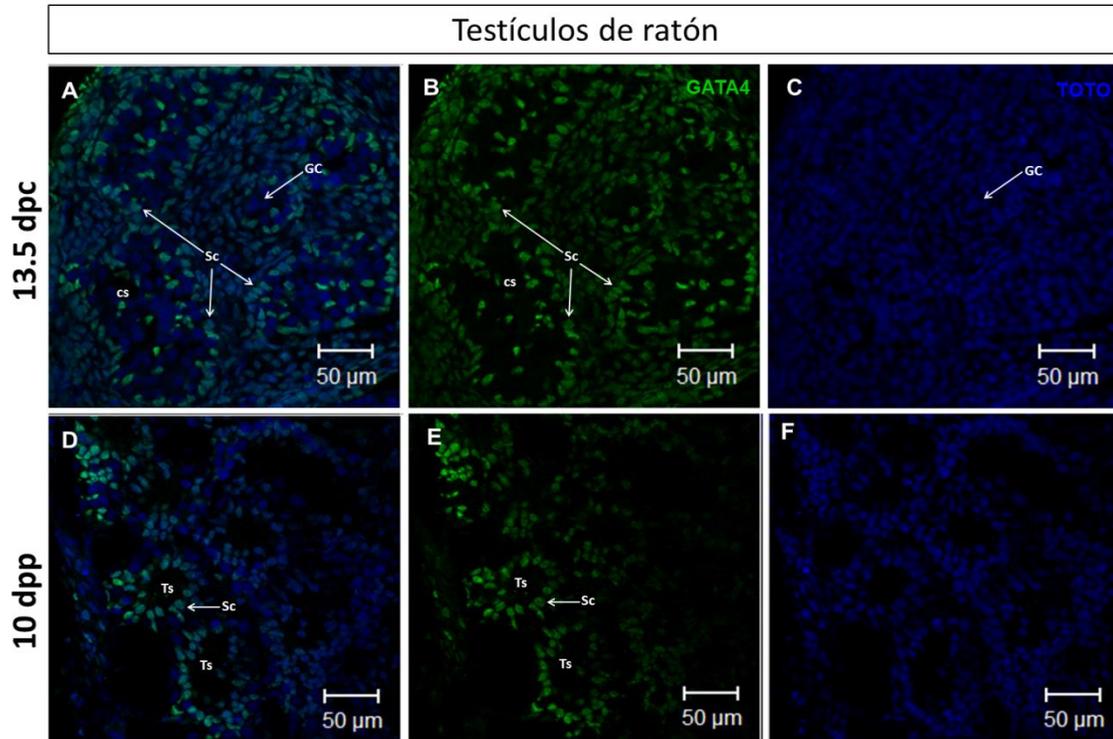


Figura 12. El factor de transcripción GATA4 está presente en núcleos de células somáticas de testículo de ratón de 13.5 dpc y testículo de 10 días post parto. Se observan núcleos de células somáticas GATA4+ (A y B, señal en verde) y núcleos esféricos GATA4- (A y C, señal en azul), que corresponden a células germinales (GC). Se puede observar menor abundancia de células germinales en comparación con el ovario 13.5 dpc. Nótese que los núcleos de células germinales se encuentran agrupados en cordones seminíferos (cs) que serán los futuros túbulos seminíferos. Se puede observar una capa de células somáticas GATA4+ que corresponden a células de Sertoli (Sc), que recubren las paredes de los cordones. También se puede observar algunas células de Sertoli intercaladas al interior de los cordones. A los 10 días post parto (10 dpp), se observa tejido testicular completamente diferenciado con presencia de túbulos seminíferos (Ts) y una capa de células de Sertoli (GATA4+), que recubren las paredes de los túbulos. Imágenes de microscopía confocal 40X. (A y D) corresponde a la combinación de la señal de GATA4 (verde) y la señal de núcleos contrastados con TOTO (C y F).

7.4 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

7.4.1 Sonicación de cromatina

La cromatina se fragmentó mecánicamente al aplicar energía ultrasónica en pulsos de 30 segundos (Figura 13). Cabe mencionar que también se fragmentó tejido hepático de embriones de ratón 40,XY y 40,XX de 13.5 dpc, con la finalidad de aplicar el ensayo de ChIP en un tejido independiente a gónadas. La sonicación es un paso decisivo para el inicio del ensayo de ChIP porque se genera una población de fragmentos de diferentes tamaños, que oscilan entre un rango de 200 a 700pb, preferentemente con un pico en 300pb. Este rango de fragmentación es apropiado para formar complejos de cromatina-anticuerpo-perlas magnéticas que podrán ser inmunoprecipitados y analizados posteriormente, con alguna técnica de cuantificación o identificación molecular.

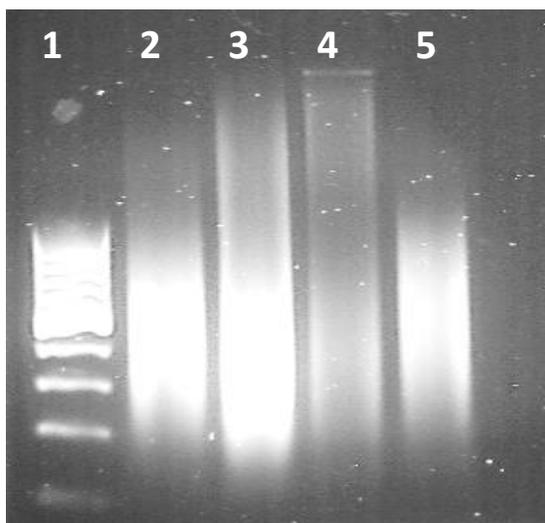


Figura 13. Cromatina fragmentada en un rango de 200 a 700pb, con un pico en 400pb. Escalera 100pb carril 1; Cromatina testicular y cromatina ovárica 13.5 dpc, carriles 2 y 3 respectivamente; Cromatina de hígado de embriones 40,XY y cromatina de hígado de embriones 40,XX 13.5dpc, carriles 4 y 5 respectivamente.

7.4.2 Control positivo del ensayo ChIP con anticuerpo anti-RNA pol II y anticuerpo anti-GATA4 para cromatina aislada de testículos y ovarios de ratón 13.5 dpc.

Para el experimento de ChIP se tienen dos controles positivos, el primero correspondió al control positivo del DNA de entrada (input). Este control dio información sobre la cromatina fijada, sonicada y purificada, sin haber pasado por el ensayo de inmunoprecipitación. El segundo control positivo correspondió propiamente al ensayo de ChIP. En este trabajo se usó el anticuerpo anti-RNA pol II (CTD4H8; Epigentek) y se analizó el gen *Gapdh*. Este gen es considerado constitutivo, debido a que se expresa de forma continua y con poca variación entre diferentes células. *Gapdh* codifica la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, la cual tiene una función en una de las reacciones enzimáticas de la glucólisis, al catalizar el gliceraldehído-3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato, en presencia

de NAD⁺ y fosforo inorgánico. *Gapdh* puede ser usado como punto de comparación al calcular el enriquecimiento asociado a la inmunoprecipitación por medio de PCR de tipo cuantitativo.

En la Figura 14 se observan amplicones de 169bp, que corresponden a un fragmento de CHIP-DNA en el que estaba formado el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], en la región promotora de *Gapdh*. Este resultado representa el control positivo de los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en testículos y ovarios de embriones 13.5 dpc (Figura 14, carriles 4 y 9 respectivamente). Por otra parte, es importante mencionar que con el análisis bioinformático de la secuencia de *Gapdh* se observó un motivo [AT]GATA[AG] a -178pb del sitio de inicio de la transcripción. En la Figura 14, se observan amplicones que corresponden a un fragmento de CHIP-DNA en el que estaba formado el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[secuencia motivo [AT]GATA[AG]], en cromatina de testículos y ovarios de embriones de ratón 13.5 dpc (Figura 14, carriles 3 y 8 respectivamente). Este resultado valida a nivel experimental el hallazgo que se hizo a nivel bioinformático en relación a la unión de GATA4 río arriba de *Gapdh* (Tabla 11 y Figura 6).

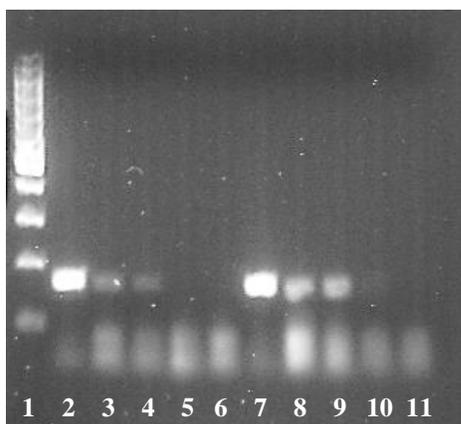


Figura 14. Fragmento de CHIP-DNA de 169pb, amplificado por PCR, en el que estaba formado el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], en la región promotora de *Gapdh*. El fragmento amplificado también contiene un motivo [AT]GATA[AG] al que estaba unido GATA4 en cromatina testicular y ovárica (carriles 3 y 8 respectivamente). No hay amplicones en los controles negativos del ensayo, que corresponden a una inmunoglobulina no reactiva, ensayada en CHIP-DNA de testículos/ovarios (carriles 5 y 10 respectivamente) y cromatina de testículos/ovarios sin anticuerpo (carriles 6 y 11 respectivamente). Tablas 8 y 9 indican las condiciones de la PCR.

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de testículos carril 2; CHIP-DNA de testículos con anti-GATA4 carril 3; CHIP-DNA de testículos con anti-RNA pol II carril 4; CHIP-DNA de testículos con IgG carril 5; CHIP-DNA de testículos sin anticuerpo carril 6; DNA input de ovarios carril 7; CHIP-DNA de ovarios con anti-GATA4 carril 8; CHIP-DNA de ovarios con anti-RNA pol II carril 9; CHIP-DNA de ovarios con IgG carril 10; CHIP-DNA de ovarios sin anticuerpo carril 11.

7.4.3 Validación de la predicción del modelo Booleano: GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *Wt1* en cromatina de testículo, pero no en cromatina de ovario de embriones de ratón 13.5dpc.

En la Figura 15 se observan amplicones de 141pb de longitud que están río arriba del sitio de inicio del gen *Wt1*. Los amplicones corresponden a un fragmento de ChIP-DNA de testículos de embriones 13.5 dpc, en el que estaba formado el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] y el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] (Figura 15, carriles 3 y 4 respectivamente). Cabe hacer notar que utilizando los anticuerpos antes mencionados, en el ChIP de ovario embrionario 13.5 dpc, los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] ni el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], río arriba del sitio de inicio del gen *Wt1*, por lo que no se generaron amplicones en los ensayos de PCR (Figura 15, carril 8 y 9 respectivamente).

Dado que GATA4 estaba unido río arriba del inicio del gen *Wt1* en cromatina de testículos y la unión de GATA4 no fue observada en cromatina de ovarios, se puede sugerir que otros factores de transcripción podrían estar regulando a *Wt1* en cromatina de ovario. El resultado valida a nivel experimental la predicción del Modelo Booleano relativa a la interacción de GATA4 con el gen *Wt1* en vía masculina. También se valida el hallazgo que se hizo a nivel bioinformático en relación a la unión de GATA4 a la secuencia motivo [AT]GATA[AG] a -318pb del sitio de inicio de la transcripción del gen *Wt1* (Tabla 11).

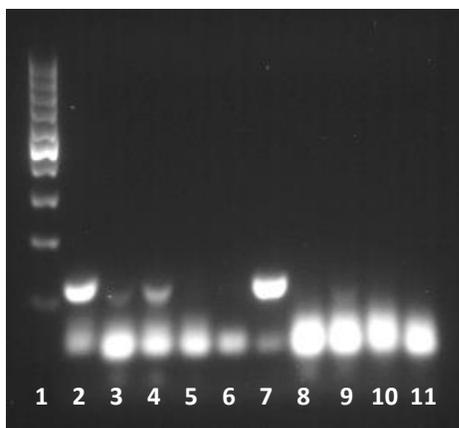


Figura 15. Fragmento de ChIP-DNA de 141pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG] al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Wt1*. El ensayo es positivo en cromatina testicular de embriones de ratón de 13.5 dpc (carriles 3 y 4) y negativo en cromatina ovárica de embriones de ratón de 13.5dpc. No hay amplicones en los controles negativos del ensayo, que corresponden a una inmunoglobulina no reactiva, ensayada en ChIP-DNA de testículos/ovarios (carriles 5 y 10 respectivamente) y cromatina de testículos/ovarios sin anticuerpo (carriles 6 y 11 respectivamente). Tablas 8 y 9 indican las condiciones de la PCR.

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de testículos carril 2; ChIP-DNA de testículos con anti-GATA4 carril 3; ChIP-DNA de testículos con anti-RNA pol II carril 4; ChIP-DNA de testículos con IgG carril5; ChIP-DNA de testículos sin anticuerpo carril 6; DNA input de ovarios carril 7; ChIP-DNA de ovarios con anti-GATA4 carril 8; ChIP-DNA de ovarios con anti-RNA pol II carril 9; ChIP-DNA de ovarios con IgG carril 10; ChIP-DNA de ovarios sin anticuerpo carril 11.

7.4.4 GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Amh* en cromatina de testículo.

En la Figura 16 se observan amplicones de 108pb de longitud que están río arriba del sitio de inicio del gen *Amh*. Los amplicones corresponden a un fragmento de CHIP-DNA de testículos de embriones 13.5 dpc, en el que estaba formado el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] y el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] (Figura 16, carriles 3 y 4 respectivamente). Nótese que haciendo uso de los anticuerpos antes mencionados, en el CHIP de ovario embrionario 13.5 dpc, los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] ni el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], río arriba del sitio de inicio del gen *Amh*, por lo que no se obtuvieron amplicones en los ensayos de PCR (Figura 16, carril 8 y 9 respectivamente). El resultado confirma a nivel experimental la unión de GATA4 a su secuencia motivo [AT]GATA[AG] a -92pb del gen *Amh* en cromatina de testículo (Tabla 11). Con estos resultados se confirma que GATA4 es parte de los elementos reguladores del gen *Amh*, el cual tiene un patrón de expresión dimórfico (presente en vía masculina y ausente en vía femenina).



Figura 16. Fragmento de CHIP-DNA de 108pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG] al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Amh*. El ensayo es positivo en cromatina testicular de embriones de ratón de 13.5 dpc (carriles 3 y 4) y negativo en cromatina ovárica de embriones de ratón de 13.5dpc. No hay amplicones en los controles negativos del ensayo, que corresponden a una inmunoglobulina no reactiva, ensayada en CHIP-DNA de testículos/ovarios (carriles 5 y 10 respectivamente) y cromatina de testículos/ovarios sin anticuerpo (carriles 6 y 11 respectivamente). Tablas 8 y 9 indican las condiciones de la PCR.

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de testículos carril 2; CHIP-DNA de testículos con anti-GATA4 carril 3; CHIP-DNA de testículos con anti-RNA pol II carril 4; CHIP-DNA de testículos con IgG carril5; CHIP-DNA de testículos sin anticuerpo carril 6; DNA input de ovarios carril 7; CHIP-DNA de ovarios con anti-GATA4 carril 8; CHIP-DNA de ovarios con anti-RNA pol II carril 9; CHIP-DNA de ovarios con IgG carril 10; CHIP-DNA de ovarios sin anticuerpo carril 11.

7.4.5 GATA4 no se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción para el gen *Lrp4*, en cromatina de testículos y ovarios de embriones de ratón 13.5 dpc.

A partir del análisis bioinformático, se identificó una secuencia motivo [AT]GATA[AG] a -86pb respecto al primer motivo del elemento promotor río abajo (DPE) presente en el gen *Lrp4* (Tablas 11 y 12). A nivel experimental no se obtuvieron amplicones en los ensayos de PCR en los que se usó fragmentos de CHIP-DNA de testículos u ovarios de embriones 13.5 dpc. La cromatina fue inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-GATA4 sc25310 (Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo anti-RNA pol II CTD4H8 (Epigentek) (Figura 17). De estos resultados se infiere lo siguiente: 1) los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA], río arriba del sitio de inicio del gen *Lrp4* y 2) Los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], río arriba del sitio de inicio del gen *Lrp4*. Por lo tanto, GATA4 no estaba unido a su secuencia motivo de DNA y la RNA pol II no está unida al complejo de inicio de la transcripción, porque dicho complejo no estaba formado en la región promotora del gen *Lrp4*.

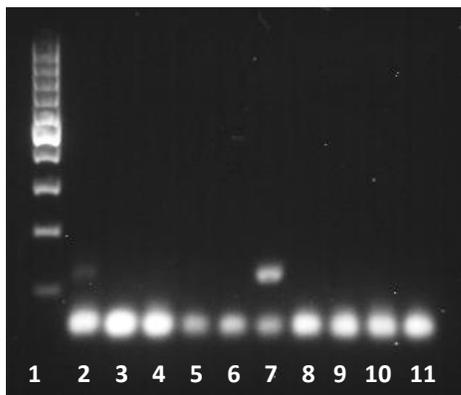


Figura 17. El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina fue negativo para la secuencia motivo [AT]GATA[AG] identificada río arriba del gen *Lrp4*. El ensayo es negativo en cromatina de testículos y cromatina de ovarios de embriones de ratón de 13.5 dpc. No hay amplicones en los controles negativos del ensayo, que corresponden a una inmunoglobulina no reactiva, ensayada en ChIP-DNA de testículos/ovarios (carriles 5 y 10 respectivamente) y cromatina de testículos/ovarios sin anticuerpo (carriles 6 y 11 respectivamente). Los resultados indican que el factor de transcripción GATA4 no se une a la secuencia motivo identificada por análisis bioinformático. Carriles 2 y 7 corresponden a amplicones de 108pb a partir de DNA input (cromatina fragmentada sin inmunoprecipitar).

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de testículos carril 2; ChIP-DNA de testículos con anti-GATA4 carril 3; ChIP-DNA de testículos con anti-RNA pol II carril 4; ChIP-DNA de testículos con IgG carril 5; ChIP-DNA de testículos sin anticuerpo carril 6; DNA input de ovarios carril 7; ChIP-DNA de ovarios con anti-GATA4 carril 8; ChIP-DNA de ovarios con anti-RNA pol II carril 9; ChIP-DNA de ovarios con IgG carril 10; ChIP-DNA de ovarios sin anticuerpo carril 11.

7.4.6 GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción para el gen *Sp5* en cromatina de ovario.

En la Figura 18 se observan amplicones de 105pb de longitud, que están río arriba del sitio de inicio del gen *Sp5*. Los amplicones corresponden a un fragmento de CHIP-DNA de ovario de embriones 13.5 dpc, en el que estaba formado el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] y el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] (Figura 18 carriles, 8 y 9 respectivamente). Nótese que haciendo uso de los anticuerpos antes mencionados, en el CHIP de testículos de embriones 13.5 dpc, los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] ni el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], río arriba del sitio de inicio del gen *Sp5*, por lo que no se obtuvieron amplicones en los ensayos de PCR (Figura 18, carril 3 y 4 respectivamente). El resultado confirma a nivel experimental la unión de GATA4 a su secuencia motivo [AT]GATA[AG] a -243pb del inicio de *Sp5* en cromatina de ovario (Figura 18, carril 8) y (Tabla 11). Con estos resultados se confirma que GATA4 es parte de los elementos reguladores del gen *Sp5*, el cual tiene un patrón de expresión dimórfico (presente en vía femenina y ausente en vía masculina).

