

Control genético del desarrollo gonadal
temprano de *Talpa occidentalis*



Francisco David Carmona López

Diciembre 2006



Departamento de
Genética



Facultad de
Ciencias



Universidad de
Granada

Control genético del desarrollo gonadal temprano de *Talpa occidentalis*

Dirigida por los doctores:

Memoria de Tesis Doctoral presentada
por el licenciado en Ciencias Biológicas
Francisco David Carmona López para
optar al grado de «Doctor por la Uni-
versidad de Granada».

Rafael Jiménez Medina

Federico Zurita Martínez

Diciembre 2006

El presente trabajo se ha desarrollado en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, mediante la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Docente e Investigador (conv. 2002) y ayudas al grupo PAI CVI-109, así como por la Dirección General de Investigación, a través del proyecto CGL2004-00863/BOS.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en el congreso internacional «15th International Society of Developmental Biologists Congress» y en el Congreso de la Sociedad Española de Genética «SEG 2005». Además, otros han sido aceptados para su publicación en el primer número de la revista científica «Sexual Development».

Agradecimientos

Esta memoria es el resultado de muchos años de esfuerzo y dedicación, pero también de ilusiones y alegrías. No obstante, este trabajo nunca hubiese podido llevarse a cabo sin la ayuda, el apoyo y la colaboración de una larga lista de personas que han contribuido de una u otra manera a su realización. Por ello, quisiera mostrar mi más sincera gratitud:

A mis directores de Tesis, los doctores Rafael Jiménez y Federico Zurita, por su labor incansable en mi formación como investigador y como persona, por su entusiasmo constante y por su plena dedicación; pero, sobre todo, por su amistad.

Al doctor Miguel Burgos y al profesor Ángel Martín por su infinita paciencia a lo largo de mi pequeña pero fructífera incursión en el mundo de Linux.

A Belén Megías, por ser un punto de referencia muy importante para mí, tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis compañeros Darío («Vita»), Fany, Ezequiel («Ezze»), Rajesh y David, por su continua y desinteresada ayuda en el laboratorio y por haber estado siempre ahí cuando he necesitado consejo y opinión.

A Paco Barrionuevo, Juande y Miguel, por todo lo que aprendí de ellos durante mi etapa de alumno interno y por las tardes de topos.

A las doctoras Esther Viseras y Josefa Cabrero, por despertar en mí una profunda pasión por la Genética con su admirable capacidad para la docencia;

Al doctor Juan Pedro Martínez y a los demás miembros del Departamento de Genética de la Universidad de Granada, por su calurosa acogida y el afecto que me han mostrado en todo momento.

A la Universidad de Granada, la Junta de Andalucía y la DGI por proporcionarme los medios técnicos y económicos necesarios para la elaboración del presente estudio.

Al doctor Antonio Osuna y a los miembros de su grupo de investigación, sobre todo a Jennifer, Luismi, Gloria y Rafa Díaz, por su colaboración en la elaboración del anticuerpo anti-WNT4 y por su inestimable ayuda en las técnicas inmunológicas.

A los doctores José Luis Barbero, Alicia G. Arroyo, Silvana Guioli, Paul Burgoyne, Toshiaki Noce, Fumiko Mitani, Ken Morohashi y Peter Goodfellow, por facilitarme gentilmente gran parte de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

A los doctores Robin Lovell-Badge (Developmental Genetics and Stem Cells Division, NIMR, Londres, UK) y Blanche Capel (Department of Cell Biology, Duke University School of Medicine, Durham, EEUU), así como a los miembros de sus respectivos grupos de investigación, por haberme permitido visitar sus laboratorios y por el trato tan exquisito que he recibido por parte de ellos.

A Isabel Seiquer, Cristina, Rosa García, Ignacio Fernández, Marta Rivera, Abdel, Mari Carmen, Luis del Boz, Rosa Nieto, Luis Lara, Paco, Juan Vera, Ignacio Martín, David Yáñez, Encarna, Victor, Gonzalo y Rafa, por hacer que recuerde con añoranza mi paso por el CSIC y por su continuo apoyo.

A mis amigos Quiles («Kil»), Salinas («Sadi»), Marcos («Park»), Jose («el Ozher del Universo»), Mercedes («Per»), Gloria, Marta, Carolina, Sonia, John, Elena, Esther, Laura, María, Sonia y Juanito, por tantas cosas... que no podría resumirlas unas pocas líneas.

A mi familia, en especial a mis abuelos Paco y Mercedes, a mis primos Jorge («Duckhov»), Jesús, Francisco («Racis») y Esther, por todo lo que han significado a lo largo de mi vida y porque sé que siempre podré contar con ellos.

A mis cuñaillos, Ivan (Ivanovich) y Norber, por las emocionantes noches de Pro y por las risas interminables que hemos compartido.

A mi padre y mi abuela María, por haber confiado en mí hasta el último momento.

A mi madre y mis hermanas porque lo son todo para mí y porque sin ellas nada de esto tendría sentido.

A Eva, por estar siempre a mi lado apoyándome y comprendiéndome, por sus palabras de ánimo en las situaciones difíciles y por cada uno de los momentos inolvidables que me ha regalado.

Por último, también me gustaría mostrar mi admiración y gratitud a tres personas que, sin haberlos conocido, han sido muy importantes en mi vida: Philip K. Dick, por «¿Sueñan los androides con ovejas eléctricas?»; Michael Ende, por «Momo»; y, sobre todo, Antoine de Saint-Exupéry, por «El Principito».

A todos ellos y a los que, aunque no haya nombrado, saben que les llevo en mi corazón, un abrazo enorme con todo mi cariño.

A la memoria de mi padre.
A mi madre y mis hermanas.
A Eva.

Índice general

1. Introducción y objetivos	1
2. Antecedentes	3
2.1. Determinismo del sexo	4
2.1.1. Introducción histórica	4
2.1.2. Mecanismos de determinación sexual	6
Mecanismos genéticos	6
Mecanismos ambientales	7
2.2. Desarrollo gonadal en mamíferos	8
2.2.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada	8
2.2.2. Diferenciación testicular	10
2.2.3. Diferenciación ovárica	11
2.2.4. Papel de las células germinales en la gonadogénesis . .	12
2.3. Control genético del sexo	14
2.3.1. Genes que actúan antes de la determinación sexual . .	15
SF1	15
WT1	18
GATA4	21
FOG2	23
Otros genes	25
2.3.2. Genes implicados en el determinismo del sexo y la diferenciación gonadal	26
SRY	26
SOX9	28
DAX1	32
WNT4	36

FGF9	38
PDGFR α	39
DMRT1	40
AMH	43
Otros genes	45
2.4. Interacciones génicas en el desarrollo gonadal	48
2.5. Reversión sexual en mamíferos	52
2.5.1. Factores relacionados con reversión sexual y disgenesia gonadal	52
2.5.2. Particularidades del género <i>Talpa</i>	54
Biología del topo	54
Hermafroditismo verdadero en <i>T. occidentalis</i>	55
Características de la porción testicular del ovoteste	56
3. Material y métodos	59
3.1. Material analizado	60
3.2. Métodos	61
3.2.1. Obtención del material	61
Cobertura legal de los métodos utilizados	61
Captura de topes adultos	61
Obtención de embriones y fetos	62
Obtención de crías	63
3.2.2. Determinación del estadio de desarrollo	63
3.2.3. Métodos citológicos e histológicos	65
Determinación del sexo de los embriones	65
Preparaciones de material incluido en parafina	65
Fijación.	66
Deshidratación e inclusión.	66
Confección de los bloques.	66
Corte de los bloques.	66
Extensión y adhesión de los cortes.	66
Tinción y montaje.	67
Preparaciones de material incluido en resina	67
3.2.4. Inmunofluorescencia indirecta	68
3.2.5. Otros métodos inmunológicos	69
Producción de anticuerpos frente a DAX1	69

Producción anticuerpos frente a WNT4	71
Obtención de sueros inmunizados.	71
Test de ELISA para detección de anticuerpos	72
3.2.6. Métodos de análisis genético molecular	73
Extracción de ADN genómico	73
Extracción de ARNm	74
Diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR	75
Amplificación por PCR	77
RT-PCR	77
Purificación de productos de PCR	78
Clonación de fragmentos génicos	78
Preparación del vector.	78
Ligado del ADN con el vector.	79
Preparación de bacterias competentes.	79
Transformación de bacterias competentes.	80
Análisis de los transformantes positivos.	80
Minipreparaciones de ADN plasmídico	80
Secuenciación con dideoxinucleótidos marcados	80
3.3. Preparación de soluciones y medios	82
4. Resultados	89
4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4	90
4.1.1. Obtención de anticuerpos a partir de la secuencia de un fragmento del gen <i>DAX1</i> de <i>Talpa</i>	90
4.1.2. Clonación de un fragmento del gen <i>WNT4</i> de <i>Talpa</i> y obtención de anticuerpos a partir de su secuencia.	94
4.1.3. Análisis de la especificidad de los anticuerpos obtenidos	98
4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual	99
4.2.1. SF1	99
4.2.2. SOX9	102
4.2.3. DAX1	104
4.2.4. WNT4	106
4.2.5. AMH	110
4.2.6. DMRT1	112
4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano	114
4.3.1. MT1-MMP	114