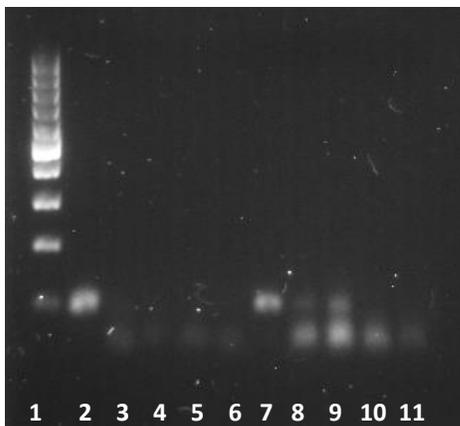
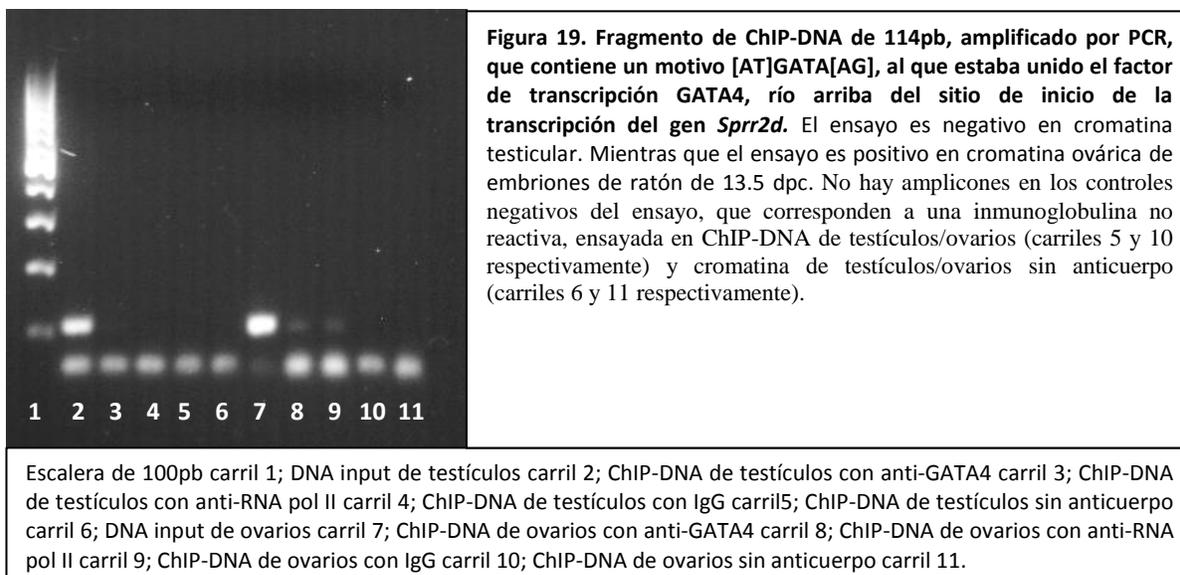


Figura 18. Fragmento de CHIP-DNA de 105pb, amplificado por PCR, que contiene un motivo [AT]GATA[AG], al que estaba unido el factor de transcripción GATA4, río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Sp5*. El ensayo es negativo en cromatina testicular. Mientras que el ensayo es positivo en cromatina ovárica de embriones de ratón de 13.5 dpc. No hay amplicones en los controles negativos del ensayo, que corresponden a una inmunoglobulina no reactiva, ensayada en CHIP-DNA de testículos/ovarios (carriles 5 y 10 respectivamente) y cromatina de testículos/ovarios sin anticuerpo (carriles 6 y 11 respectivamente). Tablas 8 y 9 indican las condiciones de la PCR.

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de testículos carril 2; CHIP-DNA de testículos con anti-GATA4 carril 3; CHIP-DNA de testículos con anti-RNA pol II carril 4; CHIP-DNA de testículos con IgG carril 5; CHIP-DNA de testículos sin anticuerpo carril 6; DNA input de ovarios carril 7; CHIP-DNA de ovarios con anti-GATA4 carril 8; CHIP-DNA de ovarios con anti-RNA pol II carril 9; CHIP-DNA de ovarios con IgG carril 10; CHIP-DNA de ovarios sin anticuerpo carril 11.

7.4.7 GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Spr2d* en cromatina de ovario.

En la Figura 19 se observan amplicones de 114pb de longitud, que están río arriba del sitio de inicio del gen *Spr2d*. Los amplicones corresponden a un fragmento de ChIP-DNA de ovario de embriones 13.5 dpc, en el que estaba formado el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] y el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] (Figura 19 carriles, 8 y 9 respectivamente). Nótese que haciendo uso de los anticuerpos antes mencionados, en el ChIP de testículo embrionario 13.5 dpc, los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] ni el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], río arriba del sitio de inicio del gen *Spr2d*, por lo que no se obtuvieron amplicones en los ensayos de PCR (Figura 19, carril 3 y 4 respectivamente). El resultado confirma a nivel experimental la unión de GATA4 a su secuencia motivo [AT]GATA[AG] a -433pb del inicio de *Spr2d* en cromatina de ovario (Figura 19, carril 8) y (Tabla 11). Con estos resultados se confirma que GATA4 es parte de los elementos reguladores del gen *Spr2d*, el cual tiene un patrón de expresión dimórfico (presente en vía femenina y ausente en vía masculina).



7.4.8 Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina para *Gapdh* en tejido hepático de embriones 13.5 dpc.

En la Figura 20 se observan amplicones de 169pb que corresponden a un fragmento de ChIP-DNA, río arriba de *Gapdh*, en el que estaba formado el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] en cromatina de tejido hepático de embrión 40,XY de 13.5 dpc, (Figura 20, carril 4). No se observaron amplicones de ChIP-DNA que correspondería al complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA], río arriba de *Gapdh* en cromatina de tejido hepático 40,XY de 13.5 dpc (Figura 20, carril 3). Por otra parte, haciendo uso de los anticuerpos antes mencionados, en el ChIP de tejido hepático de embriones 40,XX de 13.5 dpc, se observaron amplicones que corresponden a fragmentos de cromatina inmunoprecipitada que contenían el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] (Figura 20, carril 8) y el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] (Figura 20, carril 9), río arriba del sitio de inicio del gen *Gapdh*. Estos resultados indican que en cromatina inmunoprecipitada de hígado 40,XX la RNA pol II estaba unida al complejo de inicio de la transcripción y el factor de transcripción GATA4 estaba unido a su secuencia motivo río arriba del gen *Gapdh*. La ausencia de unión de GATA4, río arriba de *Gapdh*, en ChIP-DNA de hígado 40,XY puede deberse a la regulación de la expresión de *Gapdh* por otros factores de transcripción. *Gapdh* tiene dos sitios de inicio de la transcripción (Tabla 12) y es posible que, dependiendo del contexto molecular en el interior del núcleo celular se active alguno de estos sitios de inicio y para ello se requiera de una combinación distinta de factores de transcripción.

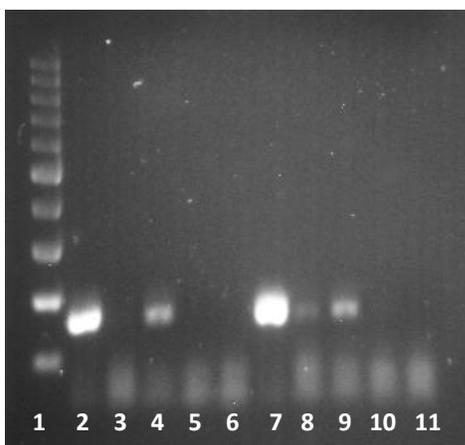
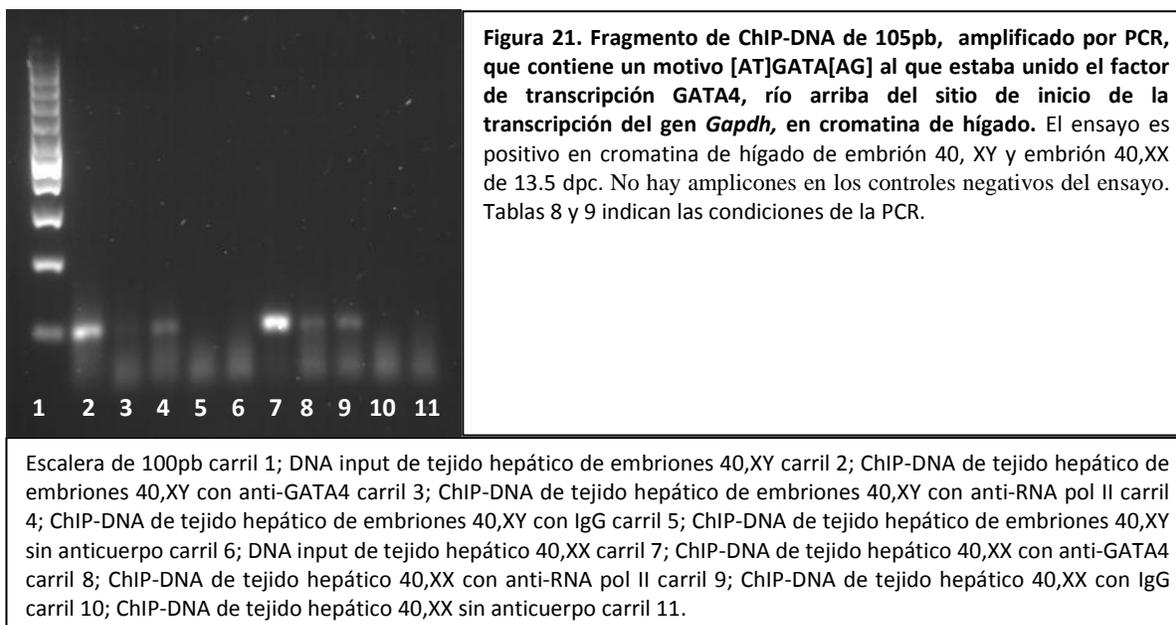


Figura 20. Fragmento de ChIP-DNA de 169pb, amplificado por PCR, en el que estaba formado el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción], en la región promotora de *Gapdh*, en cromatina de hígado de embriones 40,XY y 40,XX. No hay amplicones en los controles negativos del ensayo. Los resultados indican que GATA4 estaba unido a su secuencia motivo de DNA, río arriba de *Gapdh*, sólo en cromatina de hígado 40,XX (carril 8). Tablas 8 y 9 indican las condiciones de la PCR.

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de tejido hepático de embriones 40,XY carril 2; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY con anti-GATA4 carril 3; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY con anti-RNA pol II carril 4; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY con IgG carril 5; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY sin anticuerpo carril 6; DNA input de tejido hepático 40,XX carril 7; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX con anti-GATA4 carril 8; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX con anti-RNA pol II carril 9; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX con IgG carril 10; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX sin anticuerpo carril 11.

7.4.9 Validación de otras interacciones: GATA4 se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Sp5* en cromatina de tejido hepático.

En la Figura 21 se observan amplicones de 105pb de longitud, que están río arriba del sitio de inicio del gen *Sp5*. Los amplicones corresponden a un fragmento de CHIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY y 40,XX de 13.5 dpc, en el que estaba formado el complejo [anti-GATA4]--[GATA4]--[DNA] (Figura 21, carriles 3 y 8 respectivamente) y el complejo [anti-RNA pol II]--[RNA pol II]--[complejo de inicio de la transcripción] (Figura 21, carriles 4 y 9 respectivamente). Dado que los ensayos de inmunoprecipitación fueron positivos en cromatina de tejido hepático de embriones 40,XY y 40,XX se puede decir que en el gen *Sp5* la RNA pol II estaba unida al complejo de inicio de la transcripción y que el factor de transcripción GATA4 estaba unido a la secuencia motivo, identificada río arriba del gen *Sp5*.



7.4.10 Validación de otras interacciones: GATA4 no se une a la secuencia motivo [AT]GATA[AG], río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *Lrp4* en cromatina de tejido hepático.

No se obtuvieron amplicones en los ensayos de PCR a partir de cromatina de tejido hepático 40,XY o 40,XX de embriones 13.5 dpc. La cromatina fue inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-GATA4 sc25310 o el anticuerpo anti-RNA pol II CTD4H8 (Figura 22). De estos resultados se infiere lo siguiente: 1) los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-GATA4]-[GATA4]-[DNA], río arriba del sitio de inicio del gen *Lrp4* y 2) Los fragmentos de cromatina inmunoprecipitada no contenían el complejo [anti-RNA pol II]-[RNA pol II]-[complejo de inicio de la transcripción], río arriba del sitio de inicio del gen *Lrp4*. Por lo tanto, GATA4 no estaba unido a su secuencia motivo de DNA y la RNA pol II no está unida al complejo de inicio de la transcripción, porque dicho complejo no estaba formado en la región promotora del gen *Lrp4*.

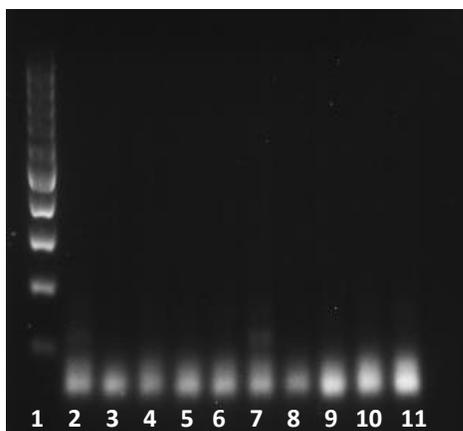


Figura 22. El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina fue negativo para la secuencia motivo [AT]GATA[AG], identificada río arriba del gen *Lrp4* en cromatina de hígado.

El ensayo fue negativo en cromatina de tejido hepático de embriones de ratón 40,XY y 40,XX de 13.5 dpc.

No hay amplicones en los controles negativos del ensayo, que corresponden a una inmunoglobulina no reactiva (carriles 5 y 10 respectivamente) y cromatina sin anticuerpo (carriles 6 y 11 respectivamente). Los resultados indican que el factor de transcripción GATA4 no se une a la secuencia motivo identificada por análisis bioinformático. Carriles 2 y 7 corresponden a amplicones de 108pb a partir de DNA input (cromatina fragmentada sin inmunoprecipitar).

Escalera de 100pb carril 1; DNA input de tejido hepático de embriones 40,XY carril 2; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY con anti-GATA4 carril 3; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY con anti-RNA pol II carril 4; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY con IgG carril 5; ChIP-DNA de tejido hepático de embriones 40,XY sin anticuerpo carril 6; DNA input de tejido hepático 40,XX carril 7; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX con anti-GATA4 carril 8; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX con anti-RNA pol II carril 9; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX con IgG carril 10; ChIP-DNA de tejido hepático 40,XX sin anticuerpo carril 11.

8. DISCUSION

8.1 Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada

Del análisis del modelo se pueden hacer los siguientes comentarios:

1. El modelo requiere del nodo de entrada UGR en un estado inicial (1), para activar nodos de la etapa bipotencial. A continuación, el modelo transita hacia la determinación del sexo, seguido de la activación de los nodos asociados a la vía masculina o femenina (Figura 2 y Tabla 6). El modelo considera a la vía masculina y femenina como vías independientes y antagónicas, de acuerdo a los estudios experimentales detallados en los antecedentes. El punto de divergencia entre ambas vías está dado por el estado de activación del nodo SRY en la vía masculina, o por el mantenimiento de los nodos de la vía Wnt4/ β -catenina en la vía femenina. El mantenimiento de la vía masculina o femenina está determinado por asas de retroalimentación positiva establecidas con elementos propios de cada vía y por inactivación de nodos de la vía contraria.
2. Los estados de transición de tipo silvestre, deben ser interpretados como perfiles de expresión génica esperada entre los 28 y 44 días de desarrollo embrionario en el humano, o entre los 10.5 y 13.5 dpc, en el ratón (Figura 2). Dado que el modelo fue elaborado con información de genes que se expresan en células NR5A1+, se puede decir que los atractores que se obtuvieron, corresponden a perfiles de expresión que conducen a la diferenciación de células de Sertoli o granulosa. Por estudios de expresión génica, se sabe que ambas vías están integradas por cientos de genes específicos que se caracterizan por tener niveles de expresión dimórficos. Sin embargo, se desconoce el papel de la mayoría de ellos (Beverdam y Koopman, 2006; Munger *et al.*, 2013). Lo anterior, representa una oportunidad para estudiar a nivel experimental la función de estos genes.
3. El inicio de la vía femenina está menos caracterizada, porque no hay una señal evidente de determinación como la que se puede observar en la vía masculina con el gen *SRY*. En el modelo Booleano se consideraron los nodos de la vía canónica WNT4/ β -catenina como la posible señal de inicio de la vía femenina. Las razones son las siguientes: 1) Se ha observado que *Wnt4* se expresa tempranamente en el primordio de la gónada, alrededor de los 10.5 dpc. Posteriormente, la expresión de *Wnt4* es regulada negativamente al inicio de la vía masculina a los 11.5 dpc, mientras que en la vía femenina la expresión aumenta (Vainio *et al.*, 1999); 2) WNT4 como proteína, se secreta al medio extracelular y funciona como una señal parácrina. El mecanismo de la vía

Wnt4/ β -catenina es el siguiente: WNT4 reconoce a los receptores de membrana Frizzled (Fz) y LRP5/6. Esto resulta en la liberación de β -catenina de un complejo de proteínas que la degradan. La β -catenina como molécula efectora transloca al núcleo de la célula donde se une con los factores de transcripción TCF/LEF para formar un complejo que promoverá o inhibirá la expresión de genes blanco (Tevosian y Manuylov, 2008); 3) El patrón de expresión de *Wnt4* es dimórfico. Si el primordio de gónada da inicio a la vía masculina, *Wnt4* es regulado negativamente por *Sox9* y *Fgf9*. De forma contraria, si el primordio da inicio a la vía femenina, la expresión de *Wnt4* se mantiene y la expresión de *Sox9* y *Fgf9* se bloquea (Kim *et al.*, 2006). En la vía femenina, la β -catenina como molécula efectora de la vía Wnt4- β -catenina, promueve la expresión de *Foxl2* que representa un marcador de desarrollo ovárico situado en la parte más alta de la vía femenina. Una de las funciones de FOXL2 como factor de transcripción, es regular negativamente a *Sox9* (Hersmus *et al.*, 2008).

4. Consideramos que el modelo Booleano debe ser actualizado para que pueda describir con mayor precisión algunos aspectos que han sido observados en el desarrollo de la gónada. Por ejemplo, se deben considerar múltiples valores de activación para los nodos de la gónada bipotencial que promueven la activación del nodo SRY. También se deben considerar múltiples valores de activación para los nodos que funcionan como asas de retroalimentación positiva dentro de la vía masculina/femenina. Lo mismo se debe aplicar para aquellos que tengan un papel antagónico de regulación con la vía opuesta de desarrollo. Por otra parte, el método de actualización de los nodos de la red debe ser asíncrono, esto puede ser particularmente útil al simular alteraciones en los nodos como ganancia/pérdida de función.

8.2 Modelos computacionales alternos

Sánchez y Chaouiya (2016) propusieron un modelo computacional mínimo, que describe el proceso de determinación del sexo y diferenciación hacia Sertoli/granulosa. Los autores recopilaron información sobre los genes que forman parte de la red de desarrollo de la gónada y las interacciones que mantienen. A partir de su revisión elaboraron un esquema de red que contiene 18 nodos. Las interacciones entre nodos fueron 29 positivas y 10 negativas. Sin embargo, para la elaboración del modelo computacional solo consideraron 10 nodos de su red. A continuación se describen los aspectos más importantes.

1. **Características del modelo:** los autores consideraron un modelo computacional discreto. Para los nodos Gata4, Wt1, Sry, Dmrt1, Foxl2, se asignaron valores binarios de activación: inactivo (0); activo (1). Mientras que para los nodos Sf1, Sox9, Fgf9, Wnt4 y β -catenina se asignaron tres valores de activación: inactivo (0); activo (1); nivel máximo (2), esto con el propósito de considerar el aumento de expresión que se observa en los genes arriba mencionados. El método de actualización de los estados de activación de los nodos fue síncrono y asíncrono. Además, para algunos nodos se establecieron prioridades de transición, que consistían en favorecer la transición de un nodo con relación a otros.

Los autores consideraron seis nodos de entrada que funcionaban como activadores o inhibidores, distribuidos en tres etapas o fases de la simulación computacional del modelo. Los nodos de entrada son: 1) nodo de entrada del cromosoma Y, que activa al nodo Sry; 2) nodo de entrada AS (activador de Sry); 3) nodo IW (inhibidor de la vía de Wnt4; 4) nodo AF (activador de Foxl2); 5) nodo Gata4; 6) nodo Wt1. Los autores asignaron valores de activación (1) a los nodos de entrada y consideraron que debían entrar en un estado activo, dependiendo de la fase de la simulación a la que fueron asignados.

2. **Modelado de la vía masculina y femenina:** La simulación computacional de su modelo, se divide en tres etapas o fases: 1) fase de inicio; 2) fase de mantenimiento; 3) fase final. A grandes rasgos, en la fase de inicio de la vía masculina, los nodos de entrada Gata4, Wt1, el nodo del cromosoma Y, el nodo AS, tienen un estado activo (1), e inciden sobre el nodo Sry. La activación del nodo Sry lleva al nodo Sox9 a su valor máximo de activación (2). Con este umbral, el nodo Sox9 activa a los nodos Fgf9 y Dmrt1 e inhibe al nodo de β -catenina. Después el modelo de la red transita hacia la fase de mantenimiento. Los autores definieron que durante la fase de mantenimiento los nodos Gata4 y el nodo activador de Sry (AS) pasaban a un estado inactivo, de tal manera que se pierde la actividad de estos nodos sobre el nodo Sry, y se pierde la actividad de Gata4 sobre el nodo Dmrt1. Estas reglas se establecieron con la finalidad de que el nodo Sox9 en combinación con el nodo SF1, mantuvieran el estado activo de los nodos Fgf9 y Dmrt1 de la vía masculina. El estado final de la vía masculina está dado por el nivel máximo (2) de actividad de los nodos Sf1, Sox9, Fgf9, Dmrt1. Además, permanecen en estado activo los nodos de entrada Wt1, nodo activador de Foxl2 (AF), el nodo del cromosoma Y, el nodo inhibidor de la vía Wnt4.

Para modelar la vía femenina, la fase de inicio consideró el estado activo (1) de los nodos de entrada Gata4, Wt1, y el nodo activador de Sry (AS). El nodo del cromosoma Y permaneció en

estado inactivo (0). En la fase de inicio, el nodo *Dmrt1* está en un nivel máximo de activación (2) y el nodo *Sox9* está activo en un nivel (1), mientras que los nodos *Wnt4* y β -catenina están en un estado activo (1). En esta fase de inicio el nodo *Wnt4* mantiene activo al nodo β -catenina, que a su vez mantiene bajo el nivel del nodo *Sox9* (1), mientras que el nodo *Fgf9* mantiene bajo el nivel del nodo *Wnt4* (1). Cuando el modelo transita a la fase de mantenimiento se inactivan los nodos de entrada de la fase de inicio *Gata4*, *AS*, y es activado el nodo AF (Activación de *Foxl2*) y el nodo inhibidor de la vía *Wnt4* (*IW*). En la fase final, el nodo *Foxl2* transita hacia el nivel máximo de activación (2), lo que ocasiona la inhibición del nodo *Dmrt1*, mientras que el nodo *IW* y el nodo *Fgf9* inactivan a la vía *Wnt4*.

8.3 Discusión del modelo de Sánchez y Chaouiya (2016)

Sánchez y Chaouiya (2016) no incluyeron al gen *NROB1* en su modelo. Este gen es relevante porque está asociado a alteraciones en el desarrollo de la gónada, especialmente en individuos 46,XY. Al respecto, Bardoni y colaboradores (1994) reportaron en un estudio clínico, la duplicación de un locus a 160kb de la región Xp21 del cromosoma X. El locus fue originalmente nombrado Dosage Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia Congenita (AHC) on X chromosome gene 1 (*DAX1*). Los pacientes XY con duplicaciones en este locus (actualmente conocido como *NROB1*) presentaron un rango variable de alteraciones que resultaron en reversión del sexo masculino a femenino. Por ejemplo, presentaron estrías de tejido fibroso en lugar de gónadas, algunos pacientes presentaron estructuras derivadas de ductos de Müller, otros pacientes presentaron testículos en área inguinal con hiperplasia de células de Leydig, genitales externos ambiguos con hipospadias, entre otras alteraciones (Bardoni *et al.*, 1994). Sánchez y Chaouiya (2016) no consideraron a *NROB1* y perdieron la oportunidad de modelar un gen en el que se podían haber asignado valores 0, 1, 2, dependiendo su nivel de expresión. Esto es de interés, debido a que las duplicaciones en vía masculina estarían asociadas a un nivel máximo de expresión (2), que conducirían una alteración en el desarrollo de testículos.

El presente Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada consideró al nodo *NROB1*. Se puede observar en la Figura 2a y 2b de la sección de resultados la dinámica de activación de dicho nodo en condiciones silvestres. En la vía masculina, el estado activo de *NROB1* inicia al momento de la determinación y continúa hasta el tiempo 5 de la simulación, antes de que los nodos de la vía masculina lleguen a un estado estable de activación. En el caso de la vía femenina el nodo *NROB1* se activa en el tiempo dos de la simulación y su estado permanece activo, debido en parte al estado

activo de los nodos WT1mKTS, WNT4 y CTNNB1. Estas interacciones de regulación fueron confirmadas en humano (ver Tabla 4 de interacciones y Tabla 5 de reglas lógicas del modelo). También se simuló la duplicación de NROB1 (en estado activo (1) desde el inicio de la simulación), en un contexto XY (Figura 4b). Esta simulación requiere de siete pasos en el tiempo para llegar a un estado estable en el que se observa activación de nodos de la vía femenina. Durante las transiciones de la simulación se activaron nodos de la vía masculina, pero se perdieron por el estado activo de NROB1. Es importante destacar que en el humano la duplicación de este locus resulta en una alteración en el desarrollo de la gónada, especialmente en la vía masculina, sin embargo en experimentos de aumento de expresión de NROB1 en ratón, no se observa que se ocasione reversión del sexo de masculino a femenino, solo se ha observado retraso en la formación de testículos (Swain *et al.*, 1998).

8.3.1 Comentarios sobre el modelo de Sánchez y Chaouiya (2016)

1) Si se analiza al nodo de entrada que corresponde al cromosoma Y (nodo Y), éste nodo debe estar activo (1) para dar inicio y mantener activa a la vía masculina. Consideramos que ésta propuesta es incorrecta debido a que biológicamente el cromosoma Y no tiene efecto en la activación del gen *SRY*. Está reportado que el cromosoma Y contiene al menos 78 genes codificantes. De estos, se ha observado que 11 genes se expresan predominantemente en testículos. Sánchez y Chaouiya (2016), deberían especificar con evidencia experimental cual o cuales genes dentro del cromosoma Y participan en la activación y mantenimiento de la expresión del gen *SRY*. Es importante esclarecer que los factores de transcripción que activan la expresión de *SRY* son: NR5A1, CBX2, WT1, GATA4, los cuales son codificados por genes localizados en autosomas. La evidencia más clara que indica que la activación de *SRY* es independiente al resto de genes que se encuentran en el cromosoma Y, corresponde a los reportes clínicos de translocaciones de secuencias de *SRY* al cromosoma X, o a un autosoma, en individuos 46,XX. Los individuos portadores de esta alteración presentan reversión del sexo de femenino a masculino y tienen un desarrollo masculino aparentemente normal, generalmente descubren su alteración por estudios de fertilidad. Por otra parte, en el modelo de Sánchez y Chaouiya (2016), se desconoce la identidad molecular del nodo activador de Sry (AS). Ambos nodos (Y) y (AS) son usados como nodos activadores de entrada de la vía masculina, pero su identidad molecular es desconocida. En el caso del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada, el nodo UGR es el único que se requiere en un estado activo para detonar los estados de activación de los nodos del modelo. En este caso

el nodo UGR no es una caja negra ya que agrupa la expresión de los genes *LHX1*, *LHX9*, *EMX2*, *PAX2*, *PAX8* que son esenciales para el origen y mantenimiento de la cresta urogenital.

- 2) En el modelo de Sánchez y Chaouiya (2016), el nodo GATA4 solo está activo en la fase de inicio y permanece inactivo en la fase de mantenimiento y en la fase final de los estados de activación. Consideramos impreciso que el nodo GATA4 sea conceptualizado como un nodo transitorio de entrada. Para esclarecer la importancia de GATA4 en el desarrollo de la gónada, véase la sección de resultados experimentales del Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada, dónde se observa claramente con ensayos de inmunofluorescencia, que la señal de GATA4 es intensa desde los 10.5 dpc, que corresponden a la etapa de gónada bipotencial. La expresión de GATA4 se mantiene a los 13.5 dpc, cuando las gónadas están en vía de desarrollo ovárico o testicular. La expresión de GATA4 continúa en gónadas de ratones post parto (aunque la señal es más tenue en comparación con las etapas previas). Por lo tanto, GATA4 es un factor de transcripción esencial para la activación y mantenimiento de ambas vías testicular u ovárica. Por ésta razón, es una idea poco precisa que el nodo GATA4 sea asignado como un nodo de entrada transitorio.
- 3) Los autores consideran que los estados finales de las simulaciones de ganancia o pérdida de función, resultan en el desarrollo hacia testículos u ovarios. En este caso, los autores caen en una imprecisión porque los testículos o los ovarios representan un conjunto de linajes de células diferenciadas y organizadas a nivel histológico. Con los elementos de su red solo pueden hacer inferencias de la población de células que se diferenciará hacia Sertoli o granulosa. En cualquier caso, la ganancia o pérdida de función de un gen dado, comprometerá el desarrollo ovárico o testicular en mayor o menor grado. Por lo tanto, el desarrollo normal quedará impedido. Por ejemplo, algunas mutaciones en los genes *WT1*, *NR5A1*, *NROB1*, *CBX2*, en individuos 46,XY causan disgenesia gónadal completa. Los individuos portadores de ésta alteración carecen de gónadas. En su lugar se observan estrías de tejido fibroso. En resumen, cualquier alteración en los genes asociados al desarrollo de la gónada, ocasionará alteraciones de uno o varios linajes de células de la gónada, que tendrá como resultado alteraciones a nivel histológico de las gónadas.

9 DISCUSION DE LA VALIDACION EXPERIMENTAL

9.1 Ensayos de inmunofluorescencia: El papel de GATA4 en el desarrollo de gónadas

A los 10.5 dpc, cuando los primordios de gónadas son bipotenciales, se pudo observar que GATA4 estaba presente con mucha intensidad en células provenientes del epitelio celómico, que convergen en las crestas genitales (Figuras 9 y 10). En esta etapa se identificó una población de células GATA4 positivas en los bordes del mesenterio dorsal, que parece tener continuidad con células del epitelio celómico de las crestas genitales. Debido a esta observación, puede plantearse la hipótesis de que células somáticas del mesenterio dorsal migran hacia las crestas genitales y ahí se diferenciarán en células que formarán parte de la gónada.

A los 13.5 dpc, se observó que la señal de GATA4 se mantenía con mucha intensidad en ovarios y testículos en vía de diferenciación Figura 11a-c y Figura 12a-c, respectivamente. Por último, fue posible observar la señal de GATA4 en ovarios y testículos y de individuos de 10 días post parto, aunque con mucha menor intensidad Figura 11d-f y Figura 12d-f, respectivamente. En resumen, con los ensayos de inmunofluorescencia se valida la importancia del factor de transcripción GATA4 a través del desarrollo de testículos u ovarios. GATA4 es un factor de transcripción que funciona como activador y regulador de la transcripción de genes asociados a vía masculina o femenina.

Cabe mencionar que la expresión del gen *Gata4* puede observarse en otros órganos en vía de desarrollo. Por ejemplo, *Gata4* y *Gata6* se expresan principalmente en tejidos derivados del mesodermo y endodermo como: corazón, hígado, intestino posterior y medio. En el caso del desarrollo del hígado, se ha observado por estudios *In vivo*, que los factores GATA4-6 se unen a elementos potenciadores del gen de la albumina (*Alb*), lo que favorece la transcripción de este gen. La expresión del gen de la albumina ocurre tempranamente en el desarrollo del hígado y se mantiene a lo largo de la vida del individuo. Por esta razón el gen *Alb* se considera como marcador de hepatocitos en etapas tempranas de desarrollo. Se ha observado en ratones *Gata4* y *Gata6* nulos, que el desarrollo hepático se detiene a los 9.5 dpc (Zorn, 2008). En el caso del desarrollo del corazón, Bondue y colaboradores (2008) reportaron a través de diferentes ensayos, que el factor de transcripción MESP1 promueve de forma directa la expresión de *Gata4* y *Gata6*, entre otros genes asociados a las etapas tempranas del desarrollo cardiovascular. Ratones *Gata4* nulos mueren entre los 8.5 y 10.5 dpc, debido a defectos en el desarrollo del corazón (Kuo *et al.*, 1997), mientras que ratones *Gata6* nulos mueren alrededor de los 5.5 dpc, debido a defectos en el desarrollo de

membranas extraembrionarias (Koutsourakis *et al.*, 1999). Dado que GATA4 está asociado al desarrollo de diferentes órganos, podría suponerse que su localización y función es general y poco específica. Sin embargo, los factores de transcripción GATA son una familia de proteínas, cuya localización durante el desarrollo embrionario, puede observarse en regiones como: sistema nervioso central, espina dorsal, primer y segundo arcos branquiales, vesícula ótica, oído interno, linajes hematopoyéticos (Weiss y Orkin, 1995), entre otros, de manera que la localización de los diferentes factores de la familia GATA no presentan una distribución aleatoria durante el desarrollo embrionario, sino que se localizan en regiones específicas del embrión

9.2 Análisis bioinformático y validación experimental de la inferencia del modelo Booleano

Con el análisis bioinformático se observó que el gen *Wt1* cuenta con una secuencia consenso de inicio de la transcripción [CT][CT]A+1[ATGC][TA][CT][CT], localizada en Chr2:104,966,625. Mientras que el motivo de DNA que reconoce GATA4 fue ubicado a -318pb del sitio de inicio (Tablas 11 y 12). Por otra parte, el ensayo de CHIP sugiere la posibilidad de que *Wt1* tenga un patrón de expresión dimórfico (*i.e.*, activo en el desarrollo testicular e inactivo en desarrollo ovárico a los 13.5 dpc). Lo anterior se infiere de la ausencia de amplicones para el CHIP-DNA de ovario 13.5dpc. Al respecto, se buscó evidencia experimental sobre el posible patrón de expresión dimórfico. Bouma y colaboradores (2004) analizaron los niveles de expresión de genes asociados al desarrollo de la gónada e indicaron que el gen *Wt1* se expresa en niveles similares en testículos/ovarios entre 12 y 14 dpc, aunque no presentan los datos de dicha observación (Bouma *et al.*, 2004). En otro estudio, Smith y colaboradores (2008) reportan por medio de ensayo de inmunofluorescencia, la localización de *RSPO1* y *WT1* en ovarios y testículos de embriones de 14.5 dpc, de tipo silvestre. En el ensayo se observa claramente que *WT1* está presente con mucha intensidad en los bordes de los cordones seminíferos de testículos en desarrollo, mientras que la señal de *WT1* en ovario es reducida. Con su ensayo, los autores observaron dos tipos de poblaciones de células somáticas en el ovario. La primera (*RSPO1+*; *WT1-*), mientras que la segunda fue (*RSPO+*; *WT1+*). Por último Takasawa y colaboradores (2014) cuantificaron el nivel de expresión de *WT1* en ovarios y testículos de ratón de tipo silvestre, entre 11.5 y 14.5 dpc. Los autores reportaron que el nivel de expresión de *WT1* entre los 11.5 y 12.5 es similar en ovarios o testículos. A los 13.5 dpc, se observó disminución de la expresión en ambos tejidos. Sin embargo, a los 14.5 dpc, se observó una tendencia de aumento en testículo, mientras que el ovario mantuvo una tendencia de disminución. Por otra parte, los autores reportaron por un estudio *In vitro*, que el nivel de expresión de *NR5A1* disminuye significativamente en presencia de

FOXL2. Mientras que en presencia de WT1 el nivel de expresión de NR5A1 aumentaba significativamente. Con estos resultados los autores sugieren que NR5A1 es regulado negativamente en el desarrollo ovárico por FOXL2, ya que reconoce un motivo de DNA río arriba de NR5A1. Esta unión es antagónica con la unión que establece WT1 río arriba del mismo gen (Takasawa *et al.*, 2014). En resumen, a los 13.5 dpc, el nivel de expresión de *Wt1* disminuye en testículos y ovarios. Consideramos que la ausencia de señal de GATA4 en el ChIP-DNA de ovario para *Wt1* es consecuencia de este cambio en los niveles de expresión.

9.3 El papel de GATA4 en otros genes asociados a vía ovárica/testicular

Con el análisis bioinformático, se identificó que el motivo de DNA que reconoce GATA4, es distal a la región promotora proximal. En algunos casos la separación es por varios cientos de bases río arriba de la región promotora, como fue observado en *Wt1* y *Spr2d*, mientras que en otros genes como *Amh* y *Gapdh*, el motivo de DNA fue encontrado más cerca de la región promotora (Tablas 11 y 12).