4.3.2.	PDGFR α	118
4.4.	Caracterización molecular de las células germinales	122
4.4.1.	Distribución de las PGCs en el desarrollo gonadal temprano	122
4.4.2.	Localización de las células germinales XX	124
4.4.3.	Localización de las células germinales XY	124
4.4.4.	Comienzo de la meiosis femenina	128
4.4.5.	Expresión de <i>DMRT1</i> en células germinales XX	130
4.5.	Caracterización molecular de las células de Leydig	132
5.	Discusión	135
5.1.	Especificidad de los anticuerpos utilizados	136
5.2.	Control genético del desarrollo testicular en machos	137
5.3.	Caracterización y desarrollo del tejido ovárico	144
5.3.1.	Control genético del desarrollo de la corteza gonadal en hembras	144
5.3.2.	Distribución de las PGCs en la gónada XX	147
5.3.3.	Comienzo de la meiosis femenina	148
5.4.	Desarrollo del tejido testicular XX	149
5.4.1.	Ausencia de células germinales durante el desarrollo testicular del ovoteste	149
5.4.2.	Expresión génica durante el desarrollo testicular en hembras	150
5.4.3.	Migración celular en la gónada XX	152
5.4.4.	Caracterización y origen de la población de células de Leydig XX	154
5.5.	Formación del conducto de Müller	156
5.6.	Origen de la reversión sexual de <i>Talpa</i>	157
5.7.	El patrón de desarrollo gonadal en mamíferos	160
6.	Conclusiones	163
	Bibliografía	167

Índice de figuras

2.1. Homúnculo de Hartsoeker.	5
2.2. Sistema genitourinario de ratón	9
2.3. Esquema del desarrollo gonadal temprano de ratón	12
2.4. Patrones de expresión génica y eventos más relevantes durante el desarrollo gonadal temprano de ratón.	48
2.5. Esquema de la determinación y diferenciación sexual	49
2.6. Hembra adulta y crías de <i>T. occidentalis</i>	55
2.7. Corte histológico longitudinal de un ovoteste de <i>T. occidentalis</i>	57
3.1. Trampa de topos.	62
3.2. Secuencia nucleotídica del fragmento de DAX1 utilizado.	69
3.3. Esquema del la proteína <i>DAX1</i>	71
3.4. Esquema del gen <i>WNT4</i>	76
3.5. Secuencias a las que se unen los oligonucleótidos 524S y 779AS en el ADNc del gen <i>WNT4</i> humano	76
4.1. Comparación de secuencias del gen <i>DAX1</i> de <i>T. occidentalis</i> y <i>H. sapiens</i>	91
4.2. Comparación de secuencias del gen <i>DAX1</i> de <i>T. occidentalis</i> y <i>M. musculus</i>	92
4.3. Comparación de secuencias del péptido de DAX1 de <i>T. occidentalis</i> y <i>H. sapiens</i>	93
4.4. Comparación de secuencias del péptido de DAX1 de <i>T. occidentalis</i> y <i>M. musculus</i>	93
4.5. Electroforesis de fragmentos amplificados de <i>DAX1</i> y <i>WNT4</i> de <i>T. occidentalis</i>	94
4.6. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de <i>WNT4</i> de <i>T. occidentalis</i> y la del fragmento correspondiente de <i>H. sapiens</i>	95

4.7. Comparación de la secuencia del fragmento clonado de <i>WNT4</i> de <i>T. occidentalis</i> y la del fragmento correspondiente de <i>M. musculus</i>	96
4.8. Comparación de la secuencia del péptido codificado por el fragmento de <i>WNT4</i> de <i>T. occidentalis</i> y la del péptido correspondiente de <i>H. sapiens</i>	97
4.9. Comparación de la secuencia del péptido codificado por el fragmento de <i>WNT4</i> de <i>T. occidentalis</i> y la del péptido correspondiente de <i>M. musculus</i>	97
4.10. Detección de Dax1 y Wnt4 en gónadas embrionarias de ratón de 12.5 dpc.	98
4.11. Detección de SF1 en gónadas embrionarias de <i>T. occidentalis</i>	100
4.12. Detección de SOX9 en gónadas embrionarias de <i>T. occidentalis</i>	102
4.13. Detección de DAX1 en gónadas embrionarias de <i>T. occidentalis</i>	104
4.14. Detección de WNT4 en gónadas embrionarias masculinas de <i>T. occidentalis</i>	106
4.15. Detección de WNT4 en gónadas embrionarias femeninas de <i>T. occidentalis</i>	108
4.16. Detección de AMH en gónadas embrionarias masculinas de <i>T. occidentalis</i>	110
4.17. Detección de DMRT1 en gónadas embrionarias de <i>T. occidentalis</i>	112
4.18. Detección de MT1–MMP en gónadas embrionarias masculinas de <i>T. occidentalis</i>	114
4.19. Detección de MT1–MMP en gónadas embrionarias femeninas de <i>T. occidentalis</i>	116
4.20. Detección de PDGFR α en gónadas embrionarias de <i>T. occidentalis</i>	118
4.21. Distribución de las PGCs durante el desarrollo gonadal temprano de <i>T. occidentalis</i>	122
4.22. Detección de MVH en gónadas femeninas de <i>T. occidentalis</i>	125
4.23. Caracterización de células germinales pre- y post-meióticas en individuos XY de <i>T. occidentalis</i>	126
4.24. Detección de OCT4, γ H2AX y SYCP3 en gónadas femeninas de <i>T. occidentalis</i>	128
4.25. Detección de DMRT1 en células germinales pre-meióticas femeninas de <i>T. occidentalis</i>	130
4.26. Detección de SF1 y P450scc en gónadas adultas de <i>T. occidentalis</i>	133

5.1. Progreso del desarrollo gonadal en distintas especies de mamíferos.	138
--	-----

Índice de cuadros

2.1. Eventos en el desarrollo del tejido testicular de <i>T. occidentalis</i>	58
3.1. Material analizado.	60
3.2. Estadios de desarrollo de <i>T. occidentalis</i>	64
3.3. Anticuerpos secundarios utilizados.	69
3.4. Anticuerpos primarios utilizados.	70
4.1. Patrón de expresión de los genes implicados en la determinación sexual durante las etapas tempranas de la gonadogénesis masculina.	120
4.2. Patrón de expresión de los genes implicados en la determinación sexual durante las etapas tempranas de la gonadogénesis femenina.	120
4.3. Patrón de expresión de los genes implicados en la migración de células mesonéfricas al interior de la gónada masculina.	121
4.4. Patrón de expresión de los genes implicados en la migración de células mesonéfricas al interior de la gónada femenina.	121

Abreviaturas

- AHC** X-linked adrenal hypoplasia congenita (hipoplasia adrenal congénita ligada al X, OMIM#300200).
- Ad4BP** Adrenal 4-binding protein (proteína 4 de unión adrenal).
- ADNc** Ácido desoxirribonucleico complementario.
- AMH** Antimullerian hormone (hormona antimulleriana).
- AMPc** Adenosinmonofosfato cíclico.
- AMV-RT** Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar).
- ARNm** Ácido ribonucleico mensajero.
- ARX** Aristales-related homeobox X-linked gene (gen ligado al cromosoma X relacionado con el gen *Aristales* de *Drosophila*).
- ATRX** Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene (gen ligado al cromosoma X del síndrome talasemia- α /retraso mental, OMIM#301040).
- BKM** Banded krait minor satellite DNA (ADN satélite menor de «Banded krait»).
- BMP2** Bone morphogenetic gene 2 (gen morfogenético óseo 2).
- BPES** Blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome (síndrome de la blefarofimosis congénita, OMIM#110100).
- BSA** Bovine serum albumine (seroalbúmina bovina).
- CRL** Crown-rump length (longitud corona-grupa).
- CD** Campomelic displasia (displasia campomélica, OMIM#114290).
- CMDP1** Campomelic displasia gene 1 (locus 1 de la displasia campomélica).
- COL2A1** Collagen gene 2A1 (gen de colágeno 2A1).
- CRM1** Chromosomal region maintenance 1 protein (proteína 1 de mantenimiento de la región cromosómica).
- CtBP-2** C-terminal binding protein-2 (proteína de unión al extremo carboxilo 2).

CYP26B1 Cytochrome P450, P450RAI-2.

DAM DSS–AHC critical interval MAGE (intervalo MAGE crítico en DSS–AHC).

DAX1 DSS–ACH critical region on the X chromosome, gene 1 (gen 1 de la región crítica del cromosoma X en DSS–ACH).

DBD DNA binding domain (dominio de unión al ADN).

DHH Desert hedgehog gene (gen del erizo del desierto).

DM DSX–MAB3 (dominio DSX–MAB3).

DMRT DSX– and MAB3–related transcription factors family (familia de factores de transcripción relacionados con las proteínas DSX y MAB3).

DMRT1 DSX– and MAB3–related transcription factors family, gene 1 (gen 1 de la familia DMRT).

DSS Dosage–sensitive sex–reversal (reversión sexual sensible a dosis, OMIM#300018).

DSX Doublesex protein (proteína de sexo doble).

dNTPs Ribonucleótidos trifosfato.

ddNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DO Densidad óptica.

dpc Días post–coito.

dpo Días post–ovulación.

dpp Días post–parto.

DTT 1,4-ditio–DL–treitol.

DDS Denys–Drash syndrome (síndrome de Denys–Drash, OMIM#194080).

ELISA Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima).

EMBL European Molecular Biology Laboratory (Laboratorio Europeo de Biología Molecular).

EMBOSS European Molecular Biology Open Software Suite (conjunto de programas libres del EMBL).