Un hallazgo relevante fue encontrado en el gen *Spr2d*. Este gen forma parte de la familia de genes *SPRR* que codifican proteínas ricas en prolina. Todos los genes de la familia *SPRR* (14 en total), están distribuidos en tándem en un fragmento de DNA de 220kb de extensión en el cromosoma 3 del ratón. *Spr2d* contiene una TATAbox seguida inmediatamente por una secuencia consenso del elemento promotor río abajo (DPE). También se identificaron dos secuencias consenso de inicio de la transcripción. La primera a +443pb y la segunda a +945pb río arriba de TATAbox. Por otra parte, hay dos motivos de DNA que reconoce GATA4 el primero está a -628pb mientras que el segundo está a -433pb respecto a TATAbox. El hallazgo que vale la pena comentar, es la presencia de cuatro motivos de DNA que reconoce SOX9. Tres motivos están río abajo de TATAbox y uno río arriba a -617pb de TATAbox (Tabla 12). Nótese que este motivo está a 11pb de separación del primer motivo que reconoce GATA4. Es importante mencionar que la expresión de *Spr2d* tiene una ventana de tiempo específica tanto en el desarrollo testicular como ovárico (Lee *et al.*, 2009); en el caso del testículo, la expresión de *Spr2d* está reportada a los 11.5 dpc. Sin embargo, a los 12.5 dpc, la expresión se pierde por completo. En el caso del ovario, la expresión está reportada a los 11.5 dpc, y disminuye gradualmente hasta el día 14.5 dpc. Posterior a esta etapa ya no se observa expresión de *Spr2d* en ovario (Lee *et al.*, 2009). Con los hallazgos arriba mencionados, se propone la siguiente hipótesis: El factor de transcripción SOX9 tiene la función de regular negativamente la expresión de *Spr2d*, consideramos que entre 11.5 y 12.5 dpc, de desarrollo testicular, el factor de transcripción SOX9

ocuparía todos los motivos de DNA identificados, para inactivar la expresión de *Sprr2d*. Por otra parte, en el desarrollo ovárico, se esperaría que SOX9 sólo ocupe algunos de estos motivos de DNA, hasta los 12.5 dpc, porque posteriormente se pierde la expresión de SOX9 (Smith *et al.*, 2004). Es importante mencionar que están identificadas otras secuencias motivo de DNA que pueden tener un posible papel de regulación en *Sprr2d*. Por ejemplo, se ha identificado un motivo de DNA que reconoce el factor de transcripción kruppel a -15pb de TATAbox de *Sprr2d*. También están identificadas secuencias motivo que reconocen los factores de transcripción ETS, OCT, AP-1 (Patel *et al.*, 2003). En resumen, la expresión de *Sprr2d* se regula por la combinación de múltiples factores de transcripción. Sería relevante identificar la combinación de factores que regulan su actividad en las etapas tempranas de desarrollo de la gónada, entre los 11.5 y 14.5 dpc.

Otro hallazgo identificado a nivel bioinformático y validado experimentalmente fue el motivo que reconoce GATA4 a -178pb de la primera secuencia consenso de inicio de *Gapdh*. Cabe mencionar que con el análisis bioinformático también se identificaron dos motivos de DNA que reconoce SOX9 (Tablas 11 y 12). Consideramos relevante analizar el posible papel de GATA4 y SOX9 en la activación y regulación de la expresión de *Gapdh*. Está reportado en el humano, que la regulación de la expresión de *Gapdh* depende de elementos de respuesta a insulina IRE-A (-480, -435pb) e IRE-B (-408, -269pb) del sitio de inicio de la transcripción. El factor de transcripción que reconoce estos motivos en el DNA, es la proteína de unión al DNA sensible a la insulina (IBP), por sus siglas en inglés. Además de la insulina, el estrés por hipoxia promueve la expresión de *Gapdh*, ya que hay elementos de respuesta a hipoxia (HRE) por sus siglas en inglés, que son reconocidos por el factor HIF-1 α . Los elementos reguladores arriba mencionados tienen la función de regular positivamente la expresión de *Gapdh*, que resulta en aumento de la glicolisis (Zhang *et al.*, 2015).

Con nuestros resultados de los ensayos de ChIP en gónadas e hígado de embriones 13.5 dpc, no se pudo identificar unión de GATA4 en el motivo de DNA identificado para el gen *Lrp4*. En relación a la región promotora, se identificó que *Lrp4* carece de TATA box y secuencia consenso de inicio. Sin embargo, cuenta con dos secuencias del elemento promotor río abajo (DPE), con una separación de 135pb entre ambas (Tabla 11). Yamaguchi y colaboradores (2006) reportaron con ensayos de inmunofluorescencia, que la expresión de *Lrp4* co-localiza con la expresión de *Pou5f1*, que corresponde a un marcador de células germinales primordiales (PGCs). El patrón de co-localización pudo observarse en las PGCs durante su paso por el intestino posterior; durante su paso por el mesenterio dorsal y en su arribo a las crestas genitales. A los 13.5 dpc, se observó disminución de la señal de *Pou5f1* y *Lrp4* en testículo en comparación con ovarios donde la señal permaneció intensa.

Yamaguchi y colaboradores no pudieron identificar expresión de *Lrp4* en células somáticas de gónada. Por lo tanto, concluyeron que *Lrp4* puede ser considerado marcador de PGCs (Yamaguchi *et al.* 2006). Por otra parte, Hu y colaboradores (2015) observaron lo siguiente: 1) la señal de GATA4 es específica de células somáticas de la gónada; 2) en ratones knock-out condicionales para GATA4, la pérdida de expresión de GATA4 no alteró la migración y el arribo de las PGCs a las crestas genitales sin embargo, se observó que las células germinales no iniciaban la expresión de *Dazl*. Se considera que el inicio de la expresión de *Dazl* marca el inicio de la pérdida de marcadores de pluripotencia y el inicio de la expresión de marcadores de diferenciación sexual de las células germinales que las conducirá hacia células competentes para gametogénesis, 3) Por cultivos *In vitro* de las crestas genitales GATA4 knock-out condicionales, se observó que la expresión de los marcadores de pluripotencia NANOG, OCT4, SOX2, SSEA1 continuaba y las células germinales no entraron en meiosis. Mientras que en crestas genitales control se observó que las PGCs perdieron la expresión de marcadores de pluripotencia y expresaron marcadores del inicio de diferenciación sexual como DAZL, MVH, GCNA, MILI y además entraron a meiosis (Hu *et al.*, 2015). Con la información previa se concluye lo siguiente: 1) No se podía esperar amplicones a partir de CHIP-DNA de hígado, porque *Lrp4* se expresa exclusivamente en PGCs; 2) Dado que las PGCs son GATA4 negativas, no podía esperarse amplicones que indicaran unión de GATA4 río arriba de *Lrp4*; 3) GATA4 actúa de forma indirecta al inducir el cambio del programa de pluripotencia al programa de diferenciación sexual. 4) Se espera que las células somáticas (GATA4+) pre-Sertoli a Sertoli en testículo o pre-granulosa a granulosa en ovario, induzcan a través de una señal parácrina, el cambio hacia el programa de diferenciación sexual en las PGCs. Se considera éste linaje de células porque son las que se asocian directamente con las células germinales para dar soporte.

9.4 Relación de GATA4 con SOX9 y DMRT1

Rahmoun y colaboradores (2017) hicieron ensayos CHIP-seq con anticuerpo anti-SOX9 en testículos embrionarios de ratón 13.5 dpc, y bovino E90. Ambos tejidos correspondieron a la etapa embrionaria de diferenciación de células de Sertoli. En el genoma de ratón se identificaron 5844 picos de señal, mientras que en el bovino se identificaron 8229 picos de señal de SOX9, que fueron asignados a genes específicos. En el ratón, el 70% de los picos fueron localizados preferencialmente dentro del cuerpo del gen es decir, en 5'UTRs, 3'UTRs, exones, e intrones. El 30% restante de los picos de señal fueron observados fuera del cuerpo del gen, río arriba del sitio de inicio de la transcripción. A partir del ensayo de CHIP-seq, los autores presentaron una lista de genes que son blanco de SOX9 en ratón. Por ejemplo: *Emx2*, *Lhx9*, *Wt1*, *Gata4*, *Nr5a1*, *Cbx2*, *Amh*, *Dhh*, *Fgf9*, *Sox9*, *Dmrt1*, *Cttnb1*,

Bmp2, Foxl2, Fst, Nr0b1, entre otros. Cabe mencionar que los autores compararon las secuencias de los picos identificados entre ratón y bovino, y encontraron que el 75% de los picos entre ratón y bovino eran homólogos ya que se traslapaban en una longitud mayor a 500pb. Con estos resultados, los autores indican que SOX9 se une y regula un núcleo de genes que es común en el desarrollo testicular, entre dos especies de mamíferos evolutivamente separadas.

En otro apartado del estudio, los investigadores se preguntaron si podía haber otros motivos de DNA, que estuvieran cerca de la secuencia motivo que reconoce SOX9. Especialmente, preguntaron si había motivos de DNA que fueran reconocidos por los factores de transcripción DMRT1, GATA4, WT1, NR5A1. Se seleccionaron estos factores porque tienen la capacidad de reprogramar fibroblastos embrionarios hacia células de Sertoli embrionarias. Los resultados del análisis mostraron una correlación de cercanía entre la secuencia motivo de DNA que reconoce SOX9 y las secuencias motivo que reconocen los factores de transcripción GATA4 y DMRT1. No se observó asociación de cercanía entre SOX9 y los motivos de DNA que reconocen WT1 y NR5A1. Por otra parte, los autores identificaron el patrón de regiones enriquecidas con secuencias motivo para SOX9, GATA4 y DMRT1 en genomas de otras 12 especies de mamíferos, por lo que consideraron que este patrón está evolutivamente conservado. A este patrón de motivos adyacentes SOX9/GATA4/DMRT1 se le dio el nombre de “firma de célula de Sertoli”. Cabe mencionar que se observó una mayor preferencia de asociación SOX9/GATA4 en comparación con DMRT1. Los investigadores siguieron indagando sobre este patrón identificado y se preguntaron si era un patrón específico de Sertoli o si era un patrón que podía identificarse en otros tipos de células. Los investigadores analizaron datos de ChIP-seq de condrocitos de la costilla, ChIP-seq de células de canal atrio-ventricular, ChIP-seq de células del folículo piloso, ChIP-seq de células de carcinoma basal de ratón, ChIP-seq de células de cáncer colorectal en humano. Los resultados de la comparación indicaron traslape de señal entre las células cancerígenas y el patrón identificado en Sertoli. No se observó traslape con los datos de ChIP-seq de otras células. Además, identificaron que la firma de célula de Sertoli está generalmente ubicada entre -500pb a +600pb respecto al sitio de inicio de la transcripción de los genes analizados. Por último, los autores plantearon que los motivos adyacentes GATA4 y DMRT1 pueden tener la función de señalización para facilitar la atracción de SOX9 a su motivo de DNA, entre otros posibles factores de transcripción. Esto resultaría en la formación de complejos de múltiples factores que regularían la expresión de un gen dado, por lo que sugieren estudios de ganancia-pérdida de función de SOX9/GATA4/DMRT1 para analizar cómo son alterados estos complejos y el efecto en la expresión de sus blancos.

En relación a los resultados obtenidos en la validación experimental del modelo Booleano, se observó que *Spr2d* presenta los motivos de DNA que reconocen GATA4/SOX9 a -628pb y -617pb respectivamente, en relación a TATAbox. Por otra parte, se observó un motivo de DNA que reconoce SOX9 a -365pb de la secuencia consenso de inicio de la transcripción *Amh* mientras que el motivo que reconoce GATA4 se ubicó a -92pb del inicio, y no se identificó la secuencia motivo que reconoce DMRT1. Dado que GATA4 se expresa durante el desarrollo testicular y ovárico, consideramos relevante hacer análisis en ovarios de ratón y bovino con ensayos de ChIP-seq y anticuerpo GATA4 para identificar los blancos a los que se une. El objetivo de estos análisis sería identificar si existe una posible “firma de células de la granulosa” Consideramos que esta posible firma puede contener la secuencia motivo que reconoce FOXL2 y posiblemente otras secuencias motivo. *Foxl2* se considera como uno de los marcadores más tempranos del programa transcripcional de la vía femenina y su expresión se mantiene en las células de la granulosa a lo largo de la vida fértil de los individuos femeninos, además antagoniza con SOX9 para mantener la vía femenina (Hersmus *et al.*, 2008).

10. INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MODELO BOOLEANO Y LOS RESULTADOS EXPERIMENTALES

El Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada integra conceptos biológicos y resultados experimentales en un conjunto de funciones de algebra Booleana. Con las funciones del modelo (Tabla 5), se pudieron analizar los estados de activación de los nodos de la red en condiciones normales o simulando alteraciones. A partir del análisis de la dinámica de activación de los nodos, se infirió que GATA4 tiene el papel de activar genes de la vía masculina y genes de la vía femenina. Dado que *Wt1* es un gen común en ambas vías y existe una secuencia motivo que reconoce GATA4, se decidió validar la unión de este factor de transcripción, río arriba de *Wt1*. Los resultados experimentales validaron dicha unión en la vía masculina, aunque no fue observada en la vía femenina. Cabe mencionar que se pudo validar la unión de GATA4 río arriba del gen *Amh*, asociado a vía masculina y a los genes *Spr2d* y *Sp5* asociados a vía femenina. La unión de GATA4 también fue observada río arriba de un gen constitutivo como *Gapdh*.

Por otra parte, es importante indicar la necesidad de un estudio sistemático de los factores de transcripción GATA4, FOXL2 y el complejo de factores β -catenina+TCF/LEF en células NR5A1+ de gónadas de ratón femenino, entre los 12.0 dpc, y 13.5 dpc, ya que los elementos arriba mencionados tienen una función clave en la activación y regulación de genes de la vía femenina. En resumen, los modelos computacionales aplicados a las redes de regulación génica son de gran utilidad porque

integran el conocimiento biológico obtenido a partir de experimentos para facilitar el entendimiento de sistemas que tienen mecanismos de regulación muy complejos. Desde un punto de vista ideal, esperaríamos que los resultados de las simulaciones de un modelo se ajusten estrechamente con los datos experimentales aunque la resolución del modelo dependerá mucho del estado de conocimiento e integración de las variables que son clave en un sistema biológico determinado. Otro aspecto que vale la pena mencionar, es que los modelos se encuentran en un proceso de mejora continua debido al establecimiento de un asa de retroalimentación positiva derivada de 1) resultados experimentales; 2) integración de los resultados al modelo; 3) análisis del modelo, que resulta en una serie de inferencias; 4) validación experimental de las inferencias para integrarlas al modelo y repetir el ciclo nuevamente.

Finalmente, podemos mencionar que la selección del modelo animal de estudio no es una decisión fácil ya que cada modelo animal presenta ventajas y desventajas en su uso. Por ejemplo, en el caso del ratón de laboratorio, aunque su manejo sea relativamente simple y su tiempo de gestación sea relativamente corto, el proceso de desarrollo de las gónadas es muy rápido ya que el primordio gonadal pasa del estado bipotencial en el día 11.0 dpc, a la determinación del sexo entre 11.0-11.5 dpc, seguido de la activación del programa transcripcional hacia Sertoli o granulosa, mientras que los primeros rasgos de diferenciación a nivel histológico de testículos u ovarios pueden observarse alrededor del día 13.5. Esto quiere decir que el proceso de determinación y diferenciación ocurre en una ventana de tiempo muy reducida. Por lo tanto, es posible que por la rapidez del proceso de desarrollo, el mecanismo molecular y muchas interacciones estén simplificadas o no alcancen a ser detectadas por la brevedad de las mismas. Esto representa un problema cuando los resultados experimentales del ratón tratan de ser extrapolados a otros mamíferos como los humanos. Por ejemplo, en el humano la expresión de *SRY* inicia alrededor del día 42, alcanza un máximo en el día 44 y disminuye gradualmente para el día 52 aunque su expresión no se pierde del todo. Esto quiere decir que en el humano, *SRY* se expresa durante 10 días de desarrollo, mientras que en el ratón la expresión de *Sry* se reduce a aproximadamente 24 horas de desarrollo embrionario. De la misma manera, la diferenciación de Sertoli o granulosa y los primeros indicios de diferenciación histológica de la gónada en humano, requieren más días en comparación con lo que sucede en el ratón. Por lo tanto, el mecanismo molecular perdura más en el humano en comparación con el ratón. Por esta razón, se ha tratado de utilizar un modelo animal que tenga más parecido con los tiempos de gestación del humano. En este caso, el conejo se ha usado como alternativa de modelo de estudio animal. Otro problema que no es trivial cuando se trabaja con gónadas de ratón embrionario, es que

éstas son muy pequeñas y están constituidas por pocas células en comparación con otros órganos como el hígado embrionario. Lo anterior representa un reto a nivel experimental ya que se debe tener habilidad en la forma y tiempo de disección de las gónadas. Además, por su tamaño pequeño, se requiere de varias camadas de ratones embrionarios para agrupar la cantidad de gónadas necesarias para hacer un experimento. En resumen, el estudio de las redes de regulación génica requiere de la integración de dos disciplinas: Biología de Sistemas y Biología experimental. El Modelo Booleano del Desarrollo de la Gónada en Humano pudo integrar ambas disciplinas y generó conocimiento sobre el proceso biológico. Los siguientes estudios relacionados al proceso de determinación y diferenciación de células de la gónada deben concentrarse en la identificación de interacciones de factores de transcripción que tienen una función clave en la vía femenina como: GATA4, FOXL2 y el complejo de factores β -catenina+TCF/LEF, río arriba del sitio de inicio de la transcripción de genes blanco. Los datos experimentales que sean generados, en combinación con estudios de cambio de abundancia de expresión de los blancos identificados, deben ser formalizados en un modelo computacional.

11. CONCLUSIONES

- El Modelo del Desarrollo de la Gónada formaliza en una serie de funciones de algebra Booleana, el proceso biológico de determinación del sexo de la gónada que conduce en su etapa más temprana a la diferenciación hacia el linaje de Sertoli o granulosa. A través de simulaciones computacionales, los nodos transitan por tres fases observadas en el proceso biológico 1) etapa bipotencial; 2) proceso de determinación del sexo; 3) inicio de vía masculina o femenina, que conduce a diferenciación de células de Sertoli o de la granulosa. El punto de divergencia entre ambas vías está dado por el estado de activación del nodo que corresponde al gen *SRY* en la vía masculina, o por el mantenimiento de los nodos que corresponden a de la vía *Wnt4*/ β -catenina en la vía femenina.
- El modelo computacional debe ser actualizado considerando los siguientes aspectos 1) los nodos del modelo deben tener múltiples valores de activación con la finalidad de representar diferentes niveles de expresión; 2) La activación de nodos específicos de vía masculina o femenina, debe darse por arriba de un nivel de activación. Lo mismo debe plantearse para las asas de retroalimentación positiva dentro de cada vía, así como en las interacciones antagónicas entre nodos de las dos vías.

- A partir del análisis de activación de los nodos de la red se infirieron 24 interacciones, la mayoría de éstas en los nodos que corresponden a la gónada bipotencial. Se decidió validar experimentalmente la inferencia del modelo, que sugiere activación del nodo WT1 a partir de la interacción con GATA4. La interacción (unión del factor de transcripción GATA4, río arriba del gen *Wt1*), fue validada en ratón, con ensayos de CHIP en cromatina de testículo embrionario 13.5 dpc, y descartada en cromatina de ovario embrionario 13.5 dpc. Con ensayos de CHIP adicionales, se confirmó la unión de GATA4 río arriba de *Amh* en vía masculina; río arriba de los genes *Sp5* y *Sprr2d* en vía femenina; y río arriba del gen *Gapdh*.
- A través de ensayos de inmunofluorescencia, se observó que el factor de transcripción GATA4 está presente a lo largo del desarrollo de la gónada. Desde la etapa que corresponde al primordio bipotencial, durante las etapas tempranas de diferenciación ovárica/testicular, hasta testículos y ovarios diferenciados de individuos de diez días post parto. Por lo tanto, concluimos que GATA4 tiene un papel relevante para el establecimiento de la gónada bipotencial; para el inicio de la señal de determinación del sexo gonadal y para el mantenimiento del desarrollo ovárico y testicular. Es importante mencionar que GATA4 participa en la activación de genes específicos de vía masculina, así como genes específicos de vía femenina. Por ésta característica, es relevante hacer experimentos que permitan tener un mejor entendimiento del contexto molecular en el que se encuentra GATA4 en vía masculina/femenina.

12. PERSPECTIVAS

- Se recomienda el diseño de estudios experimentales *in vitro* para confirmar los resultados obtenidos por CHIP-PCR. Por ejemplo, se pueden hacer ensayos de retardo de movilidad electroforética para confirmar la unión de GATA4 a los motivos de DNA que reconoce, río arriba de *Wt1*, *Amh*, *Sprr2d*, *Sp5*, *Gapdh*. Otra alternativa, consistiría en analizar los niveles de expresión *in vitro* a partir del diseño de un plásmido que contenga el motivo que reconoce GATA4 y un gen reportero como GFP, en células NT2/D1.
- Se recomienda hacer ensayos de CHIP-seq dirigidos a factores de transcripción clave en el establecimiento y mantenimiento de la vía femenina como GATA4, FOXL2 y el complejo de factores β -catenina+TCF/LEF. El objetivo de dichos experimentos es la identificación de interacciones (positivas/negativas), que conduzcan a la activación de la vía femenina e inhibición de genes asociados a vía masculina. Con estas interacciones se espera obtener un modelo computacional actualizado especialmente para la vía femenina.

13. BIBLIOGRAFÍA

Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL. (2001). Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Mol Cell Endocrinol.* 185(1):17-25.

Achermann, JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. (1999). A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 22(2):125-126.

Albrecht, K. H and Eicher, E. M. (2001). Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Developmental biology,* 240(1), 92-107.

Bansal, M., Belcastro, V., Ambesi-Impiombato, A., & Di Bernardo, D. (2007). How to infer gene networks from expression profiles. *Molecular systems biology,* 3(1), 78.

Barbaro, M., Oscarson, M., Schoumans, J., Staaf, J., Ivarsson, S. A., Wedell, A. (2007). Isolated 46, XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21. 2 interstitial duplication containing the DAX1 gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 92(8), 3305-3313.

Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., *et al.* (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nature* 7: 497-501.

Belville, C., Josso, N., Picard, J. Y. (1999). Persistence of Müllerian derivatives in males. *American Journal of Medical Genetics Part A,* 89(4), 218-223.

Benko, S., Gordon, C. T., Mallet, D., Sreenivasan, R., Thauvin-Robinet, C., Brendehaug. (2011). Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development. *Journal of medical genetics,* 48(12), 825-830.

Bernard P, Sim H, Knower K, Vilain E, Harley V. (2008). Human SRY inhibits β -catenin-mediated transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(12):2889-2900.

Beverdam, A., & Koopman, P. (2006). Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Human molecular genetics,* 15(3), 417-431.

Biason-Lauber, A., Schoenle, E.J., (2000). Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1563–1568.

Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F., & Schoenle, E. J. (2004). A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46, XX woman. *New England Journal of Medicine,* 351(8), 792-798.

Biason-Lauber A, Konrad D, Meyer M, Schoenle EJ. (2009). Ovaries and female phenotype in a girl with 46,XY karyotype and mutations in the CBX2 gene. *Am J Hum Genet.* 84(5):658-663.

Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Iacovino, M., Kyba, M., & Blanpain, C. (2008). Mesp1 acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell stem cell,* 3(1), 69-84.

Bouma, G. J., Hart, G. T., Washburn, L. L., Recknagel, A. K., & Eicher, E. M. (2004). Using real time RT-PCR analysis to determine multiple gene expression patterns during XX and XY mouse fetal gonad development. *Gene expression patterns,* 5(1), 141-149.

- Brennan, J. and Capel, B. (2004). One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 509–521.
- Burris TP, Guo WW, Le T, McCabe ER. (1995). Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the DAX-1 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 214(2):576-581.
- Canto, P., Soderlund, D., Reyes, E., Mendez, P. (2004). Mutations in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89(9):4480–4483.
- Cameron, F. J., and Sinclair, A. H. (1997). Mutations in SRY and SOX9: testis-determining genes. *Human mutation*, 9(5), 388.
- Colvin, JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*. 104(6): 875-889.
- Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. (1998). Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Bio*. 18(5):2949-2956.
- Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P. (2001). The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nature genetics*, 27(2), 159-166.
- Dahl, J. A and Collas, P. (2008). A rapid micro chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). *Nature protocols*, 3(6), 1032-1045.
- Daneau I, Pilon N, Boyer A, Behdjani R, Overbeek PA., Viger R, et al. (2002). The porcine SRY promoter is transactivated within a male genital ridge environment. *Genesis*. 33(4):170-180.
- Demmer, L., Primack, W., Loik, V., Brown, R., Therville, N., & McElreavey, K. (1999). Frasier syndrome A cause of focal segmental glomerulosclerosis in a 46, XX female. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(10), 2215-2218.
- de Mello, M., Coeli, F., Assumpcao, J., Castro, T. et al. (2010). Novel DMRT1 3'UTR+11insT mutation associated to XY partial gonadal dysgenesis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab*. 54(8): 749-753.
- de-Mello, M., Franca, E., Fabbri, H., Maciel-Guerra, A. et al., (2011). Multifunctional role of steroidogenic factor 1 and disorders of sex development. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 55(8): 607-612.
- De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, et al. (1998). Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol*. 18(11): 6653-6665.
- De Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. (2000). Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dynam*. 217(3): 293-298.
- Fraizer GC, Shimamura R, Zhang X, Saunders GF. (1997). PAX 8 regulates human WT1 transcription through a novel DNA binding site. *J Biol Chem*. 272(49): 30678-30687.
- Gardner, T. S., and Faith, J. J. (2005). Reverse-engineering transcription control networks. *Physics of life reviews*, 2(1), 65-88.
- Giordano, J., Prior, H., Bamforth, J., Walter, M. (2001). Genetic study of SOX9 in a case of campomelic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics* 98:176-181.
- Grant Ch. E., Timothy L. Bailey, and William Stafford Noble, "FIMO: Scanning for occurrences of a given motif", *Bioinformatics* 27(7):1017–1018, 2011

- Guellaen, G., Casanova, M., Bishop, C., Geldwerth, D., Andre, G., Fellous, M., & Weissenbach, J. (1984). Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature*, 307(5947), 172-173
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan., *et al.* (2000). SRY, SOX9, and DAX expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mechanisms of development*, 91(1), 403-407.
- Hewitt JK and Warne GL. (2012). 46,XY DSD In: Disorders of Sex Development. Chapter 7 pages 63-79. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hersmus R, Van der Zwan YG, Stoop H, Bernard P, Sreeniwasan R, Oosterhuis JW. (2012). A 46, XY female DSD patient with bilateral gonadoblastoma, a novel SRY missense mutation combined with a WT1 KTS splice-site mutation. *PLoS ONE*. 7(7): e40858-e40858.
- Hersmus R, Kalfa N, de Leeuw B, Stoop H, Oosterhuis JW, de Krijger R. (2008). FOXL2 and SOX9 as parameters of female and male gonadal differentiation in patients with various forms of disorders of sex development (DSD). *The Journal of pathology*. 215(1): 31-38.
- Hiramatsu, R., Matoba, S., Kanai-Azuma, M., Tsunekawa, N., Katoh-Fukui, Y., *et al.* (2009). A critical time window of Sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*, 136(1), 129-138.
- Huang, B., Wang, S., Ning, Y., Lamb, A. N., Bartley, J. (1999). Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *American journal of medical genetics*, 87(4), 349-353.
- Hu, Y. C., Nicholls, P. K., Soh, Y. S., Daniele, J. R., Junker, J. P., van Oudenaarden, A., Page, D. C. (2015). Licensing of primordial germ cells for gametogenesis depends on genital ridge signaling. *PLoS genetics*, 11(3), e1005019.
- Hutson, J. M. (2012). Embryology of the Human genital tract. In: Disorders of Sex Development. Chapter 2 pages 11–21. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ito M, Yu R, Jameson, JL. (1997). DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Bio*. 17(3):1476-1483.
- Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, D Ilot E, Chen XN, Dewing P. (2001). Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sexreversal in humans. *Am J Hum Genet*. 68(5): 1102-1109.
- Jordan BK, Shen JHC, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. (2003). Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ β -catenin synergy. *P. Natl. Acad. of Sci*. 100(19): 10866-10871.
- Jost, A. (1947). Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. Role des gonades foetales dans la differenciation sexuelle somatique. *Archives d Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale*, 36(4), 151-242.
- Karl, J. and Capel, B. (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental biology*, 203(2), 323-333.
- Kauffman, S. A. (1993). The origins of order: Self-organization and selection in evolution. Oxford University Press, USA.
- Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner, C, Goodyer P. (1999). The Wilms tumor suppressor gene (wt1) product regulates Dax-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol*. 19(3):2289-2299.

- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier, MC, et al. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.* 4(6): e187.
- Knower KC, Kelly S, Ludbrook LM, Bagheri-Fam S, Sim, H. Bernard P et al. (2011). Failure of SOX9 regulation in 46XY disorders of sex development with SRY, SOX9 and SF1 mutations. *PLoS ONE.* 6(3): e17751.
- Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer, RR. (2004). Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development.* 131(3): 539-549.
- Köhler, B., Biebermann, H., Friedsam, V., Gellermann, F., et al. (2011). Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46,XY disorders of sex development. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 96(7): E1131-1136.
- Koopman, P., Gubbay, J., Viavian, N., Goodfellow, P. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* (351): 117-121.
- Koutsourakis M, Langeveld A, Patient R, Beddington R, Grosveld F. (1999). The transcription factor GATA-6 is essential for early extraembryonic development. *Development* 126: 723–732.
- Kuo, C. T., Morrisey, E. E., Anandappa, R., Sigrist, K., Lu, M. M., Parmacek, M. S., Leiden, J. M. (1997). GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes & development*, 11(8), 1048-1060.
- Kulasiri, D., Nguyen, L. K., Samarasinghe, S., Xie, Z. (2008). A review of systems biology perspective on genetic regulatory networks with examples. *Current Bioinformatics*, 3(3), 197-225.
- Lee, P., Houk, Ch., Ahmed, S., Hughes, I. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatrics.* 118. e488.
- Lee, H. J., Pazin, D. E., Kahlon, R. S., Correa, S. M., & Albrecht, K. H. (2009). Novel markers of early ovarian pre-granulosa cells are expressed in an Sry-like pattern. *Developmental Dynamics*, 238(4), 812-825.
- Li, Y., Zheng, M., Lau, Y. (2014). The Sex-determining factors SRY and SOX9 regulate similar target genes and promote testis cord formation during testicular differentiation. *Cell Reports* 8, 723–733.
- Lourenco D, Brauner R, Rybczynska M C, McElreavey K, Bashamboo A. (2011). Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *P. Natl. Acad. Sci.* 108(4):1597-1602.
- Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. (2008). Stabilization of B-catenin in XY gonads causes male-to-female sex reversal. *Hum Mol Genet.* 17(19): 2949-2955.
- Manuylov NL, Smagulova FO, Leach L, Tevosian SG. (2008). Ovarian development in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development.* 2008;135(22):3731-3743.
- Matson CK, Murphy MW, Sarver AL, Griswold MD, Bardwell WJ, Zarkower D. (2011). DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. *Nature.* 476(7358):101-104.
- McConnell MJ, Cunliffe HE, Chua LJ, Ward, TA, Eccles MR. (1997). Differential regulation of the human Wilms tumour suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene.* 14(22):2689-2700.
- Mendoza L y Alvarez-Buylla ER. (1998). Dynamics of the genetic regulatory network for *Arabidopsis thaliana* flower morphogenesis. *J Theor Biol.* 193 (2): 307-19.
- Mitchel, C and Harley, V. (2002). Biochemical defects in eight SRY missense mutations causing XY gonadal dysgenesis. *Molecular Genetics and Metabolism* 77: 217-225.

- Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. (2008). A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol.* 9(1):44.
- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H. (2003). Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol.* 17(4): 507-519.
- Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S. (2009). The PGD2 pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development* 136(11): 1813-1821.
- Munger SC, Capel B. (2012). Sex and the circuitry: progress toward a systems-level understanding of vertebrate sex determination. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 4: 401-412.
- Munger, S. C., Natarajan, A., Looger, L. L., Ohler, U., & Capel, B. (2013). Fine time course expression analysis identifies cascades of activation and repression and maps a putative regulator of mammalian sex determination. *PLoS Genet*, 9(7), e1003630.
- Müssel Ch, Hopfensitz M, Kestler HA. (2010). BoolNet an R package for generation reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* 26(10):1378–80.
- Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. (1998). Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell.* 93(3):445-454.
- Nef S, Schaad O, Stallings NR, Cederroth CR, Pitetti JL, Schaer G, Malki S, Dubois-Dauphin M, Boizet-Bonhoure B, Descombes P, Parker KL, Vassalli JD. (2005). Gene expression during sex determination reveals a robust female genetic program at the onset of ovarian development. *Developmental biology*, 287(2), 361-377.
- Ostrer H, Huang HY, Masch RJ, Shapiro E. (2007). A cellular study of human testis development. *Sex Dev.* 1(5):286-292.
- Palmer S and Burgoyne P. (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.
- Park M, Shin E, Won M, Kim JH, Go H, Kim HL. (2010). FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced CYP17 transcription in granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 24(5):1024-1036.
- Patel, S., Kartasova, T., & Segre, J. A. (2003). Mouse Sprr locus: a tandem array of coordinately regulated genes. *Mammalian genome*, 14(2), 140-148.
- Pellegrini M, Pantano S, Lucchini F, Fumi M, Forabosco A. (1997). Emx2 developmental expression in the primordia of the reproductive and excretory systems. *Anat Embryol.* 196(6):427-433.
- Rahmoun, M., Lavery, R., Laurent-Chaballier, S., Bellora, N., Philip, G. K., *et al.* (2017). In mammalian foetal testes, SOX9 regulates expression of its target genes by binding to genomic regions with conserved signatures. *Nucleic Acids Research* 45(12): 7191–7211.
- Renshaw, S. (2013). Immunohistochemistry and Immunocytochemistry. In: *The Immunoassay Handbook* 4th edition, Chapter 4.2 (357-377)., David G. Wild, Elsevier.
- Rey, R. (2005). Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 49(1):26-36.

Rizzo, JM. and Buck, MJ. (2011). All Things ChIP: ChIP-Chip, ChIP-Seq, ChIP-PCR. In: Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Epigenetic Regulation and Epigenomics, Second Edition. Edited by Robert A. Meyers.

Ross DG, Bowles J, Koopman P, Lehnert S. (2008). New insights into SRY regulation through identification of 5' conserved sequences. *BMC MolBiol.* 9(1):85.

Saitou, M. and Yamaji, M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012 (4): a008375.

Sánchez, L and Chaouiya, C. (2016). Primary sex determination of placental mammals: a modelling study uncovers dynamical developmental constraints in the formation of Sertoli and granulosa cells. *BMC Systems Biology* 10:37.

Schmahl J, Kim Y, Colvin JS, Ornitz DM, Capel B. (2004). Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development.* 131;(15):3627-3636.

Sekido R, Lovell-Badge R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453(7197):930-934.

Shaikh, M. G., Boyes, L., Kingston, H., Collins, R., Besley, G. T. N., Padmakumar, B., & Achermann, J. C. (2008). Skewed X inactivation is associated with phenotype in a female with adrenal hypoplasia congenita. *Journal of medical genetics*, 45(9), e1-e1.

Shima Y., Morohashi K. (2016). Leydig progenitor cells in fetal testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1-10.

Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau YFC, Saunders GF. (1997). The Wilms tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res.* 3(12):2571-2580.

Sinclair, A., Berta, P., Palmer, S., Hawkins J., *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.

Smith, C. A., Shoemaker, C. M., Roeszler, K. N., Queen, J., Crews, D., & Sinclair, A. H. (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC developmental biology*, 8, 72-72.

Smith, J. M., Bowles, J., Wilson, M., Teasdale, R. D., & Koopman, P. (2004). Expression of the tudor-related gene Tdrd5 during development of the male germline in mice. *Gene expression patterns*, 4(6), 701-705.

Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., Lovell-Badge, R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761–767.

Tanaka, S., Nishinakamura R. (2014). Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell. Mol. Life Sci.* 71:4781-4802.

Tantawy S, Mazen I, Soliman H, Anwar G, Atef A, El-Gammal M. (2014). Analysis of the gene coding for steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in a cohort of 50 Egyptian patients with 46, XY disorders of sex development. *Eur J Endocrinol.* 170(5): 759-767.

Takasawa, K., Kashimada, K., Pelosi, E., Takagi, M., Morio, T., Asahara, H., ... & Koopman, P. (2014). FOXL2 transcriptionally represses Sf1 expression by antagonizing WT1 during ovarian development in mice. *The FASEB Journal*, 28(5), 2020-2028.

Taketo-Hosotani, T., Merchant-Larios, H., Thau, R. B., & Koide, S. S. (1985). Testicular cell differentiation in fetal mouse ovaries following transplantation into adult male mice. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 236(2), 229-237.

Tevosian, S. G., and Manuylov, N. L. (2008). To β or not to β : Canonical β -catenin signaling pathway and ovarian development. *Developmental Dynamics*, 237(12), 3672-3680.

Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, Majore S, Grammatico P, Achermann JC. (2011). Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments β -catenin signaling. *PLoS ONE* 6(1): e16366.

Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P. (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*. 121(12): 4057-4065.

Tremblay JJ, Viger RS. (1999). Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol*. 13(8):1388-1401.

Tremblay JJ, Viger RS. (2001). Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod*. 64(4): 1191-1199.

Tremblay JJ, Robert NM, Viger RS. (2001). Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Mol Endocrinol*. 15(9):1636-1650.

Tremblay JJ, Viger RS. (2001). GATA Factors Differentially Activate Multiple Gonadal Promoters through Conserved GATA Regulatory Elements 1. *Endocrinology*. 142(3):977-986.

Ungewitte EK and Yao HHC. (2013). How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sex Dev*: 7(1-3).

Ukiyama E; Jancso-Radek A; Li Biaoru; Milos L et al. (2001). SRY and Architectural gene regulation: the kinetic stability of a bent protein-DNA. *Molecular Endocrinology* 15(3):363-377.

Vainio, S., Heikkila, M., Kispert, A., Chin, N. and McMahon, A.P. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397, 405-409.

Velasco, G., Savarese, V., Sandorfi, N., Jimenez, S., Jabbour, S. (2010). 46, XX SRY-positive male syndrome presenting with primary hypogonadism in the setting of scleroderma. *Endocrine Practice*, 17(1), 95-98.

Vilain E, Guo W, Zhang YH, McCabe ER. (1997). DAX1 gene expression upregulated by steroidogenic factor 1 in an adrenocortical carcinoma cell line. *Biochem Mol Med*. 61(1):1-8.

Visootsak, J., Graham, J. (2006). Klinefelter syndrome and other sex chromosomal aneuploidies. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 1:42.

Weigel, D., and Meyerowitz, E. M. (1994). The ABCs of floral homeotic genes. *Cell*, 78(2), 203-209.

Weiss MJ; Orkin SH. (1995). GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23: 99-107.