EMX2 Empty spiracles homolog 2 (gen 2 homólogo de *Ems* de *Drosophila*).

ESD Environmental sex determination (determinación sexual ambiental).

FGF Fibroblast growth factor family (familia de los factores de crecimiento de fibroblastos).

FGF9 Fibroblast growth factor, gene 9 (gen 9 del factor de crecimiento de fibroblastos).

FGFR Fibroblast growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos).

FOG Friend of GATA protein (proteína amiga de los factores GATA).

FOG2 Friend of GATA protein-2 (proteína 2 amiga de los factores GATA).

FOXL2 Forkhead box gene L2 (gen L2 con una caja homóloga a la del gen *Forkhead* de *Drosophila*).

FS Frasier syndrome (síndrome de Frasier, OMIM#136680).

FSH Follicle-stimulating hormone (hormona estimulante del folículo).

FST Follistatin gene (gen de la folistatina).

FTZ-F1 Fushi-Tarazu factor 1 (factor 1 de Fushi-Tarazu).

GSD Genetic sex determination (determinación sexual genética).

γH2AX Phosphorylated H2A histone family, member X (forma fosforilada de la histona X de la familia H2A).

HAp300 Histone acetyltransferase p300 (histona acetiltransferasa p300).

HDAC3 Histone deacetylase-3 (histona desacetilasa 3).

HMG High-mobility group (grupo de alta movilidad).

HP1 Heterochromatin protein 1 (proteína de la heterocromatina 1).

H-Y Histocompatibility-Y antigen (antígeno de histocompatibilidad del Y).

IGF1R Insulin-like growth factor receptor 1 (receptor 1 del factor de crecimiento semejante a la insulina).

INSL3 Insulin-like factor 3 (factor 3 semejante a insulina).

IR Insulin receptor (receptor de la insulina).

IRR Insulin receptor-related receptor (receptor relacionado con el receptor de la insulina).

IPTG Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.

KAP1 KRAB-associating protein 1 (proteína 1 asociada a KRAB).

KRAB Kruppel associated box (caja asociada a Kruppel).

LB Luria-Bertoni.

LBD Ligand-binding domain (dominio de unión al ligando).

LH Luteinizing hormone (hormona luteinizante).

LHX9 LIM homeobox protein 9 (proteína 9 con caja HMG y dominios LIM).

MAB3 Male abnormal gene 3 (gen 3 masculino de *C. elegans*).

MAGE Melanoma antigen gene family (familia génica de los antígenos del melanoma).

MIS Mullerian inhibiting substance (sustancia inhibidora mulleriana).

MMTV Murine mammary tumour virus (virus del tumor mamario de ratón).

MRO Maestro gene (gen maestro).

MT1–MMP Membrane-type-1 matrix metalloproteinase (metaloproteinasa de matriz extracelular localizada en la membrana de tipo 1).

MVH Mouse VASA homologue protein (proteína de ratón homóloga de la proteína VASA de *Drosophila*).

NCoR Nuclear co-repressor (correpresor nuclear).

NES Nuclear export signal (señal de exportación nuclear).

NLS Nuclear localization signal (señal de localización nuclear).

NR0B1 Nuclear receptor subfamily type 0, group B, member 1 gene (receptor nuclear 1 del grupo B de la subfamilia 0).

NR5A1 Nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 1 gene (receptor nuclear 1 del grupo A de la subfamilia 5).

OCT4 Octamer motif ATGCAAAT binding protein 4 (proteína 4 de unión al octámero ATGCAAAT).

OMIM Online mendelian inheritance in man (enfermedades con herencia mendeliana en humanos).

P450 scc Cytochrome P450 side chain cleavage (citocromo P450 de desdoblamiento de la cadena lateral).

PBS Phosphate buffered saline (tampón fosfato).

PGCs Primordial germ cells (células germinales primordiales).

PCR Polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PDGF Platelet-derived growth factor (factor de crecimiento derivado de plaquetas).

PDGFR Platelet-derived growth factor receptor (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas).

PGD₂ Prostaglandina D₂.

PGD₂s Sintasa de la Prostaglandina D₂.

PN1 Protease nexin gene 1 (gen 1 de la proteasa nexina).

POD1 Podocyte protein 1 (proteína 1 del podocito).

RA Retinoic acid (ácido retinoico).

RSPO1 R-spondin 1 (espondina R1).

RT-PCR Reverse transcriptase polymerase chain reaction (transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa).

SF1 Steroidogenic factor 1 (factor esteroideogénico 1).

αSMA Alpha smooth muscle actin (actina α de músculo liso).

SOX SRY-related HMG box (familia de genes relacionados con la caja HMG de SRY).

SOX9 SRY-related HMG box, gene 9 (gen 9 relacionado con la caja HMG de SRY).

SRA1 Sex reversal autosomal gene 1 (locus autosómico de reversión sexual).

STRA8 Stimulated by retinoic acid gene 8 (gen estimulado por ácido retinoico).

SYCP3 Synaptonemal complex protein 3 (proteína 3 del complejo sinapteinémico).

Taq *Thermus aquaticus*.

TD9 Testis determining gene 9 (locus 9 determinante de testículo).

Tda1 Testis-determining autosomal gene 1 (locus autosómico 1 determinante de testículo).

TDF Testis determining factor (factor determinante de testículo).

Tdy Testis determining gene on the Y (gen del Y determinante de testículo).

TESPA 3-aminopropil-trietoxi-xilano.

TSD Temperature sex determination (determinación sexual por temperatura).

VN1 Vanin gene 1 (gen 1 de vanina).

WAGR Wilm's tumour-aniridia-genitourinary tract abnormalities-mental retardation (tumor de Wilms-aniridia-anomalías del tracto genitourinario-retraso mental, OMIM#194072).

WNT Wingless-related MMTV integration site family (familia génica relacionada con el gen *Wingless* con un sitio de integración para el virus MMTV).

WNT4 Wingless-related MMTV integration site family, gene 4 (gen 4 de la familia WNT).

WT Wilms' tumour (tumor de Wilms).

WT1 Wilms' tumour suppressor gene 1 (gen 1 supresor del tumor de Wilms).

X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido.

Y^{POS} *Mus musculus poschiavinus* Y chromosome (cromosoma Y de la cepa *M. musculus poschiavinus*).

ZFY Zinc finger Y gene (gen dedo de zinc del Y).

ZFPM Zinc finger protein multitype (proteína múltiple de dedos de zinc).

Abstract

Introduction.

Mammalian sex determination and differentiation has raised high scientific interest during the last three decades, as the study of the genetic systems leading to sexual development will permit to solve problems related to sterility and genital malformations in both humans and domestic animals. In mammals, sex differentiation takes place in two steps. The first one leads to the differentiation as testes or ovaries of the undifferentiated gonadal primordium, which is present in both males (XY) and females (XX). This process depends on the existence or not of the *SRY* gene (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1991; Sinclair et al., 1990), located on the Y chromosome, so that its activation in males determines the formation of testes at the time of sex differentiation. Its absence in females permits that some time later in development, ovarian differentiation begins. *SRY* produces a transcription factor (SRY) containing a DNA-binding domain of the HMG type, which is evolutionarily conserved (Gubbay et al., 1990; Koopman et al., 1991; Sinclair et al., 1990). In the second step, once the gonads are differentiated, either as testes or as ovaries, their hormonal production directs the differentiation of the urogenital tract of the embryo, thus resulting in the formation of the male and females secondary sex features (Jost, 1947).

SRY expresses in a particular cell type of the somatic cell lineage of the gonadal primordium which, as a consequence, become pre-Sertoli cells (Hacker et al., 1995). *SRY* expression in these cells triggers a gene expression/repression cascade where the total number of components remain unknown, although several of them have been identified, including SOX9, SF1, DAX1, PDGFR α , AMH and DMRT1 (Ross and Capel, 2005).

In the mouse, the genital ridge appears as a thickening of the ventro-lateral side of the mesonephros at 9.5 days post coitum (dpc). Although *Sry* begins to express at 10.5 dpc, the first sign of differentiation in the XY gonad, the formation of the testicular cords, is not observed until 12.5 dpc. Between these two events, the expression of SOX9 takes place in the pre-Sertoli cells at 11.5 dpc, which leads to the differentiation of these cells as Sertoli cells

with the expression of the antimüllerian hormone gene (AMH), and the subsequent regression of the Müllerian ducts in males (Brennan and Capel, 2004). Simultaneously, migration of mesonephric cells into the gonad occurs, induced by PDGF factors, so that the gonad is colonized by mesenchymal cell precursors (Brennan et al., 2003; Ricci et al., 2004). It is currently assumed that Sertoli cells trigger gonadal development (Burgoyne, 1992), favouring the differentiation of these precursors as Leydig, peritubular–myoid and endothelial cells. The later are responsible of the formation of a well-developed vascular system, whereas Leydig cells represent the steroidogenic cell line of the testis. These cells produce testosterone, the male hormone responsible of the development of the Wolffian duct and the subsequent masculinisation of the body of XY embryos (Habert et al., 2001).

During ovarian differentiation, the absence of *SRY* permits other genes as *WNT4* and *FST* to remain active. These genes are involved in both the inhibition of the testicular differentiation events described above and the preservation of pre-meiotic XX germ cells (Jeays-Ward et al., 2003; Jordan et al., 2001; Yao et al., 2004). Once meiosis initiates, oocytes seem to assume the role of inhibitors of the male pathway in the female gonad. *WNT4* is also needed to inhibit Leydig cell differentiation (Jeays-Ward et al., 2003; Jordan et al., 2001).