White S, Ohnesorg T, Notini A, Roeszler K, Hewitt J, Daggag H. (2011). Copy number variation in patients with disorders of sex development due to 46,XY gonadal dysgenesis. *PLoS ONE*. 6(3): e17793.

Wilhelm D, Englert C. (2002). The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes & Development*. 16(14):1839-1851.

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. (2007a). Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological reviews*, 87:1-28.

Wilhelm D, Hiramatsu R, Mizusaki H, Widjaja L, Combes AN, Kanai Y. (2007b). SOX9 regulates prostaglandin D synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J Biol Chem*. 282(14): 10553-10560.

Yamaguchi, Y. L., Tanaka, S. S., Kasa, M., Yasuda, K., Tam, P. P., & Matsui, Y. (2006). Expression of low density lipoprotein receptor-related protein 4 (Lrp4) gene in the mouse germ cells. *Gene expression patterns*, 6(6), 607-612.

Zhang, J. Y., Zhang, F., Hong, C. Q., Giuliano, A. E., Cui, X. J., et al. (2015). Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. *Cancer biology & medicine*, 12(1), 10.

Zheng, R., Rebolledo-Jaramillo, B., Zong, Y., Wang, L., Russo, P., Hancock, W., et al. (2013). Function of GATA factors in the adult mouse liver. *PLoS One*, 8(12), e83723.

Zhong, Q and Layman, L. (2012). Genetic considerations in the patient with Turner syndrome 45,X with or without mosaicism. *Fertility and Sterility* 98(4):775-779.

Zorn, A.M. (2008). Liver development. StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.25.1, <http://www.stembook.org>.



RESEARCH

Open Access



A Boolean network model of human gonadal sex determination

Osiris Ríos^{1,2}, Sara Frias^{1,3}, Alfredo Rodríguez^{1,4}, Susana Kofman⁵, Horacio Merchant³, Leda Torres^{1,4} and Luis Mendoza^{3,6*}

*Correspondence:
ledatorres@gmail.com;
lmendoza@biomedicas.unam.mx
¹Instituto Nacional de Pediatría,
Laboratorio de Citogenética, Av.
Insurgentes Sur 3700 C, 04530
México City, México
³Instituto de Investigaciones
Blomédicas, UNAM, 04510 Mexico
City, México
Full list of author information is
available at the end of the article

Abstract

Background: Gonadal sex determination (GSD) in humans is a complex biological process that takes place in early stages of embryonic development when the bipotential gonadal primordium (BGP) differentiates towards testes or ovaries. This decision is directed by one of two distinct pathways embedded in a GSD network activated in a population of coelomic epithelial cells, the Sertoli progenitor cells (SPC) and the granulosa progenitor cells (GPC). In males, the pathway is activated when the Sex-Determining Region Y (*SRY*) gene starts to be expressed, whereas in females the WNT4/ β -catenin pathway promotes the differentiation of the GPCs towards ovaries. The interactions and dynamics of the elements that constitute the GSD network are poorly understood, thus our group is interested in inferring the general architecture of this network as well as modeling the dynamic behavior of a set of genes associated to this process under *wild-type* and mutant conditions.

Methods: We reconstructed the regulatory network of GSD with a set of genes directly associated with the process of differentiation from SPC and GPC towards Sertoli and granulosa cells, respectively. These genes are experimentally well-characterized and the effects of their deficiency have been clinically reported. We modeled this GSD network as a synchronous Boolean network model (BNM) and characterized its attractors under *wild-type* and mutant conditions.

Results: Three attractors with a clear biological meaning were found; one of them corresponding to the currently known gene expression pattern of Sertoli cells, the second correlating to the granulosa cells and, the third resembling a disgenetic gonad.

Conclusions: The BNM of GSD that we present summarizes the experimental data on the pathways for Sertoli and granulosa establishment and sheds light on the overall behavior of a population of cells that differentiate within the developing gonad. With this model we propose a set of regulatory interactions needed to activate either the *SRY* or the WNT4/ β -catenin pathway as well as their downstream targets, which are critical for further sex differentiation. In addition, we observed a pattern of altered regulatory interactions and their dynamics that lead to some disorders of sex development (DSD).

Keywords: Sex determination, Gonadal sex determination, Boolean model, Gene regulatory network



Background

Sex development is a complex biological process that occurs during the embryonic and fetal stages of an individual. For a better understanding sex development is divided into three consecutive steps: 1) chromosomal sex determination (CSD); 2) gonadal sex determination (GSD); and 3) phenotypic sex differentiation (PSD). CSD is established at conception when the complement of sex chromosomes, XX or XY, is received. GSD, which is the process that we analyze in this study, refers to the set of genes and their regulatory interactions that trigger the development toward testes or ovaries, underlined by a gene regulatory network [1–4]. Finally, PSD involves the development of the female and male internal and external genitalia in response to the hormones secreted by the ovaries and testes. Both male and female PSD occur in two temporal phases, the first occurs within the fetus after GSD and the second occurs during puberty [5, 6].

GSD occurs within a heterogeneously composed structure called bipotential gonadal primordium (BGP). This structure, located on the ventromedial surface of the mesonephros [5–7], is critical for sex development since it can differentiate either as testes or ovaries [8]. The BGP originates the actual gonad that is composed by *a*) the germinal cells (GCs), *b*) the steroidogenic somatic cells, such as the theca cells in ovary and the Leydig cells in testis that produce estradiol and testosterone, respectively; and *c*) the support somatic cells, including granulosa cells in ovary and Sertoli cells in testis.

Sertoli and granulosa cells originate from a common population of coelomic epithelial cells corresponding to the Sertoli progenitor cells (SPC) or granulosa progenitor cells (GPC) that migrate towards the BGP [9, 10]. In males, the SPCs start to differentiate toward Sertoli cells after 44 days of development (Carnegie-Stage 18). The mechanism involves activation of the expression of the Sex-determining Region Y gene (*SRY*) that codifies the *SRY* transcription factor [9, 11]. *SRY* associates with other transcription factors (i.e., *CBX2*, *SF1*) to regulate expression of the *SOX9* gene that positively regulates the expression of genes associated to Sertoli cells (i.e., *SOX9*, *FGF9*, *PGD2*, *DHH*, *AMH*) [2]. In females, where *SRY* is absent, GSD initiates after 49 days of development (Carnegie-Stage 20). In this case, the GPCs of coelomic origin differentiate towards granulosa cells by the action of a distinct gene regulatory pathway. Most likely, an increased amount of the transcription factor β -catenin up-regulates a set of downstream genes associated to granulosa, such as *FOXL2* and *RSPOI* [2, 12, 13]. Thus, the mechanism underlying GSD involves a common population of undifferentiated cells with the potential to diverge into two cell fates. The male pathway leads towards Sertoli cell fate determination and differentiation, whereas the female pathway leads to granulosa cell fate determination and differentiation.

Once differentiated, the Sertoli cells act as organizing centers, enclosing GCs to form testicular cords and secreting factors such as *DHH* and *PDGF*, which are essential for development of the fetal population of Leydig cells [14]. Granulosa cells are the female equivalent of the Sertoli cells, as they enclose GCs and secrete factors necessary for oocyte growth and maturation. The regulatory network controlling GSD and differentiation toward Sertoli or granulosa cell consists, in a broad sense, of multiple target genes, different types of RNAs, transcription factors, nuclear receptors and signaling molecules. These elements are present in undifferentiated cells and interact in a concerted way either

activating or repressing target genes at the time of GSD to balance the fate toward Sertoli or granulosa cells [15–17].

The total number of genes implicated in the regulatory network of GSD of humans and mammals remains elusive, as well as their complete regulatory interactions and their effects on the process of Sertoli or granulosa cells differentiation. However, it is well known that mutations in their components underlay the so-called disorders of sex development (DSD), a series of genetic conditions characterized by anomalies in gonads as well as in internal and external genitalia. The incidence of DSDs, as estimated by the The Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) and the European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE), is 1 in 4,500 births [18] and can be attributed to mutations in various genes of the GSD network. For example, mutations in *CBX2*, *GATA4* and *WT1* genes result in a wide range of phenotypic alterations characterized by ambiguous or female external genitalia with the presence or absence of Mullerian structures in 46,XY DSDs patients [19]. In contrast, 46,XX DSDs cause masculinization of the female fetus (normal males with no ovarian tissue) [20]. In other cases 46,XX DSD patients have a female phenotype but fail to develop ovaries, presenting instead a “streak gonad”? (streaks of connective fibrous tissue) [21].

Boolean network models (BNM) are formal tools for analyzing the structure and dynamic behavior of genetic regulatory networks. BNM are best suited for describing poorly-characterized systems with no or few kinetic details, such as the GSD network. These models represent molecular entities (genes, transcription factors and RNAs) as nodes interacting among them within a network. Each node can have only two qualitative states: 0 (OFF) and 1 (ON). The OFF state is equivalent to a below-threshold concentration or activity, which is insufficient to initiate the intended process or regulation, while the ON state is equivalent to an above-threshold concentration or activity [22]. The ON/OFF state of a node within the network is determined by a Boolean function that encompasses the known regulatory elements of the target node (transcription factors, nuclear receptors, signaling molecules). The state of these regulatory elements is updated over consecutive time steps of a simulation until the system converges to either a steady state or a cycle. BNMs describe the dynamic state of the nodes in a network by updating the state of the nodes according with the set of regulatory functions [23]. BNMs have been implemented for the analysis of developmental programs such as flower morphogenesis in *A. thaliana* [24], early cardiac development in mice [25], and expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila* [26] to name a few.

Despite the relatively high incidence of DSDs, their molecular basis at the level of the regulatory network remain poorly understood. Thus, we are interested in constructing a BNM of the process of gonadal sex determination with an emphasis on the regulatory elements that are present at early stages of development and control the differentiation of SCP and GCP towards Sertoli and granulosa cells, respectively, allowing us to analyze the origin of some DSDs. For in-depth reviews about the genes involved in GSD and DSDs see: [18, 19, 27, 28], as well as the list of genes and interactions in the Additional file 1 of the supplementary information.

In this study we present a BNM that describes the dynamics of the GSD regulatory network starting from the UGR until Sertoli/granulosa cells differentiation. The proposed regulatory network incorporates a large amount of published information related to functional interactions among the genes involved in this process, while the BNM of

GSD describes the dynamics of the elements contained within the network under *wild-type* and mutant conditions. With the current model we explore a formal description of the functional relationships among the genes and gene products associated to GSD, and generate some predictions about the expected regulatory behavior under *wild-type* or altered conditions within elements of the UGR and elements of the bipotential gonadal primordium such as CBX2, GATA4, and WT1. Additional predictions are indicated in the female pathway where the transcription factor β -catenin seems to play an important role in the activation of female-specific genes (for example, *WNT4*, *RSPO1*, and *FOXL2*).

Methods

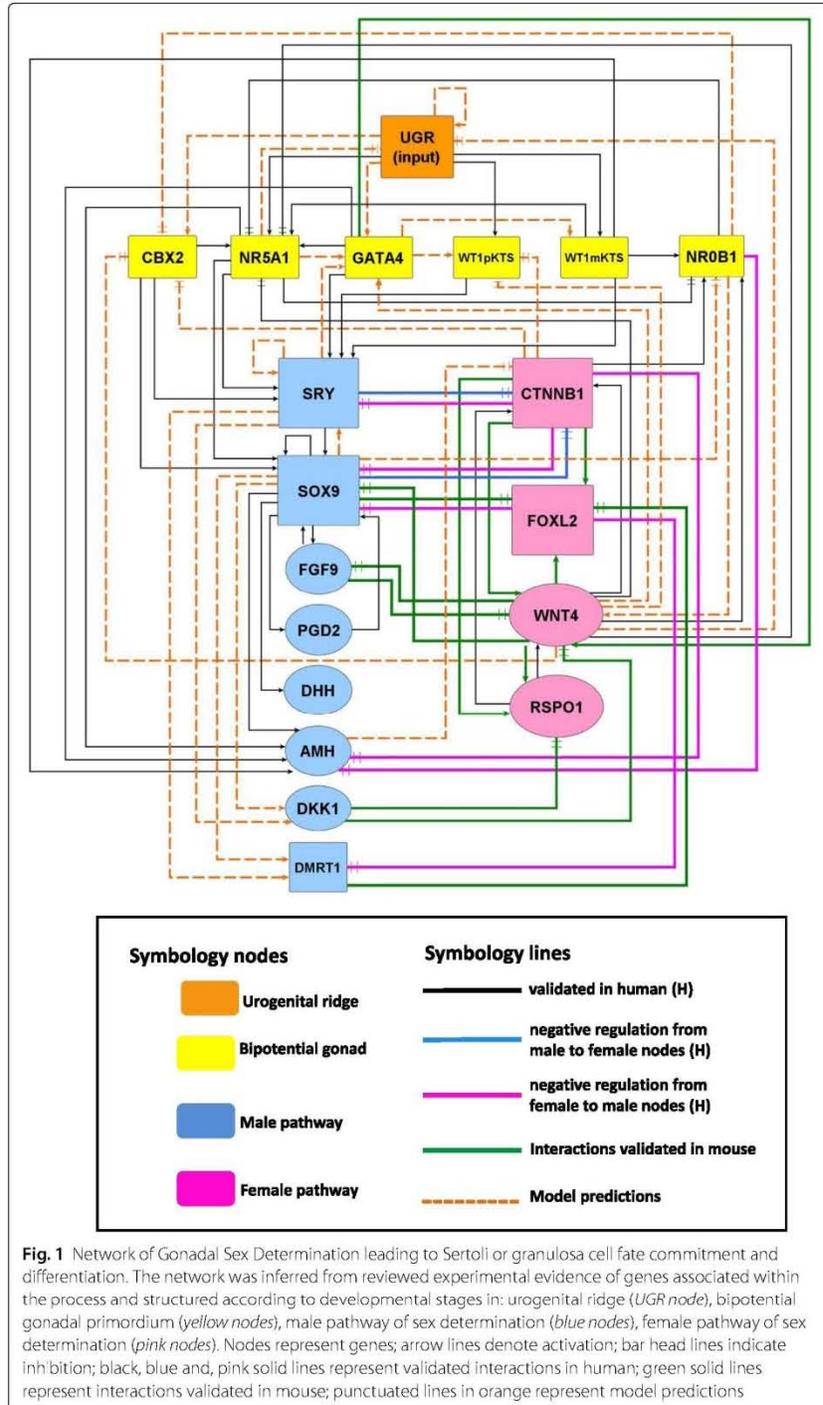
The network of gonadal sex determination

To construct the network we selected a set of genes with well-known clinical and experimental data demonstrating their association to GSD under *wild-type* and mutant conditions. The genes, depicted in a regulatory diagram (Fig. 1), include: CBX2, NR5A1, GATA4, WT1pKTS, WT1mKTS, NR0B1, SRY, SOX9, FGF9, PGD2, DHH, AMH, DKK1, DMRT1, CTNNB1, WNT4, FOXL2, RSPO1, and a special node called UGR. The interactions among these nodes are denoted by edges. We distinguish positive interactions (activation) by connecting two nodes with an arrow-head line. Negative interactions (inhibition) are denoted by connecting two nodes with a bar-head line.

The regulatory interactions among nodes were inferred, with emphasis in humans, from: (1) clinical studies of patients with DSDs, which carried mutations on sex determining genes; (2) genetic expression patterns associated to GSD (between 5th and 8th weeks of embryonic development); and (3) molecular evidence of interactions at the level of transcriptional regulation of target genes (i.e., up or down regulation of a target gene by means of protein-DNA interactions under *wild type*, mutated or transgenic constructs). Experimental evidence on mice was integrated into the network when necessary, especially in the female pathway where human information is lacking. References to clinical and experimental data can be found in the Additional file 1 of the Supplementary Information.

The network includes the special UGR node, representing the urogenital ridge, an embryonic structure precursor of the nephrogenic cord and gonads. The UGR node encompasses the following genes: *LHX1*, *LHX9*, *EMX2*, *PAX2* and *PAX8*. Although expression of these genes is essential for growth and maintenance of the UGR, little evidence was found in human, as well as in mouse, about their specific regulatory interactions, thus these genes were grouped within the UGR node, since mutations in any of these genes impair subsequent gonadal development [29–31].

The pathway towards pre-Sertoli or pre-granulosa cells is shown in Fig. 1. The blue nodes correspond to Sertoli cell fate determination pathway and include: SRY, SOX9, FGF9, PGD2, DHH, AMH, DKK1 and DMRT1 nodes, whereas the pink nodes correspond to granulosa cell fate determination pathway including: CTNNB1, WNT4, FOXL2 and RSPO1. Notice that the granulosa cell fate determination was complemented with mice information. For example, we considered the canonical Wnt4/ β -catenin pathway as a key regulatory element of female nodes within the network since relative expression of *Fst*, *Gng13*, *Foxl2*, *Irx3* and *Sp5* has been shown to be down-regulated when β -catenin is lost in female mice in early stages of ovarian development [32].



The network as a Boolean model

The process of GSD is poorly characterized at the quantitative level, i.e., kinetic information regarding the interactions of the elements of this regulatory network is still lacking, therefore the implementation of the GSD network as a continuous model is, at this moment, out of reach. Given this, we decided to model the network as a discrete dynamical system so as to describe the qualitative observations that are experimentally reported. Specifically, we used a Boolean approach where every node might have one of two possible states; 1 (ON) or 0 (OFF), indicating that a given node within the network model is active or inactive, respectively.

To determine the activation state of each node in the GSD model we translated the experimental regulatory interactions into a set of Boolean functions with the use of the logical operators AND, OR and NOT (Table 1). The logical operator AND is used if two nodes named A and B are required to activate a third node named C. The logical operator OR is used if two nodes named A or B can activate, by its own, node C. The logical operator NOT is used if node A is an inhibitor of node B. Thus, the state of a given node over time is determined by the activation state of its regulators. We integrated to the model additional regulatory interactions not reported by observational or experimental studies (Table 2). These interactions were inferred from analysis of the dynamics of the Boolean model and might be considered as model predictions that deserve further experimentation to be validated. Interactions of model predictions are shown in Fig. 1 as orange dashed lines.

We performed an initial exhaustive evaluation of the dynamic behavior of the *wild type* model, simulating all possible initial activation states. Three fixed-point attractors were obtained, and we performed a search focused in finding the state transitions corresponding to both male and female pathways. To recover the *wild type* "male pathway", we initiated the simulations with the UGR node in ON. In contrast, to create a *wild type* "female pathway", without the SRY node, we set the UGR and WNT4 nodes as active

Table 1 Set of functions for the Boolean model of gonadal sex determination

UGR, UGR & I (NR5A1 WNT4)
CBX2, UGR & I (NR0B1 & WNT4 & CTNNB1)
GATA4, (UGR WNT4 NR5A1 SRY)
WT1mKTS, (UGR GATA4)
WT1pKTS, (UGR GATA4) & I (WNT4 & CTNNB1)
NR5A1, (UGR CBX2 WT1mKTS GATA4) & I (NR0B1 & WNT4)
NR0B1, (WT1mKTS (WNT4 & CTNNB1)) & I (NR5A1 & SOX9)
SRY, ((NR5A1 & WT1mKTS & CBX2) (GATA4 & WT1pKTS & CBX2 & NR5A1) (SOX9 SRY)) & I (CTNNB1)
SOX9, ((SOX9 & FGF9) (SRY PGD2) (SRY & CBX2) (GATA4 & NR5A1 & SRY)) & I (WNT4 CTNNB1 FOXL2)
FGF9, SOX9 & I WNT4
PGD2, SOX9
DMRT1, (SRY SOX9) & I (FOXL2)
DHH, SOX9
DKK1, (SRY SOX9)
AMH, ((SOX9 & GATA4 & NR5A1) (SOX9 & NR5A1 & GATA4 & WT1mKTS)) & I (NR0B1 & CTNNB1)
WNT4, (GATA4 (CTNNB1 RSPO1 NR0B1)) & I (FGF9 DKK1)
RSPO1, (WNT4 CTNNB1) & I (DKK1)
FOXL2, (WNT4 & CTNNB1) & I (DMRT1 SOX9)
CTNNB1, (WNT4 RSPO1) & I (SRY (SOX9 & AMH))

Table 2 Set of regulatory interactions inferred from analysis of the dynamics of the Boolean model, colored in orange, that deserve further experimentation to be validated

UGR, UGR &! (NR5A1 | WNT4)
 CBX2, UGR &! (NR0B1 & WNT4 & CTNNB1)
 GATA4, (UGR | WNT4 | NR5A1 | SRY)
 WT1mKTS, (UGR | GATA4)
 WT1pKTS, (UGR | GATA4) &! (WNT4 & CTNNB1)
 NR5A1, (UGR | CBX2 | WT1mKTS | GATA4) &! (NR0B1 & WNT4)
 NR0B1, (WT1mKTS | (WNT4 & CTNNB1)) &! (NR5A1 & SOX9)
 SRY, ((NR5A1 & WT1mKTS & CBX2) | (GATA4 & WT1pKTS & CBX2 & NR5A1) | (SOX9 | SRY)) &! (CTNNB1)
 SOX9, ((SOX9 & FGF9) | (SRY | PGD2) | (SRY & CBX2) | (GATA4 & NR5A1 & SRY)) &! (WNT4 | CTNNB1 | FOXL2)
 FGF9, SOX9 &! WNT4
 PGD2, SOX9
 DMRT1, (SRY | SOX9) &! (FOXL2)
 DHH, SOX9
 DKK1, (SRY | SOX9)
 AMH, ((SOX9 & GATA4 & NR5A1) | (SOX9 & NR5A1 & GATA4 & WT1mKTS)) &! (NR0B1 & CTNNB1)
 WNT4, (GATA4 | (CTNNB1 | RSPO1 | NR0B1)) &! (FGF9 | DKK1)
 RSPO1, (WNT4 | CTNNB1) &! (DKK1)
 FOXL2, (WNT4 & CTNNB1) &! (DMRT1 | SOX9)
 CTNNB1, (WNT4 | RSPO1) &! (SRY | (SOX9 & AMH))

at the beginning of simulations. Besides the *wild type* model, we simulated all possible loss and gain of function of single mutants, so as to describe alterations in activation states that might be interpreted as alterations in gene expression. Loss and gain of function single mutants were simulated by fixing the relevant node to 0 or 1, respectively. All simulations were carried out under the synchronous updating scheme with the use of BoolNet [33].

Testing properties of the Boolean model: random networks and robustness of attractors

We performed tests by creating random networks in order to analyze the frequency of appearance of point attractors identical to those of the wild type model (Fig. 2). The tests consisted in the construction of 1000 random networks with 19 nodes each one. The number of inputs for each node in the random networks was the same as in the original model. We kept this configuration in order to be consistent with the network architecture of the model. The wild type attractors shown in (Fig. 2) were compared by performing three independent tests of 1000 random networks each one. Additionally, we tested the

UGR	CBX2	GATA4	WT1mKTS	WT1pKTS	NR5A1	NR0B1	SRY	SOX9	FGF9	PGD2	DMRT1	DHH	DKK1	AMH	WNT4	RSPO1	FOXL2	CTNNB1	% Sim. space	Cell fate
0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	48.91	Toward Sertoli
0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	50.95	Toward granulosa
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.14	---

Fig. 2 Fixed point attractors of the Boolean model of gonadal sex determination. The attractors were obtained by simulating all possible (2^{19}) initial activation states. The attractor with the largest basin of attraction (50.95 %) can be interpreted as the gene expression profile observed in the somatic pre-Granulosa cells. The attractor with the second-largest basin (48.91 %) can be interpreted as the gene expression profile observed in the somatic pre-Sertoli cells. The model also presents a third attractor with a small basin covering only 0.14 % of the state space interpreted as a null attractor due to a UGR node set to zero

robustness of the attractors of the BNM with a set of 1000 perturbed copies of the network by using the *testNetworkProperties* function of BoolNet [33]. This test gives the percentage of the original attractors shown in Fig. 2 recovered after 1000 copies of the Boolean model functions randomly perturbed.

Results

The network of gonadal sex determination

The network was constructed with 19 nodes and 78 regulatory interactions: 42 of these interactions have been reported in humans; 12 in mice and 24 were predicted from analysis of transition states of the simulated Boolean model. The network is directed towards the male pathway if the SRY node is active. SRY leads to activation of SOX9, which in turn activates FGF9, PGD2, DMRT1, DHH, DKK1, and AMH nodes. At the same time, the female pathway is repressed by inactivating CTNNB1 and FOXL2 nodes (Fig. 1). On the contrary, the network is directed towards the female pathway in absence of SRY and when the WNT4, CTNNB1, RSPO1 and, FOXL2 nodes are active. In this case, the male pathway is repressed by CTNNB1 and FOXL2 mediated inactivation of SOX9, DMRT1 and AMH (Fig. 1).

Predictions of the Boolean model

The current model contains 24 interactions inferred from dynamic modeling, these are predominantly related to the UGR node and the genes expressed in the bipotential gonad. Model predictions were drawn as orange dashed lines within the following nodes: UGR, CBX2, GATA, WT1mKTS, WT1pKTS, NR0B1, SRY, DMRT1, DKK1, WNT4 and CTNNB1 (Fig. 1). The model predicts that the activity of UGR depends of an activation self-loop and functions as an input to activate CBX2, GATA4, Wt1mKTS, WT1pKTS, and NR5A1 (Table 2). The scarcity of information regarding UGR function and maintenance clearly indicates that more experimental studies are necessary to understand the mechanisms of gene expression control in the BGP especially for *CBX2*, *GATA4* and *WT1*.

Dynamic behavior of the gonadal sex determination Boolean network model

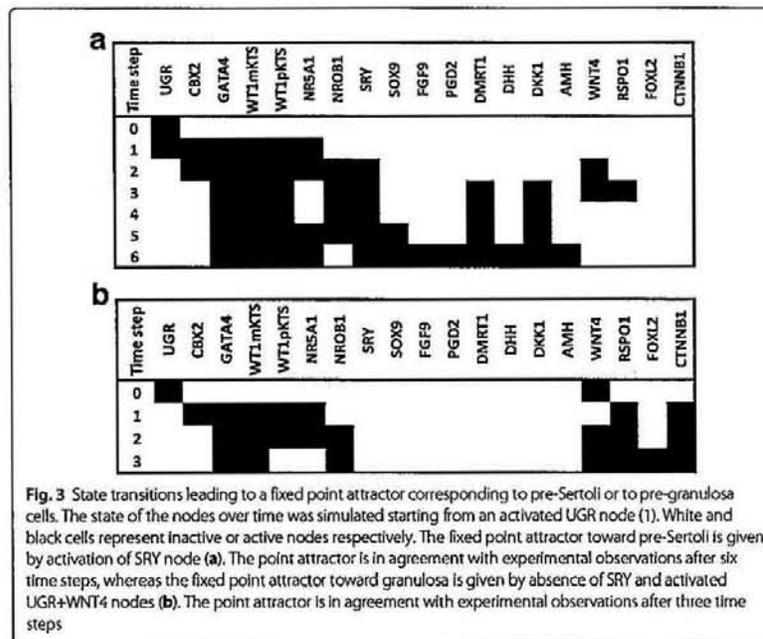
The dynamic behavior of the GSD BNM was exhaustively analyzed by starting the dynamical simulations of the system from all possible $2^{19} = 524288$ initial states. After simulations, three fixed-point attractors were obtained (Fig. 2). The first of these attractors can be interpreted as the gene expression profile observed in Sertoli cells, the second can be interpreted as the gene expression profile observed in granulosa cells, and the third attractor, with a very small basin of attraction, might represent a disgenetic gonad without Sertoli or granulosa activity.

After the initial exhaustive search of the GSD attractors, we performed a search focused in finding the state transitions of both male and female pathways. In the case of 46,XY simulations, the UGR node was set to ON in the initial condition (Time step 0) to transit toward the BPG and then turning ON the SRY node leading toward the Sertoli cell attractor. Since 46,XX *wild type* females do not have *SRY* gene, we searched from all possible initial states the activation patterns that had UGR and female nodes as initial condition. From this search we found that UGR + WNT4 were the initial conditions (Time-step 0) to transit from the BPG toward the granulosa attractor. Thus in male and female simulations we started with an active UGR node as the initial condition, followed by activation of

the nodes representing the BPG (CBX2, GATA4, WT1mKTS, WT1pKTS, and NR5A1). The NR0B1, WNT4 and RSPO1 nodes were subsequently activated, in agreement with the reported gene expression patterns, showing that these genes are co-expressed in both male and female embryos during the stage of BPG and previous to GSD (Fig. 3a and b) [7, 34].

If the simulation transitioned toward the Sertoli attractor, then the NR0B1, WNT4 and RSPO1 nodes were inactivated by NR5A1, SRY, SOX9 and DKK1 nodes. In male the expression of *NROB1* is dosage sensitive, since duplication of this gene in 46,XY patients produces a male-to-female sex reversal with streak gonads [35]. It is important to notice that *NROB1* might play an important role in male after the time of GSD because *NROB1* knockout mice showed disorganized Sertoli, Leydig and germ cells due to defects in testis cord formation [36]. Thus, it has been suggested that *NROB1* has a time frame of expression [37] with reduced levels of the DAX1 protein during GSD. Since the BNM considers active or inactive states, the NR0B1 node was inactive at the sixth time step, which corresponds to the Sertoli attractor (Fig. 3a)

When the UGR + WNT4 nodes were set to ON, two fixed point attractors were obtained: (1) the granulosa attractor and the (2) dysgenetic gonad attractor. Thus the transition towards the granulosa attractor is characterized by the initial activation of the UGR + WNT4 and BPG nodes, followed by activation of the NR0B1, RSPO1, FOXL2 and CTNNB1. As we previously stated, β -catenin, plays a key role in up-regulation of pre-granulosa genes in female mouse [32], this factor actively antagonizes *SOX9* and *AMH* expression, inactivating the pathway toward Sertoli cells (Fig. 3b) [38, 39]. The attractor with no activity reflects the importance of the UGR node within the network model



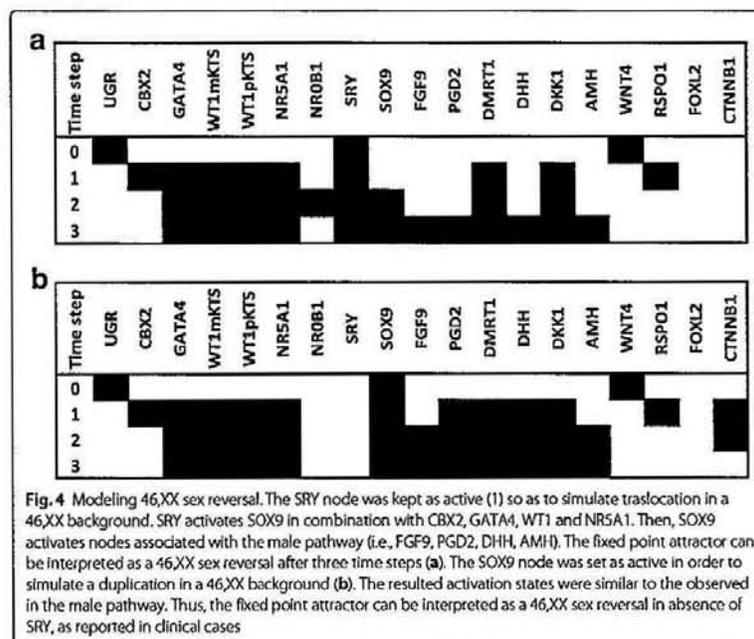
given that loss of function mutants of UGR components have an impaired subsequent gonadal development, as observed in mouse. Therefore, the dysgenetic gonad attractor (i.e., streaks of fibrous tissue instead of a gonad) might be interpreted as a condition expected in some individuals when gonadal development fails, especially in the case of *LHX1*, *LHX9*, *EMX2*, *PAX2* and *PAX8* mutants.

In summary, state transitions in Fig. 3a and b qualitatively coincide with gene expression patterns observed during GSD [7, 34]. However, notice that the state transitions and steady state attractors must be considered as snapshots of the gene expression pattern between 41–52 days of development and do not represent the complete process of gonadal development.

Modeling disorders of sex development

46,XX sex reversal

We simulated the DSD known as 46,XX sex reversal or testicular DSD, characterized by an apparently normal development of male structures, including testes and male internal/external genitalia [20, 40]. To simulate such a condition either the SRY node or the SOX9 node were left permanently active (ON = 1) during the entire simulation (Fig. 4a, b). The SRY node activates SOX9 in coordination with CBX2, GATA4, WT1 and NR5A1, SOX9 in turn inhibits the female pathway through CTNNB1 inactivation. CTNNB1 is the node of the transcription factor β -catenin, a key regulatory element of the female pathway. Our BNM generates in both simulations a *Sertoli-like* attractor that presents activation of the FGF9, PGD2, DMRT1, DHH, DKK1 and AMH nodes. The simulation observed in Fig. 4a might be interpreted as the process underlying a 46,XX sex



reversal when the *SRY* gene is translocated to one autosomic chromosome or to the X chromosome, whereas the simulation in Fig. 4b might represent a 46,XX sex reversal due *SOX9* gene duplication.

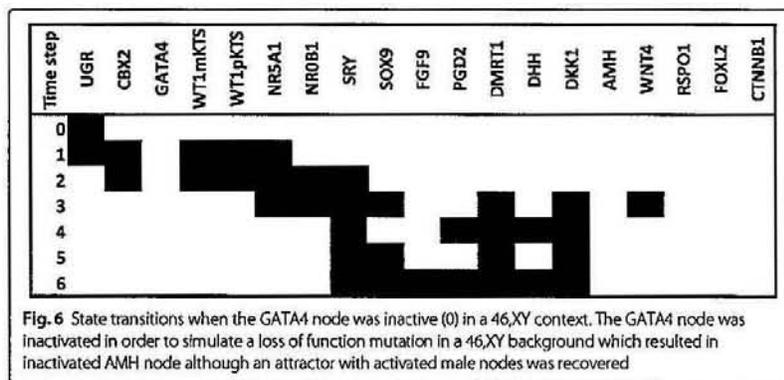
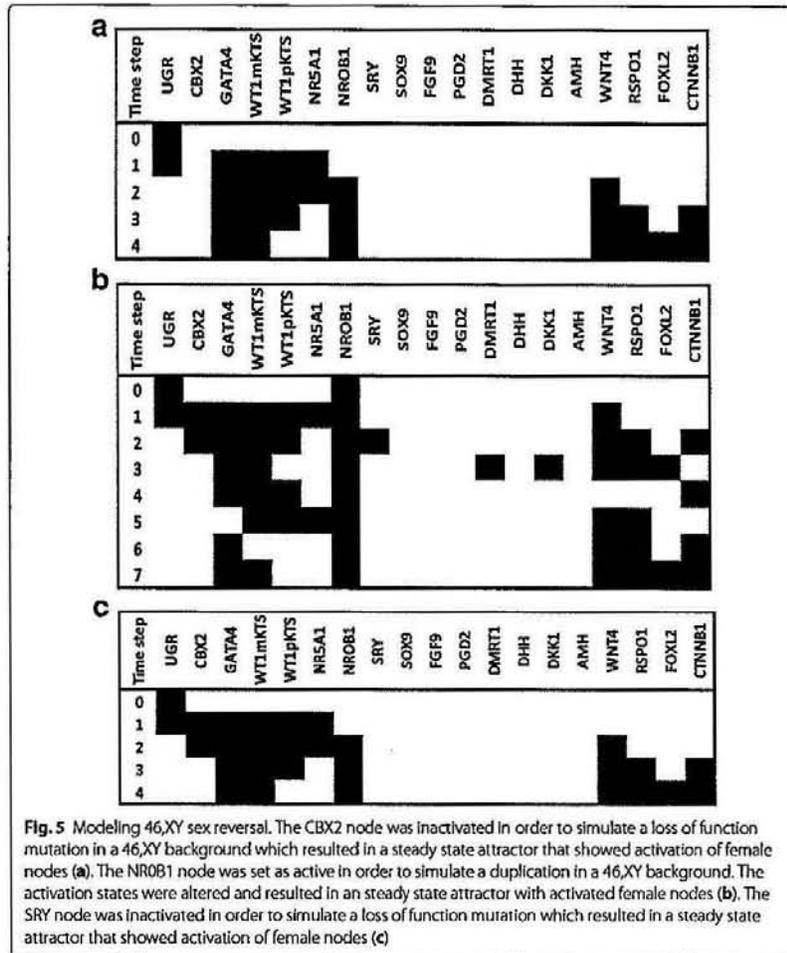
46,XY (SRY-) sex reversal

SRY is considered the trigger of the male pathway and testis development [9]. This transcription factor possesses a highly conserved domain called HMG box that binds to the GAACAAAG DNA motif and bends the DNA molecule about 80 degrees. The loss of its chromatin-remodeling activity [41] is considered to impair the three dimensional architecture of chromatin and compromises the proper interaction of *SRY* with its target genes. Mutation of the DNA binding region of *SRY* in 46,XY subjects has been associated with female external genitalia, normal Mullerian ducts and streak gonads [42]. When we simulated the *SRY* loss of function, the female pathway was activated by the *CTNNB1* node and the male pathway blocked through a *CTNNB1* and *FOXL2*- mediated *SOX9* inhibition. *SRY* is considered the trigger of testis development by expressing in the somatic pre-Sertoli cells [9]. The mechanism suggested for normal function of this transcription factor is a highly conserved domain within the protein, called High Mobility Group (HMG box).

Concerning the model simulation in Fig. 5c, loss-of-function of *SRY* leads to inactivation of the male and activation of the female pathway. To this respect, Hawkings and colleagues [42] described five subjects with 46,XY karyotype associated with completely female external genitalia, normal Mullerian ducts, and streak gonads. All the patients showed mutations in the DNA binding region of the *SRY* protein [42]. Since model simulations agree with clinical observations of loss-of-function mutations in the HMG box of *SRY*, we interpret this simulation as the possible gene expression dynamics in a 46,XY (*SRY*-) individual during the time of GSD. In these subjects the female pathway would become active by increasing amounts of β -catenin within the cell nucleus and active repression of the male pathway by a B-catenin and *FOXL2*-mediated inhibition of *SOX9*. Given this results we interpret that our simulations (Fig. 5c) resemble the early gene expression dynamics in a 46,XY (*SRY*-) individuals.