In 1993, Jiménez et al. discovered a case unique of XX true hermaphroditism affecting all females of the insectivorous mole species *Talpa occidentalis*. These females are fertile but instead of normal ovaries they have ovotestes composed of a portion of normal ovarian tissue and a portion of dysgenic testicular tissue (Jiménez et al., 1988; Jiménez et al., 1993). The absence of *SRY* in these females evidences that this sex reversal is due to a mutation in another gene of the sex differentiation cascade. The Sertoli-like cells of these ovotestes show foetal features: they do not form true, elongated testicular cords but spherules, and they do not establish specialized inter-Sertolian junctions. In addition, these cells differentiate very late in the gonad. The same phenomenon is also present in three further species of the genus *Talpa* (*T. europaea*, *T. romana* and *T. stankovici*; Sánchez et al., 1996b), suggesting that the trait was conserved in the rest of species of this genus. Furthermore, a synaptonemal complex study evidenced that translocation of Y chromosome fragments to the X chromosome during male meiosis is probably not involved in the formation of ovotestes in female moles (Jiménez et al., 1990b,c).

Material and methods.

This work required to obtain gonads from embryos, fetuses and infants of the mole species *T. occidentalis*, which were needed to perform gene expression studies through early gonadal development. This material was obtained, in turn, by catching pregnant and suckling wild female moles. Each

one of the mole embryos, fetuses and infants captured were dissected and their gonads extracted and fixed in paraformaldehyde solution in order to be used in immunofluorescence techniques after being embedded in paraffin and sectioned. Those embryos whose gonads had not differentiated enough to permit a clear individual sex identification based on its morphological features, were sexed by performing sex chromatin preparations according to a method developed in our laboratory. Immunofluorescence techniques were applied on histological preparations made with the gonads mentioned above. After deparafination and washing with PBT, the preparations were exposed for several hours to the specific primary antibody and then to a secondary antibody labelled with a fluorochrome. Immunofluorescence preparations were observed and photographed in a fluorescence microscope. Most of the genes involved in mammalian sex determination and differentiation produce proteins for which commercial antibodies are available. However, as the commercial antibodies available for the human or mouse proteins DAX1 and WNT4 were not immunoreactive against the corresponding proteins from the mole, it was necessary to prepare new mole-specific antisera for these proteins. For this we used the sequence of a fragment of the mole *DAX1* gene which had been previously cloned in our laboratory by Barrionuevo (2001), and a new fragment of the mole *WNT4* gene was also cloned and sequenced. Using appropriate software permitting to identify potentially antigenic areas in the protein (Rice et al., 2000), mole-specific DAX1 and WNT4 peptides were synthesized and used to immunize rabbits.

Results and Discussion.

The undifferentiated gonadal primordium of mammals contains epithelial-type somatic cells which have the same ontogenic origin in both sexes. These cells give rise to Sertoli cells in males and to follicle cells in females (Swain and Lovell-Badge, 1999). It has been demonstrated that these cell precursors come, in turn, from the coelomic epithelium (Karl and Capel, 1998). It is in this cell type where the key event in sex determination takes place: the expression of the *SRY* gene. This causes that a gene activation/inactivation cascade is initiated in the XY gonad, where genes of the male pathway, including *SOX9*, *SF1*, *DMRT1*, and *AMH*, are up-regulated whereas those of the female pathway, including *WNT4* and *FST* are down-regulated. In the XX gonad, the absence of any active copy of *SRY* leads to the opposite situation (Ross and Capel, 2005).

In the XY gonad of *T. occidentalis*, epithelial-type somatic cells differentiate as in other mammalian species, except for the fact that they differentiate earlier, in s4 stage, at least two days before testis cord formation takes place. This is a very relevant feature as it shows that Sertoli cell differentiation and testicular cord formation are probably not two different results of the same cause, contrarily to the current opinion, based on observations made in the

mouse (Brennan and Capel, 2004). In the female mole, however, it is necessary to distinguish between the epithelial cells that remain in the cortex and those present in the medulla. The former cells show features similar to those of the pre-follicle cells in the ovaries of other mammalian species. Contrarily, the gene expression pattern of the cells located in the medullary region is quite peculiar. These cells may not be considered to be Sertoli cells, despite the fact that they are in a testicular environment, as they do not express typical Sertolian markers as *SOX9* and *AMH*. On the other hand, the fact that these cells express *WNT4* and down-regulate *DMRT1* (a gene of the male pathway) at the time of sex determination, suggests a pre-follicular nature for these cells, but the maintenance of *SF1* expression in s5b stage, is not expected in this cell type. Therefore it seems that these medullary cells maintain an undifferentiated status as far as the expression of *SF1* concerns. In addition, the fact that interstitial cells of the XX gonad produce the PDGFR α receptor and that cell migration takes place subsequently, suggests that these epithelial cells could express the *PDGF* ligand, a role for Sertoli cells in the testis. If this were shown to be true, a possibility which is being investigated currently in our laboratory, then it would be clear that epithelial cells in the medulla of the mole XX gonad never acquire a typical pre-follicle cell phenotype, showing some Sertolian features. This could be due to malfunctioning of a gene of the female pathway in these cells. Our data suggest that a failure in the inhibition of mesonephric cell migration occurs in *Talpa*. The resulting colonization of the XX gonad would lead to masculinisation, as observed in knock-out mice homozygous for the null allele of the *WNT4* gene (Yao et al., 2004).

Nevertheless, our data suggest the mole *WNT4* gene conserves its inhibitory role on Leydig cell differentiation, as these cells appear just when this gene is down-regulated in both sexes. The fact that this gene remains active in the female gonad of moles until after birth is evolutionarily relevant. As a consequence of this, Leydig cell differentiation, and the subsequent testosterone production, are delayed until postnatal stages of development, when the female reproductive tract is fully formed. Otherwise, testosterone would disturb female development, probably affecting fertility. Hence, the ability of *WNT4* for repressing the male steroidogenic cell lineage seems to be conserved in *Talpa*. Moreover, the expression of *WNT4* in the XX germ cells of female moles throughout the pre-meiotic stages of development (not shown), suggests that this gene is also necessary to preserve the viability of these cells in the mole, as has been suggested for the mouse (Yao et al., 2004).

Hence, only two out of the three functions proposed for the *WNT4* gene in mammalian sex determination, appear to have been conserved in moles. *WNT4* could exert these functions either through different functional domains or acting in several regulatory pathways, or even a combination of both possibilities. In the first case, the situation observed in moles could be due to a mutation in the putative domain of *WNT4* involved in the inhibition of

migration. In the second case, a gene under its control would be affected.

Previous morphological studies suggested that testicular tissue in XX moles develops in the absence of germ cells (Barrionuevo et al., 2004b; Jiménez et al., 1993). Here we provide additional evidences supporting this hypothesis, based on the analysis of pre-meiotic and meiotic germ cell molecular markers. In the mouse it is known that oocytes are able to inhibit migration of mesonephric cells to the gonad and the subsequent formation of testis cords, whereas pre-meiotic germ cells are not (Yao et al., 2003). This implies that XX gonads could follow a testis pathway during the pre-meiotic stages of development, but not once meiosis initiates, as ovarian differentiation is firmly canalized afterwards. Accordingly, the considerable delay of meiosis onset in female moles could permit that some typical events of testicular development take place in their gonads.

Many studies have related serum testosterone level with aggressiveness or territoriality, although a cause-effect relationship has not clearly been established (Wingfield, 2005). We are tempted to speculate that the presence of high levels of this hormone in the serum of female moles may have favoured its unusual territorial behaviour. These levels vary seasonally, being high during the non-breeding season (summer-autumn), and low during the breeding season (winter-spring; Zurita et al., 2003). This variation is consistent with the values expected if testosterone were assumed to be responsible for territoriality. Females should permit males to enter their territories for breeding in the winter (low testosterone levels), but not in the summer, when they simply have to defend their territorial resources (when levels are high). Female territoriality is quite uncommon among mammals, so that this is another peculiarity to add to the long list of unique features currently described in talpid moles.

This work also provides the first data suggesting that DAX1 and PDGFR α are needed for the formation of the Müllerian duct in mammals, and that SOX9 may be involved in its regression in males.

«*La reproducción sexual es... la obra maestra de la naturaleza.*»
Erasmus Darwin (1791).

1. Introducción y objetivos

Los procesos de determinación y diferenciación del sexo en mamíferos han adquirido un alto interés científico en los últimos tiempos. La comprensión de los mecanismos moleculares que regulan el desarrollo del carácter sexo podría ayudar a solucionar, entre otros aspectos, los problemas de esterilidad y desarrollo sexual en humanos.

En mamíferos, la diferenciación sexual es un proceso que ocurre en dos etapas. En la primera de ellas, los primordios gonadales, presentes en ambos sexos, se desarrollan como testículos u ovarios en función de la dotación cromosómica del individuo. El camino elegido dependerá de la presencia o ausencia del cromosoma Y en el embrión. En este cromosoma se localiza el gen *SRY*, el cual inicia en los machos la diferenciación testicular del primordio gonadal en el momento crucial de la determinación del sexo (Gubbay *y col.*, 1990; Koopman *y col.*, 1991; Sinclair *y col.*, 1990). La ausencia de *SRY* en las hembras permite que, poco tiempo después, comience el desarrollo ovárico. En la segunda etapa, la producción de hormonas por parte de las gónadas provocará el desarrollo de las características sexuales secundarias del individuo, dando lugar al fenotipo masculino o femenino en función de si éste presenta testículos o no (Jost, 1947).

El gen *SRY* se expresa en determinadas células somáticas del primordio gonadal que, como consecuencia de ello, se diferencian como células pre-Sertoli (Hacker *y col.*, 1995). Estas células son de naturaleza epitelial y, cuando adquieren el fenotipo Sertoli, se disponen alrededor de las células germinales formando los denominados *cordones testiculares*. Se ha aceptado que las células de Sertoli son las responsables de dirigir el resto del desarrollo testicular (Burgoyne, 1992), incluyendo la diferenciación del sistema de vascularización, la túnica albugínea y las células de la línea esteroidogénica del testículo, conocidas como células de Leydig, que serán las encargadas de la producción de testosterona.

Desde un punto de vista molecular, *SRY* pone en marcha una cascada de activación génica, de la que aún no se conocen todos sus miembros. Muchos de los estudios actuales en el campo de la Genética del Desarrollo se centran en tratar de identificar nuevos candidatos de este complejo puzzle, así como en la comprensión de las interacciones que existen entre los genes que ya se han descrito (Ross y Capel, 2005). Las alteraciones en estos genes

1. Introducción y objetivos

pueden desembocar en la desestabilización de los procesos en los que están implicados. Esta situación puede dar lugar a un amplio rango de anomalías en el desarrollo sexual del individuo, desde ligeras deficiencias en las gónadas hasta casos de reversión sexual completa, en los que el fenotipo del individuo es incoherente con su cariotipo (machos XX y hembras XY). Además, se considera que un individuo es hermafrodita cuando presenta ambos tejidos gonadales, testicular y ovárico, lo cual puede originarle defectos somáticos que le confieran características tanto masculinas como femeninas (Camerino *y col.*, 2006).

Los topos del género *Talpa* representan el único caso conocido en mamíferos euterios en el que todas las hembras de una misma especie son hermafroditas verdaderos (Jiménez *y col.*, 1988; Sanchez *y col.*, 1996b). La especie más estudiada en relación con esta característica es el topo ibérico (*Talpa occidentalis*). Las hembras de este grupo son fértiles pero, en lugar de ovarios, poseen ovotestes bilaterales formados por una pequeña porción de tejido ovárico normal y otra, generalmente de mayor tamaño, de tejido testicular estéril (Jiménez *y col.*, 1988). Ambas regiones aumentan y disminuyen su tamaño periódicamente durante cada año, que es el tiempo que dura su ciclo reproductivo (Jiménez *y col.*, 1990a, 1993). En la actualidad, se desconoce el origen de esta reversión sexual, pero se sabe que no se debe a la presencia del gen *SRY* en el genoma de las hembras de topo (Jiménez *y col.*, 1993).

Sobre la base de los datos anteriores, el presente proyecto de Tesis Doctoral surgió con la finalidad de profundizar en la investigación de los factores que intervienen en el desarrollo gonadal de *Talpa occidentalis*. De esta manera, se estudiaron una serie de genes que actualmente se saben implicados en la determinación del sexo y la diferenciación sexual de mamíferos, como *SOX9*, *DAX1*, *SF1*, *DMRT1*, *WNT4*, *PDGFR α* y *AMH* (Brennan y Capel, 2004), con objeto de asociar sus patrones de expresión con los procesos morfológicos que conducen a la formación de los ovotestes de las hembras de topo. El estudio del perfil espacio-temporal de la expresión de estos genes ha permitido obtener nuevos datos sobre el proceso de la gonadogénesis de los mamíferos en general y del desarrollo de los ovotestes en particular.

2. Antecedentes

Contenidos

2.1. Determinismo del sexo	4
2.1.1. Introducción histórica	4
2.1.2. Mecanismos de determinación sexual	6
Mecanismos genéticos	6
Mecanismos ambientales	7
2.2. Desarrollo gonadal en mamíferos	8
2.2.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada	8
2.2.2. Diferenciación testicular	10
2.2.3. Diferenciación ovárica	11
2.2.4. Papel de las células germinales en la gonadogénesis	12
2.3. Control genético del sexo	14
2.3.1. Genes que actúan antes de la determinación sexual	15
SF1	15
WT1	18
GATA4	21
FOG2	23
Otros genes	25
2.3.2. Genes implicados en el determinismo del sexo y la diferenciación gonadal	26
SRY	26
SOX9	28
DAX1	32
WNT4	36
FGF9	38
PDGFR α	39
DMRT1	40
AMH	43
Otros genes	45
2.4. Interacciones génicas en el desarrollo gonadal .	48
2.5. Reversión sexual en mamíferos	52
2.5.1. Factores relacionados con reversión sexual y dis- genesia gonadal	52
2.5.2. Particularidades del género <i>Talpa</i>	54
Biología del topo	54
Hermafroditismo verdadero en <i>T. occidentalis</i> . .	55
Características de la porción testicular del ovoteste	56

2. Antecedentes

2.1. Determinismo del sexo

El desarrollo de la gónada es único debido a su naturaleza bipotencial. A partir de un mismo primordio gonadal pueden formarse dos órganos diferentes, el testículo y el ovario. Por tanto, el estudio de los mecanismos que determinan una u otra vía de desarrollo es fundamental para intentar comprender uno de los hechos más fascinantes de la evolución: la existencia de dos sexos, el masculino y el femenino.

2.1.1. Introducción histórica

El origen y naturaleza de las diferencias entre sexos ha sido un tema que ha inquietado a filósofos y científicos desde la antigüedad. La primera hipótesis documentada sobre la determinación del sexo fue descrita por Aristóteles sobre el año 350 a.C. Según el pensador griego, las mujeres eran «hombres mutilados» que no se habían desarrollado completamente debido a que el calor del semen del padre no había podido contrarrestar el frío útero de la madre, por lo que cuanto más calurosa fuese la pasión en el coito mayor probabilidad habría de concebir un niño. Las mujeres eran, por esta razón, más frías y pasivas que los hombres, y los órganos sexuales femeninos no estaban maduros hasta el punto de no proporcionar semillas viables. El semen del hombre estaría formado por ingredientes imperfectamente mezclados, algunos de los cuales habrían sido heredados de generaciones anteriores, que se asociaban con el semen femenino, el fluido menstrual, el cual le daba forma y potencia (*dynamis*) a la sustancia amorfa.

Las ideas de Aristóteles fueron aceptadas durante unos dos mil años. De esta manera, aún en el siglo XVII los estudios médicos se centraban en el análisis de las hipotéticas etapas de la coagulación del embrión a partir de la mezcla de semen materno y paterno. Otras teorías argumentaban que estas mezclas podrían no ser necesarias, postulando que las formas más simples de vida aparecían por generación espontánea. En 1667, el médico alquimista Johann Baptista von Helmont propuso la siguiente teoría: «*si se comprime una camisa sucia en el orificio de un recipiente que contenga granos de trigo, el fermento salido de la camisa sucia, modificado por el olor del grano, da lugar a la transmutación del grano en ratones, después de veintidós días aproximadamente*». Pocos años después, Anton van Leeuwenhoek, comerciante y científico holandés conocido por las mejoras que introdujo a la fabricación de microscopios, observó espermatozoides vivos en el semen humano y de diversos animales en su microscopio artesanal («*el espejo mágico de Leeuwenhoek*»), a los que llamó *animalúnculos*. En 1694, el científico holandés Nicolas Hartsoeker realizó el dibujo que se muestra en la figura 2.1, tras afirmar haber observado pequeños hombres en el semen humano. Se le atribuyó el término *homúnculo* (del latín *homunculus*, hombre pequeño) al

2.1. Determinismo del sexo

espermatozoide y se propuso que el esperma estaba formado por millones de individuos diminutos, que se introducían en el interior de una mujer para que ésta los alimentase durante su desarrollo. Cualquier semejanza que el niño pudiera tener con su madre sería debida únicamente a las influencias prenatales del vientre.

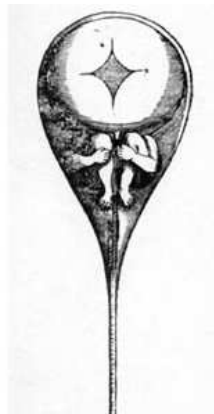


Figura 2.1: Homúnculo de Hartsoeker.

En el siglo XIX todavía se consideraba a la mujer como mera portadora de huevos que permitían la transmisión de caracteres paternos. Se empezó a estudiar la fisiología de los órganos sexuales sin alcanzarse un consenso sobre cómo el sexo podía ser determinado. Algunas teorías propusieron que el ambiente, concretamente la temperatura y la nutrición, era clave en la determinación del sexo, de tal forma que los factores que favorecen el almacenamiento de energía y nutrientes predispondrían a tener descendencia femenina, mientras que aquellos que favoreciesen la utilización de esa energía y nutrientes aumentarían la probabilidad de tener descendencia masculina.

Las primeras teorías cromosómicas del determinismo del sexo no llegaron hasta el redescubrimiento de los trabajos de Mendel en 1900 y de los cromosomas sexuales (McClung, 1902). Así, Stevens (1905) estableció una correlación entre el sexo y los cromosomas en insectos, de manera que los individuos XX tendrían fenotipo femenino, mientras que los XY ó XO serían machos. Esto supuso un nuevo punto de vista sobre los mecanismos que rigen la determinación del sexo, proponiéndose por primera vez que éstos pudieran estar influidos por algún factor nuclear independientemente de las condiciones ambientales. Cuando empezaron a estudiarse los mecanismos de determinación genética del sexo en mamíferos, se pensó en una influencia directa de la dosis de cromosomas X y no del Y, de forma que dos cromosomas X producirían una determinación femenina mientras que uno sólo daría lugar

2. Antecedentes

a un desarrollo masculino.