Modeling other DSDs

Other relevant elements that have a common function in both male and female pathways at the BPG and thorough the differentiation of testis and ovaries are the transcription factors *GATA4* and *WT1*. In the case of *GATA4*, it has been observed in mice that *GATA4* is expressed at E10.5 during formation of the UGR and its deficiency impairs subsequent gonadal differentiation [43]. In the male pathway, *GATA4* associates with the -KTS isoform of *WT1* protein for an optimal activation of the *SRY* gene [44]. Other example of the *GATA4* protein activity in the male pathway is its role in the activation of the *AMH* gene in association with *SF1* and *WT1-KTS* transcription factors [45, 46]. Simulation of *GATA4* loss of function in the male pathway is given in Fig. 6 (notice the altered dynamics of activation patterns compared with the *wild-type* simulation shown in Fig. 3a). *WT1mKTS*, *WT1pKTS*, *NR5A1* and *AMH* nodes were inactive in the attractor because the *GATA4* node is their positive regulator. The *SRY* node remained active due to an activation self-loop and additional interactions with *NR5A1*, *WT1mKTS*, *CBX2* and a possible feedback loop with *SOX9*, thus the altered activation



state shown in Fig. 6 might be interpreted as the source of a DSD. To this respect, the clinical spectrum of developmental anomalies due to *GATA4* mutations in male patients is variable. Patients might show bilateral dysgenetic testes containing Sertoli cells and no visible Leydig cells and show male internal genitalia to normal-ambiguous external genitalia [46].

On the other hand, *WT1* has a key role in the development of kidney and gonads, its expression is observed at the UGR and continues through the differentiation of testis and ovaries interacting in both pathways of cell differentiation. Homozygous mutations in mice are embryonic lethal and result in renal agenesis, as well as cardiac and genital tract abnormalities [29]. Since *WT1* is an important element in early stages of gonadal development we simulated the loss of function of *WT1* in a 46,XY context (Fig. 7), notice that the attractor has an activation pattern similar to the female pathway. Importantly, mutations in this gene impair the development of male in a certain degree; mutations in the intron 9 splice site of the *WT1* gene affects the balance of the +KTS/-KTS isoforms impairing the development of testis resulting in streak gonads and ambiguous external genitalia [47]. In females the role of *WT1* is less defined, however there is experimental evidence about its role in the positive regulation of the *NROB1* gene by binding to two potential sites located at the 5 flanking region of the gene [48].

We analyzed in addition the effect of loss-of-function mutations in the NR5A1 node. Since the dynamics of the simulations of *WT1* and *NR5A1* were identical we show only the attractor in Fig. 7.

Testing properties of the Boolean model: random networks and robustness of the attractors

On average, the three independent tests of 1000 random networks generated 103,000 attractors each one. We found that none of the random networks recovered the set of three point attractors of the *wild type* model shown in Fig. 2. This results indicate that the attractors of our BNM could not be expected in a network made with random interactions. Thus, the attractors in Fig. 2 can be considered as biologically meaningful and not a statistical artifact.

Concerning the test of attractor robustness we observed that 95% of the perturbed networks recovered less than 30% of the original attractors of our model. This means that the model is relatively sensitive to perturbations in the functions of the model. The reduced robustness can be due to the scarce redundancy in the model, given that we opted by including a small number of regulatory molecules, so as to be close to a minimal model. We expect that the introduction of more nodes and regulatory feedback circuits would result in an increased robustness.

Fixed state	UGR	CBX2	GATA4	WT1mKTS	WT1pKTS	NR5A1	NROB1	SRY	SOX9	FGF9	PGD2	DMRT1	DHH	DKK1	AMH	WNT4	RSP01	FOXL2	CTNNB1
WT1=0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
NR5A1=0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

Fig. 7 Fixed point attractors when setting NR5A1 or WT1 inactive (0) in a 46,XY context

Discussion

The classical observations of Alfred Jost (1947) that early castration *in utero* of rabbit fetuses resulted in female internal and external genitalia (independent of their chromosomal sex complement) lead to the hypothesis of a testis-determining factor (TDF). According to this hypothesis the ovary was considered the default developmental state, while testis represented an induced and active state that repressed female development. Experimental evidence accumulated in the last 20 years have enriched our view of sex determination where developmental programs toward testis or ovaries represent two independent antagonistic regulatory pathways of high complexity intertwined in a regulatory network: the GSD network.

The BNM used in this study, although discrete in its approach, can be considered as a simplified version of a very dynamic and complex biological network that incorporates the major regulatory elements of the GSD network. The GSD BNM summarizes in a formal language the set of experimentally-confirmed interactions associated with the process of GSD. Although the attractors obtained in our model cannot be interpreted as anatomical structures of high developmental complexity, they can be reliably seen as the gene expression profiles expected during the process of determination and differentiation of SPC and GPC towards Sertoli and granulosa cells respectively.

The network of gonadal sex determination

We inferred the regulatory network of human GSD and modeled it as a BNM. With such a model we were able to describe the molecular dynamics of the first stage in gonadal morphogenesis, which is the cell fate determination and further differentiation of Sertoli and granulosa cells. The network contains 19 nodes as well as their regulatory interactions, as evidenced by published experimental and clinical data.

Recent studies regarding early gonadal differentiation suggest a highly complex biological process regulated by many, probably hundreds, of genes. However, our BNM shows that only a handful of them are sufficient to activate the male or female pathway, allowing us to propose that the gonadal fate commitment and differentiation is a direct consequence of activation and repression of a transcriptional program encoded as a regulatory network. Although part of the information used to infer this regulatory network was taken from experiments in mice, we consider that the model might be considered as a good approximation to the corresponding regulatory network in humans.

The Boolean model of gonadal sex determination

The BNM describes the dynamics of 19 nodes associated with GSD between 41–52 days of embryonic development. The results cannot be considered as final activation states of the biological process, instead they should be considered as a snapshot in the process of Sertoli and granulosa cell differentiation. At the quantitative level, GSD is poorly understood given the lack of information about kinetic details of each regulatory element, therefore it is difficult to establish a continuous model with differential equations with the current available data. Despite the large amount of gene expression data, little is known about the regulatory mechanisms leading to GSD under normal conditions, as well as their downstream effects under mutant conditions. To shed light about the regulatory mechanisms we used a discrete modeling approach because most of the information relies on qualitative descriptions.

Model predictions and the role of the UGR and bipotential gonad genes in early gonadal development

The UGR is a very important structure within the developing embryo since it is the common structure that leads to testis and ovaries. Notice that just a few regulatory elements of the UGR have been studied. For example, *Lhx1* expression has been reported in mice and has a key role in the development of kidney, female reproductive tract and anterior head [30]. Conditional knockout mice lack uterus, cervix and upper vagina [49]. *Lhx9* has a role in the activation of *Nr5a1* gene, in synergy with *Wt1* in mice. Other example is given by *PAX2* and *PAX8* genes. In humans, these genes have a role in the activation of the *WT1* gene [29, 50] thus, we underline the need for additional studies regarding the regulatory interactions that led to the establishment of the UGR and BPG primordium.

As we mentioned previously, the human female pathway is less characterized, and its current cumulative knowledge is mainly based on mice findings. In this case, the GATA4-FOG2 complex has an important function by activating the *Fst*, *Wnt4*, *Sprrr2d*, *Foxl2*, *Gng13* genes [32]. It has been observed in female mice that loss of function of *Gata4* impairs the expression of these genes and leads to the development of a male-specific coelomic vessel [32]; therefore GATA4 can be considered as a key regulatory element in the early stages of gonadal development toward ovaries.

The role of WNT4/ β -catenin in the female pathway

Concerning the female pathway most of the inferred interactions derive from mice. To this respect we notice the role of the WNT4 and β catenin nodes in the regulation of WNT4, RSPO1, and FOXL2. In the biological process we predict a key role of β -catenin regulating the female pathway. The general mechanism of the canonical Wnt4/ β -catenin signaling pathway can be explained as follows: the pathway is initiated by expression of the wingless-type MMTV integration site family, member 4 (*WNT4*). The product of this gene is a ligand that binds to Frizzled (*Fz*) and LRP5/6 co-receptors at the plasma membrane, disengaging β -catenin from the proteins of the "destruction complex" (Axin and APC). Then β -catenin translocate into the nucleus where associates with TCF7/LEE, this protein contains an HMG box with capacity to recognize specific DNA sequences. The β -catenin-TCF7/LEF complex activates target genes, whereas in absence of β -catenin TCF7/LEF alone represses gene transcription [51, 52]. From the set of interactions inferred from mice, that fitted perfectly in our model, we would expect that β -catenin might have an important role regulating the expression of the *FST*, *FOXL2* and *IRX3* genes in humans.

The BNM of GSD summarizes in a formal language the set of experimentally-confirmed interactions associated with the process of GSD. The attractors of our model can be interpreted as the gene expression profiles expected during the process of GSD and differentiation of Sertoli or granulosa cell lineages. According to our simulations, the loss of function of GATA4 results in inactivation of the AMH node in the attractor. This result is particularly interesting given the existence of the persistent Müllerian duct syndrome (PMDS), a relatively rare inherited defect in the sexual differentiation, characterized by failure in the regression of the Müllerian ducts in males. Affected individuals present persistent uterus and tubes due to a defect in the synthesis of the AMH hormone, which is normally produced by the Sertoli cells. Mutations in the AMH gene have been reported in these patients [20, 53], however the majority of PMDS remain without molecular

diagnosis, therefore GATA4 mutations emerge, according to our model predictions, as a potential PMSD causing gene.

Conclusions

We propose the present model as a starting point for future mathematical modeling and integration of experimental research regarding sex development. The model can be upgraded in several aspects for example, incorporating additional nodes and interactions, as well as modeling more cell lineages of the gonad such as the Leydig or theca cells. Finally the current BNM describes the dynamics of the GSD network under perturbations. Importantly the analysis of these states can have potential implications in the study of DSDs.

Additional file

Additional file 1: Supplementary Information. (PDF 47 kb)

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

LT and SF conceived the project; OR, LM and AR developed the BNM and performed the simulations; LT and LM coordinated computational work; OR, LT, LM, AR and SF, analyzed the data; SK and HM provided important contribution for including nodes and interactions and for discussion; OR, SF, and LT, wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

OR thanks the support from the program Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM, and the scholarship 173000 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). This work was supported by grants from CONACYT 166012 to HM, Universidad Nacional Autónoma de México PAPIIT IN200514 to LM, and Recursos Fiscales para la Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, proyecto 057/2014 to LT. Adhemar Liguitya from CompBioLab IIB, UNAM, aid with the test of random networks.

Author details

¹Instituto Nacional de Pediatría, Laboratorio de Citogenética, Av. Insurgentes Sur 3700 C, 04530 México City, México. ²Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM, Mexico City, México. ³Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 04510 Mexico City, México. ⁴Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, Mexico City, México. ⁵Facultad de Medicina/Hospital General de Mexico, Mexico City, México. ⁶C3, Centro de Ciencias de la Complejidad, UNAM, 04510 Mexico City, México.

Received: 21 August 2015 Accepted: 30 October 2015

Published online: 16 November 2015

References

- De Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F, Berta P. Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dynam.* 2000;217(3):293–8.
- Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 2012;20(1):215–38.
- White S, Sinclair A. The molecular basis of gonadal development and disorders of sex development. In: Hutson JM, Warne GL, Grover SR, editors. *Disorders of sex development: An Integrated Approach to Management*. Heidelberg: Springer Berlin; 2012. p. 1–9.
- She ZY, Yang WX. Molecular mechanisms involved in mammalian primary sex determination. *J Mol Endocrinol.* 2014;53(1):R21–37.
- Sajjad Y. Development of the genital ducts and external genitalia in the early human embryo. *J Obstet Gynaecol Re.* 2010;36(5):929–37.
- Hutson JM. Embryology of the human genital tract. In: Hutson JM, Warne GL, Grover SR, editors. *Disorders of sex development: An Integrated Approach to Management*. Heidelberg: Springer Berlin; 2012. p. 11–21.
- Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, et al. SRY, SOX9, DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Develop.* 2000;91(1):403–7.
- Kim Y, Capel B. Balancing the bipotential gonad between alternative organ fates: a new perspective on an old problem. *Dev Dynam.* 2006;235(9):2292–300.
- Albrecht KH, Eicher EM. Evidence that SRY is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol.* 2001;240(1):92–107.
- Ungewitter EK, Yao HC. How to make a gonad: cellular mechanisms governing formation of the testes and ovaries. *Sex Dev.* 2001;3(7(1-3)):7–20.

11. Kashimada K, Koopman P. SRY: the master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010;137(23):3921–30.
12. Harikae K, Miura K, Kanai Y. Early gonadogenesis in mammals: significance of long and narrow gonadal structure. *Dev Dynam*. 2013;242(4):330–8.
13. Sarraj MA, Drummond AE. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction*. 2012;143(2):151–63.
14. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colon E, Svechnikova I, et al. Origin development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr*. 2010;73(2):93–101.
15. Beverdam A, Koopman P. Expression profiling of purified mouse gonadal somatic cells during the critical time window of sex determination reveals novel candidate genes for human sexual dysgenesis syndromes. *Hum Mol Genet*. 2006;15(3):417–31.
16. Jameson SA, Natarajan A, Cool J, DeFalco T, Maatouk DM, Mork L, et al. Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genet*. 2012;8(3):e1002575.
17. Munger SC, Natarajan A, Looger LL, Ohler U, Capel B. Fine time course expression analysis identifies cascades of activation and repression and maps a putative regulator of mammalian sex determination. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003630.
18. Hughes IA, Houk Ch, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol*. 2006;2(3):148–62.
19. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol*. 2009;70(2):173–87.
20. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Perez-Palacios G, Erickson RP. Clinical traits and molecular finding in 46,XX males. *Clin Genet*. 1995;48(1):29–34.
21. Kousta E, Papatheanasiou A, Skordis N. Sex determination and disorders of sex development according to the revised nomenclature and classification in 46,XX individuals. *Hormones (Athens)*. 2010;9(3):218–31.
22. Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling of biological regulatory networks: a methodology tutorial. *Methods*. 2013;62(1):3–12.
23. Karlebach G, Shamir R. Modelling, analysis of gene regulatory networks. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2008;9(10):770–80.
24. Sanchez-Corrales YE, Alvarez-Buylla ER, Mendoza L. The *Arabidopsis thaliana* flower organ specification gene regulatory network determines a robust differentiation process. *J Theor Biol*. 2010;264(3):971–83.
25. Herrmann F, Groß A, Zhou D, Kestler HA, Kühl M. A Boolean model of the cardiac gene regulatory network determining first and second heart field identity. *PLoS ONE*. 2012;7(10):e46798.
26. Albert R, Othmer HG. The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *J Theor Biol*. 2003;223(1):1–18.
27. Fleming A, Vilain E. The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet*. 2005;67(1):15–25.
28. Ono M, Harley VR. Disorders of sex development: new genes new concepts. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(2):79–91.
29. McConnell MJ, Cunliffe HE, Chua LJ, Ward TA, Eccles MR. Differential regulation of the human Wilms tumour suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene*. 1997;14(22):2689–700.
30. Kobayashi A, Shawlot W, Kania A, Behringer RR. Requirement of Lim1 for female reproductive tract development. *Development*. 2004;131(3):539–49.
31. Wilhelm D, Englert Ch. The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of SF1. *Genes Dev*. 2002;16(14):1839–51.
32. Manuylov NL, Smagulova FO, Leach L, Tevosian SG. Ovarian development in mice requires the GATA4-FOG2 transcription complex. *Development*. 2008;135(22):3731–43.
33. Müssel Ch, Hopfensitz M, Kestler HA. BoolNet an R package for generation reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics*. 2010;26(10):1378–80.
34. Tomaselli S, Megiorni F, Lin L, Mazzilli MC, Gerrelli D, Majore S, et al. Human RSPO1/R-spondin1 is expressed during early ovary development and augments β -catenin signaling. *PLoS One*. 2011;6(1):e16366.
35. Barbaro M, Oscarson M, Schoumans J, Staaf J, Ivarsson SA, Wedell A. Isolated 46,XY gonadal dysgenesis in two sisters caused by a Xp21.2 interstitial duplication containing the DAX1 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(8):3305–13.
36. Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K, Weiss J, Jameson JL. Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development*. 2003;130(5):1029–36.
37. Ludbrook LM, Harley VR. Sex determination: a window of DAX1 activity. *Trends Endocrin Met*. 2004;15(3):116–21.
38. Hersmus R, Kalfa N, de Leeuw BHCGM, Stoop H, Oosterhuis JW, de Krijger R, et al. FOXL2 and SOX9 as parameters of female and male gonadal differentiation in patients with various forms of disorders of sex development (DSD). *J Pathol*. 2008;215(1):31–8.
39. Maatouk DM, DiNapoli L, Alvers A, Parker KL, Taketo MM, Capel B. Stabilization of β -catenin in XY gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet*. 2008;17(19):2949–55.
40. Alves C, Braid Z, Coeli FB, Mello MP. 46 XX Male-testicular disorder of sexual differentiation (DSD): hormonal molecular and cytogenetic studies. *Arq Bras Endocrinol*. 2010;54(8):685–9.
41. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr rev*. 2003;24(4):466–87.
42. Hawkins JR, Taylor A, Goodfellow PN, Migeon CJ, Smith KD, Berkovitz GD. Evidence for increased prevalence of SRY mutations in XY females with complete rather than partial gonadal dysgenesis. *Am J Hum Genet*. 1992;51(5):979.
43. Yueh-Chiang Hu, Okumura LM, Page DC. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genet*. 2013;9(7):e1003629.
44. Miyamoto Y, Taniguchi H, Hamel F, Silversides DW, Viger RS. A GATA4/WT1 cooperation regulates transcription of genes required for mammalian sex determination and differentiation. *BMC Mol Biol*. 2008;9(1):44.

45. Tremblay JJ, Viger RS. A mutated form of Steroidogenic factor 1 (SF-1 G35E that causes sex reversal in humans fails to synergize with transcription factor GATA-4. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42637–42.
46. Lourenço D, Brauner R, Ryczyńska M, Nihou-Fékété C, McElreavey K, Bashamboo A. Loss-of-function mutation in GATA4 causes anomalies of human testicular development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(4):1597–602.
47. Köhler B, Biebermann H, Friedsam V, Gellermann J, Maier RF, Pohl M, et al. Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46, XY disorders of sex development. *Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):E1131–6.
48. Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, et al. The Wilms' tumor suppressor gene *WT1* product regulates DAX-1 gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cellular Biol*. 1999;19(3):2289–99.
49. Huang C-C, Orvis GD, Kwan KM, Behringer RR. Lhx1 is required in Müllerian duct epithelium for uterine development. *Dev Biol*. 2014;389(2):124–36.
50. Fraizer GC, Shimamura R, Zhang X, Saunders GF. PAX8 regulates human *WT1* transcription through a novel DNA binding site. *J Biol Chem*. 1997;272(49):30678–87.
51. Cadigan KM, Waterman ML. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harbor Perspectives Biol*. 2012;4(11):a007906.
52. Tevosian SG, Manuylov NL. To β or not to β : Canonical β -catenin signaling pathway and ovarian development. *Dev Dynam*. 2008;237(12):3672–80.
53. Mazen I, Hamid A, El-Gammal M, Aref A, Amr K. AMH gene mutations in two Egyptian families with persistent Müllerian duct syndrome. *Sex Dev*. 2011;5(6):277–80.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