Aunque con el paso del tiempo se ha demostrado que todas estas teorías no eran correctas, algunas de esas ideas no estaban mal fundamentadas. Por ejemplo, como se indica a continuación, hoy día se sabe que en algunas especies de reptiles el sexo está determinado por la temperatura de incubación de los huevos.

2.1.2. Mecanismos de determinación sexual

Los sistemas de determinación del sexo son muy variables entre los diferentes grupos del reino animal. A grandes rasgos, éstos pueden dividirse en dos tipos: los mecanismos genéticos y los ambientales.

Mecanismos genéticos

En los mecanismos de determinación genética (GSD, *Genetic Sex determination.*), el sexo está determinado por las diferencias genéticas que presentan los individuos de los dos sexos de una población. Estas diferencias pueden deberse a la existencia de cromosomas sexuales o regiones cromosómicas heteromórficas, asimetrías en la dosis de cromosomas, o al efecto acumulativo de variantes alélicas en el genoma.

El ejemplo más conocido de determinismo del sexo basado en la existencia de cromosomas sexuales heteromórficos es el caso de la especie humana, en donde existen dos cromosomas sexuales (X e Y) que solo presentan una pequeña homología en la región pseudoautosómica. Las hembras portan dos cromosomas X y los machos tienen un solo cromosoma X y un cromosoma Y. En este caso, el sexo no está determinado por la dosis del cromosoma X sino por la presencia o ausencia del cromosoma Y. Este es el sistema que opera en mamíferos y algunos grupos de peces (Marshall Graves y Shetty, 2001).

En algunos invertebrados, por el contrario, la determinación del sexo depende de la relación entre el número de cromosomas X y el de complementos autosómicos. Esto es lo que ocurre en la mosca *Drosophila melanogaster* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. En la primera, si la relación entre autosomas y cromosomas X es igual a 1 se produce un desarrollo femenino, y si es igual a 0.5 se activa la ruta masculina (Bridges, 1925). En *C. elegans* aún no se conoce la naturaleza molecular de la señal procedente de la relación cromosomas X:autosomas, pero se sabe que los animales con un solo cromosoma X se desarrollan como machos y los que presentan dos cromosomas X se desarrollan como hembras o hermafroditas (Madl y Herman, 1979).

Las aves y algunos reptiles también tienen un sistema de cromosomas sexuales heteromórficos aunque, en contraste con los mamíferos, el sexo

2.1. Determinismo del sexo

heterogamético¹ es la hembra mientras que los machos son homogaméticos (Smith y Sinclair, 2004). En aves, aún no se ha identificado el mecanismo molecular de determinación sexual, por lo que se desconoce si éste depende de la dosis del cromosoma Z (doble en machos y simple en hembras), de algún gen maestro localizado en el cromosoma W, o de ambas situaciones (Smith y Sinclair, 2004).

Existen especies con GSD, como la mosca común, en donde no se han identificado regiones cromosómicas heteromórficas entre sexos. Se ha propuesto que, en este caso, el sexo podría estar controlado por el efecto acumulativo de diferentes variantes alélicas segregadas en la población en diferentes loci (Schutt y Nothiger, 2000).

Mecanismos ambientales

En otros muchos animales el sexo de la descendencia depende de factores extrínsecos. En la determinación sexual ambiental (ESD, *Environmental Sex Determination*) pueden influir un amplio rango de señales ambientales como, por ejemplo, la localización de los huevos (Leutert, 1974), la presencia o ausencia de ciertas bacterias (Rousset *y col.*, 1992), el pH del medio (Shapiro, 1990), la densidad de población (Crews, 1993), la actividad hormonal y la temperatura (Crews, 1994). Estos mecanismos no podrían ocurrir en mamíferos debido a que ambos sexos se desarrollan bajo una temperatura constante y con unas mismas condiciones hormonales en el útero.

Aunque los mecanismos ESD permiten una rápida adaptación de la proporción de sexos frente a pequeños cambios en el hábitat, las especies con este tipo de determinación sexual son muy vulnerables a fuertes cambios ambientales, habiéndose relacionado la extinción de grandes grupos de animales con este hecho (Miller *y col.*, 2004).

Los mecanismos de determinación y diferenciación pueden llegar a ser muy diversos incluso en grupos taxonómicos emparentados. En reptiles, por ejemplo, todas las especies de cocodrilo estudiadas, muchas de tortuga y algunas de lagarto, presentan una determinación del sexo ambiental dependiente de la temperatura (TSD, *Temperature Sex Determination*); sin embargo, las serpientes y muchas especies de lagarto tienen un mecanismo de determinación del sexo de tipo genético (Pieau *y col.*, 1999). Incluso se ha demostrado TSD en algunos reptiles con cromosomas sexuales heteromórficos, lo que indica que los mecanismos GSD y ESD podrían actuar conjuntamente en estas especies (Sarre *y col.*, 2004).

¹El sexo heterogamético es aquel que poseen los individuos que producen dos tipos de gametos (Z y W en aves y X e Y en mamíferos). Asimismo, los individuos con sexo homogamético sólo producen un único tipo de gameto (Z en aves y X en mamíferos).

2. Antecedentes

2.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

Como se ha comentado anteriormente, las gónadas representan un caso excepcional en el desarrollo embrionario. Cada órgano de un individuo proviene de un único primordio indiferenciado cuyo desarrollo está marcado genéticamente, de manera que sólo puede diferenciarse de una única manera; por ejemplo, el primordio del corazón sólo puede llegar a ser un corazón, y el hepático invariablemente formará un hígado. Por el contrario, la gónada indiferenciada puede seguir dos vías muy distintas de desarrollo, pudiendo dar lugar a un testículo o un ovario, lo que conducirá el desarrollo del organismo hacia macho o hembra. Por esta razón, la gónada es un modelo particularmente interesante en el estudio de la organogénesis. Mutaciones o manipulaciones *in vitro* pueden bloquear una de las rutas pudiendo resultar en la formación de un órgano alternativo y, como consecuencia, en un individuo cuyo sexo fenotípico es incoherente con su sexo genético. Esta característica muestra el nivel de plasticidad que presentan las rutas de desarrollo y los procesos por los cuales las células eligen su destino.

Los mecanismos que regulan la gonadogénesis son muy parecidos en la mayoría de los mamíferos por lo que, para describir la secuencia de acontecimientos que ocurren durante el desarrollo gonadal, se tomará al ratón como modelo por ser la especie más estudiada.

2.2.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada

En mamíferos, el sistema genitourinario se forma a partir del mesodermo intermedio que, en su etapa embrionaria, se compone de tres regiones: pronefros, mesonefros y metanefros. Éstas se desarrollan en el eje antero-posterior, a lo largo del conducto *néfrico* o *de Wolff*, ocupando gran parte del volumen abdominal. Aunque el riñón permanente se origina a partir del metanefros (situado en la región posterior), es el mesonefros quién realiza las funciones renales durante la embriogénesis. El pronefros (localizado en el extremo anterior), a su vez, es un órgano vestigial que degenera durante el desarrollo embrionario de amniotas. Un segundo conducto, el *paramesonéfrico* o *de Müller*, se forma dentro de cada mesonefros por invaginación del epitelio celómico. Este conducto queda paralelo al conducto de Wolff hasta la línea media del mesonefros, en donde se gira hacia el extremo posterior y se une con su homólogo del lado opuesto (Saxen y Sariola, 1987).

El primordio gonadal, como se muestra en la figura 2.2, aparece como un engrosamiento de la superficie ventrolateral de cada mesonefros, en la cuarta semana de gestación en humano y 9.5 días post-coito (dpc) en ratón. Dicho engrosamiento recibe el nombre de *cresta genital* y está formado por células somáticas (mesoteliales, mesenquimáticas y endoteliales) procedentes del mesonefros y células germinales primordiales (PGCs, *primordial germ*

2.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

cells), que han llegado desde el mesodermo extraembrionario, a nivel del alantoides, migrando a través del primordio intestinal y el mesenterio dorsal (McLaren, 2003).

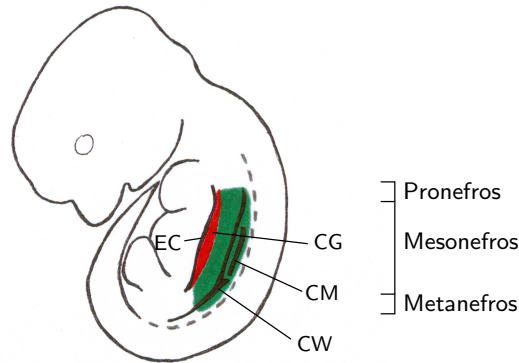


Figura 2.2: Sistema genitourinario de ratón a los 10.5 dpc. (EC) Epitelio celómico; (CG) cresta genital; (CM) conducto de Müller; (CW) conducto de Wolff.

Una vez que las PGCs han colonizado la gónada, se produce una gran proliferación de las células somáticas, sobre todo de las mesoteliales y mesenquimáticas. Las células que componen el primordio gonadal quedan estrechamente empaquetadas entre el epitelio celómico y el epitelio mesonefrico formando el denominado *blastema gonadal*. Posteriormente, el epitelio de la cresta genital prolifera y se extiende hacia el tejido conectivo laxo mesenquimático, dando lugar a los *cordones sexuales*, en el interior de los cuales se disponen las PGCs. El resto del tejido gonadal queda formado por el *estroma*, que contiene células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos en desarrollo (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

En este punto, la gónada indiferenciada está formada esencialmente por cuatro tipos celulares, tres de los cuales tienen naturaleza bipotencial: la *línea germinal*, capaz de comenzar tanto la ovogénesis como la espermatogénesis; la *línea de sostén*, que rodea a la anterior proporcionándole un ambiente adecuado para que se desarrolle y que dará lugar a las células de Sertoli en el testículo y las células foliculares en el ovario; y la *línea esteroideogénica*, precursora de las células de Leydig en machos y las células de la teca en hembras, que son las responsables de la producción de hormonas esteroideas. La elección de una de las dos rutas de diferenciación posibles dependerá del sexo genético del individuo, de tal forma que si éste es masculino se producirá un desarrollo testicular y si el sexo es femenino el desarrollo será ovárico (Swain y Lovell-Badge, 1999). El cuarto tipo celular es el de las

2. Antecedentes

células endoteliales, precursoras del sistema vascular, que estarán presentes tanto en el ovario como en el testículo, pero que proliferarán especialmente en este último.

2.2.2. Diferenciación testicular

En la mayoría de los mamíferos, el primer signo de diferenciación se produce en la gónada XY (Merchant-Larios, 1975; Merchant-Larios y Taketo, 1991; Wartenberg, 1978, 1982). Aunque este hecho llevó a pensar que la determinación del sexo masculino era un proceso activo que pone en marcha la maquinaria del desarrollo testicular antes de que la diferenciación ovárica se haya iniciado, hoy en día esto no está tan claro.

En ratón, los eventos clave en la formación del testículo ocurren entre los 11.5 y los 12.5 dpc. Uno de ellos es la colonización de la gónada XY por parte de células procedentes del mesonefros adyacente a partir de los 11.5 dpc (Buehr *y col.*, 1993; Capel *y col.*, 1999; Martineau *y col.*, 1997; Merchant-Larios *y col.*, 1993). Esta migración se produce, fundamentalmente, por células endoteliales que organizarán el sistema arterial que irriga al testículo (Brennan *y col.*, 2002). Se cree que las células mioides peritubulares y perivasculares también provienen del mesonefros, aunque este hecho aún no se ha comprobado con marcadores moleculares (Martineau *y col.*, 1997). Simultáneamente a la migración, ocurre una gran proliferación de las células del epitelio celómico que se diferenciarán en el tipo celular más importante del desarrollo testicular, las células de Sertoli (Schmahl *y col.*, 2000). Estas células se dispondrán en la periferia de los cordones sexuales dejando en su interior a las células germinales, para las que actuarán como elemento de sostén. Tanto la migración celular como la proliferación de las células epiteliales se requieren para el desarrollo de los cordones y la diferenciación de las células de Sertoli, lo que indica que ambos procesos son cruciales en la gonadogénesis masculina (Schmahl y Capel, 2003; Tilmann y Capel, 1999).

Todos estos acontecimientos provocan que los cordones sexuales penetren en la región medular, en donde se extienden y anastomosan, y se separen del epitelio celómico por una gruesa matriz extracelular, la túnica albugínea, formando los denominados *cordones testiculares* (Merchant-Larios y Taketo, 1991).

Como consecuencia de la diferenciación de las células de Sertoli, se producirá la diferenciación de las células del estroma en células mioides peritubulares, que rodearán a las primeras y cooperarán con ellas en la deposición de la lámina basal que envuelve a los cordones (Skinner *y col.*, 1985; Tung y Fritz, 1987), y de otros tipos celulares como fibroblastos, células endoteliales y células de Leydig (Merchant-Larios y Taketo, 1991). Estas últimas son las responsables de la producción de hormonas esteroideas masculinizantes y se desarrollan en dos etapas, la línea fetal y la línea adulta

2.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

(Habert *y col.*, 2001). Las células de Leydig fetales están presentes en el testículo desde los 12.5 dpc hasta poco después del nacimiento. Durante ese periodo producen testosterona, que es la hormona responsable del desarrollo ulterior de los conductos de Wolff, de los que derivan los epidídimos, las vesículas seminales y los conductos deferentes. Aunque el origen y diferenciación de las células de Leydig fetales no está muy claro todavía, se sabe que una misma población de células precursoras esteroideogénicas es dividida en dos durante las etapas tempranas del desarrollo genitourinario, de manera que una de las subpoblaciones acaba en la corteza adrenal y la otra en la gónada antes de los 11.5 dpc (Hatano *y col.*, 1996). A su vez, las células de Leydig adultas aparecerán en la pubertad y serán las responsables del comienzo de la espermatogénesis y del desarrollo de las características sexuales secundarias (Habert *y col.*, 2001).

Por otro lado, a partir de los 12.5 dpc, las células de Sertoli producirán hormona antimulleriana (AMH, *antimullerian hormone*) que inhibirá el desarrollo de los conductos de Müller, que son los precursores de los órganos sexuales femeninos (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991).

Finalmente, el desarrollo testicular continuará con la transformación de los cordones sexuales en túbulos seminíferos, túbulos rectos y la rete testis propiamente dicha. El mesonefros degenerará y los testículos quedarán suspendidos por una proyección del peritoneo conocida como mesorquio (Lemeh, 1960).

2.2.3. Diferenciación ovárica

En el desarrollo ovárico, por el contrario, no se observa ningún cambio morfológico hasta los 13.5 dpc, momento en el cual las células germinales comienzan la meiosis en una onda que empieza en el extremo anterior de la gónada y se extiende hacia el posterior (Menke *y col.*, 2003). Esto provoca que, entre los 14.5 y los 17.5 dpc, los cordones sexuales iniciales desaparezcan y comience la foliculogénesis. En este proceso, cada oocito es rodeado por células epiteliales y células del estroma formando los *cordones sexuales corticales*, denominados así porque se localizan en la periferia de la gónada. Posteriormente, las células de origen epitelial se diferenciarán en células foliculares, que permanecerán en íntimo contacto con el oocito, mientras que las del estroma darán lugar a las células de la teca, que lo separarán del intersticio ovárico. Ambos tipos celulares formarán los folículos, cada uno de los cuales contendrá una célula germinal, que serán los responsables de la secreción de hormonas esteroideas. En ratón, la foliculogénesis termina varios días después del nacimiento (Merchant-Larios y Chimal-Monroy, 1989).

Aunque se ha detectado expresión de *AMH*, relacionada con el mantenimiento del ciclo ovárico, en las células foliculares después del nacimiento (Hirobe *y col.*, 1992; Ueno *y col.*, 1989), no se ha encontrado esta hormona en

2. Antecedentes

ningún estadio de la gónada XX embrionaria (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991). La ausencia de AMH, debida a que no hay células de Sertoli en el ovario, provoca que los conductos paramesonéfricos de Müller no sean inhibidos y formen los oviductos, el útero y la vagina superior. A su vez, al no haber células de Leydig, no se masculiniza el embrión y los conductos de Wolff degeneran por la ausencia de testosterona (Mossman y Duke, 1973).

En la figura que se muestra a continuación (fig. 2.3) quedan resumidos los procesos de diferenciación morfológica que tienen lugar durante las primeras etapas del desarrollo gonadal de ratón.

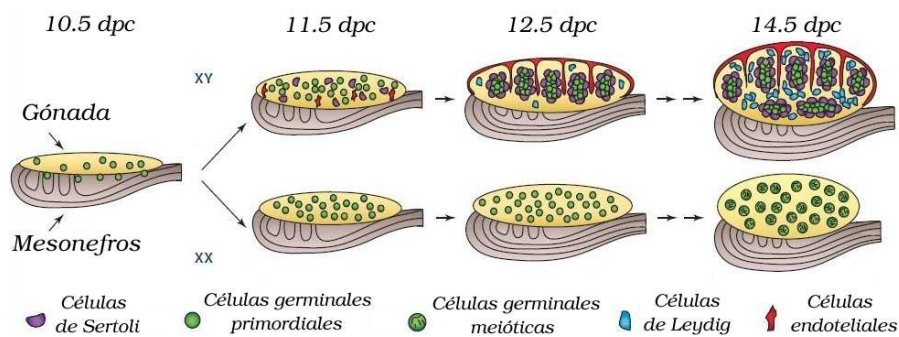


Figura 2.3: Esquema del desarrollo gonadal temprano de ratón. Adaptado de Ross y Capel (2005).

2.2.4. Papel de las células germinales en el desarrollo gonadal

La línea germinal es una de las más importantes del organismo, debido a que es la responsable de transmitir el material genético a la siguiente generación. En el embrión, como ya se ha comentado, las PGCs aparecen por primera vez antes de la formación de la cresta genital, concretamente a los 7.25 dpc en ratón, durante la gastrulación en el epiblasto próximo al mesodermo extraembrionario (Ginsburg *y col.*, 1990; Lawson y Hage, 1994). Después de proliferar, las PGCs migran a través del mesenterio intestinal hasta colonizar el primordio gonadal entre los 10 y los 11.5 dpc (Molyneaux *y col.*, 2001). Una vez en la cresta genital, las células germinales pueden seguir dos vías de desarrollo diferentes en función del sexo de la gónada. En mamíferos, curiosamente, el camino que tomen dependerá del entorno somático en el que se encuentren y no del sexo cromosómico de la propia célula germinal (Adams y McLaren, 2002).

En el desarrollo testicular temprano, las células germinales entran en

2.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

arresto mitótico hasta después del nacimiento, momento en el que se disponen en la periferia de los cordones testiculares constituyendo una población renovada a lo largo de la vida adulta. En el desarrollo ovárico, sin embargo, comienzan la profase de la primera división meiótica a los 13.5 dpc y entran en arresto meiótico antes del nacimiento. Se ha observado que cuando las PGCs se diferencian en otros tejidos, como la corteza adrenal a donde pueden llegar por error, también comienzan la meiosis (McLaren, 1995; Upadhyay y Zamboni, 1982). Esto podría sugerir que las células germinales están programadas de manera autónoma, mediante un reloj interno, para entrar en arresto meiótico, de manera que el papel del tejido gonadal XY sería hacer que cambien su destino encaminándolas hacia la espermatogénesis (McLaren, 1984; McLaren y Southee, 1997; Zamboni y Upadhyay, 1983). Pero, paradójicamente, esta idea del reloj biológico es incoherente con el hecho de que la meiosis no comienza al mismo tiempo en todas las células germinales del ovario, sino en una rápida onda en sentido anterior–posterior (Menke *y col.*, 2003; Yao *y col.*, 2003).

Se ha realizado un gran esfuerzo para intentar comprender los mecanismos que regulan el momento en el que las células germinales entran en meiosis. Estudios recientes apoyan firmemente la hipótesis de Byskov y Saxen (1976) sobre la existencia de una «sustancia inductora de la meiosis». Los datos obtenidos indican que esta sustancia es el ácido retinoico (RA, *retinoic acid*), producido por el mesonefros y otros muchos tejidos embrionarios, el cual es el responsable de la activación del gen *STRA8* (*stimulated by retinoic acid gene 8*) que, a su vez, es el encargado de inducir el inicio de la meiosis en el ovario embrionario. En la gónada XY, la meiosis sería retardada debido a que el RA es degradado por el enzima CYP26B1 (*cytochrome P450, P450RAI-2*), que no está presente en el ovario (Bowles *y col.*, 2006; Koubova *y col.*, 2006).

Las células germinales XX que se desarrollan en una gónada XY siguen un patrón masculino de diferenciación, aunque no sobreviven a la meiosis (Burgoyne *y col.*, 1992). Por el contrario, si se colocan células germinales XY en un ovario, éstas pueden iniciar la oogénesis y formar oocitos (Lovell-Badge y Robertson, 1990). Estos datos indican la importancia del control celular al que son sometidas las células germinales en su etapa embrionaria y reflejan el antagonismo existente entre las rutas de diferenciación masculina y femenina.

Aunque actualmente se conocen varias señales químicas que influyen en el desarrollo extragonadal de las PGCs (Ara *y col.*, 2003; Sette *y col.*, 2000; Ying *y col.*, 2002), se sabe muy poco sobre los factores que las regulan una vez que han colonizado la gónada. Asimismo, se ha observado que las células germinales también podrían actuar de forma paracrina sobre la diferenciación y la función de las células somáticas. Por ejemplo, el gen que codifica la prostaglandina D₂ sintasa (PGD₂s) se expresa entre los 11.5 y los 12.5 dpc en las células germinales de la gónada XY y no lo hace en las de la gónada XX. La adición de prostaglandina D₂ (PGD₂) provoca

2. Antecedentes

masculinización parcial de gónadas XX en cultivo, por lo que podría suponerse que las células germinales XY ejercen algún tipo de influencia sobre el desarrollo del testículo (Adams y McLaren, 2002). Por otro lado, se ha comprobado que los oocitos bloquean la migración celular y la formación de cordones testiculares cuando son trasplantados a primordios gonadales XY, evidenciando que una posible función de las células germinales femeninas podría ser antagonizar el desarrollo masculino (Yao *y col.*, 2003).

Lo que sí parece claro es que las células germinales desempeñan un papel mucho más importante en la diferenciación del ovario que en la del testículo. Se ha comprobado que pueden formarse cordones testiculares en la gónada XY sin presencia de células germinales (Merchant-Larios, 1975) aunque con un ligero retraso (Brennan y Capel, 2004), lo que indica que éstas pueden ser prescindibles para el desarrollo testicular. Por el contrario, la presencia de PGCs en el primordio gonadal XX es indispensable para el desarrollo y mantenimiento de los folículos en el ovario (McLaren, 2000). En ausencia de células germinales, los folículos degeneran en unas estructuras similares a cordones testiculares (Merchant-Larios y Centeno, 1981), algo de gran relevancia si tenemos en cuenta que algunos estudios indican que la falta de estrógenos en la gónada XX provoca que las células somáticas expresen genes de la ruta masculina como *SOX9* (*SRY-related HMG box 9*) y *AMH* (Couse *y col.*, 1999).

2.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

El desarrollo de un individuo es un proceso muy complejo en el cual se forman tejidos altamente especializados a partir de primordios de órganos indiferenciados. El avance en la Biología del Desarrollo está íntimamente relacionado con la comprensión de estos particulares mecanismos de diferenciación. En este sentido, la gónada representa un modelo de estudio excepcional por su naturaleza bipotencial.

Los conocimientos actuales sobre la determinación y diferenciación del sexo en mamíferos se basan, fundamentalmente, en dos áreas de estudio principales: la caracterización de los eventos biológicos que determinan el desarrollo sexual del individuo, incluyendo los patrones de expresión de los genes implicados, y el estudio de las mutaciones de estos genes que producen fenotipos anormales en humanos y ratones. Aún no se conocen todos los miembros de la extensa red de señales moleculares que dirigen la diferenciación gonadal y la función concreta de muchos de ellos es también una incógnita. A pesar de ello, se siguen identificando nuevos candidatos que ayudan a intentar dilucidar el fundamento molecular del extraordinario proceso de la gonadogénesis.

2.3.1. Genes que actúan antes de la determinación sexual

El estudio de los factores que intervienen en la formación del primordio gonadal es complicado debido a su temprana aparición en el desarrollo embrionario; no obstante, se han descrito varios genes que parecen estar implicados en el establecimiento y supervivencia de las líneas celulares que forman la cresta genital o en la activación del gen determinante del sexo. Como se muestra a continuación, se ha comprobado que algunos de estos genes están muy conservados en el reino animal.

SF1

El factor esteroideogénico 1 (SF1, *steroidogenic factor 1*), también conocido como proteína 4 de unión adrenal (Ad4BP, *adrenal 4-binding protein*) y receptor nuclear 1 del grupo A de la subfamilia 5 (NR5A1, *nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 1 gene*), pertenece a la familia de los receptores nucleares, la cual tiene un papel central en muchos aspectos del desarrollo y función de los tejidos. Esta familia incluye proteínas receptoras de hormonas esteroideas como estrógenos, progesterona y andrógenos, así como receptores de la hormona del tiroides, vitamina D y retinoides (Mangelsdorf *y col.*, 1995). SF1 fue identificado inicialmente en las líneas celulares adrenocorticales y gonadales como un importante factor regulador de la expresión de las *P450 citocromo hidroxilasas esteroideas* (Lala *y col.*, 1992; Rice *y col.*, 1991). En principio, la expresión de *SF1* se localizó en los principales tejidos esteroideogénicos del ratón adulto (corteza adrenal, testículo y ovario), relacionándose con la síntesis de esteroides (Ikeda *y col.*, 1993; Morohashi *y col.*, 1994), pero poco después se descubrió que también desempeñaba un papel importante en la síntesis de gonadotropinas (Barnhart *y Mellon*, 1994; Ingraham *y col.*, 1994; Shinoda *y col.*, 1995), así como en la diferenciación sexual y el desarrollo tanto de la gónada como de la glándula adrenal (Luo *y col.*, 1994).

El gen *SF1* humano tiene un tamaño de 28 Kb y está localizado en la banda 9q33.3 del cromosoma 9. Tiene seis intrones y la secuencia codificante está muy conservada entre los mamíferos (Meinke *y Sigler*, 1999). Codifica una proteína que presenta gran homología con la proteína FTZ-F1 (*Fushi-Tarazu factor 1*) de *Drosophila*, que es un regulador de la embriogénesis y la metamorfosis de este organismo (Lavorgna *y col.*, 1991). SF1 es una proteína nuclear de unos 54 kDa que posee un dominio de unión al ADN, compuesto por dos dedos de cinc, y se une como monómero a promotores de genes reconociendo la secuencia consenso CAAGGTCA (Meinke *y Sigler*, 1999; Parker *y Schimmer*, 1997; Wilson *y col.*, 1993b).

En lo referente al desarrollo gonadal, se ha observado expresión de *SF1* durante la formación de la cresta genital de humanos, a los 32 días post-

2. Antecedentes

ovulación (dpo). El nivel de expresión se mantiene similar en ambos sexos hasta los 44 dpo, momento en el que ocurre la diferenciación sexual. En el desarrollo del testículo, a los 52 dpo la expresión se localiza principalmente en el interior de las células de Sertoli, aunque también se detecta alguna expresión en las células de Leydig. Por el contrario, a las 18 semanas de gestación, la expresión es más intensa en las células de Leydig que en las de Sertoli. En la gónada XX, a su vez, se observa una expresión difusa por toda la gónada a los 52 dpo y en los estadios tardíos del desarrollo se aprecia una señal fuerte en el epitelio celómico (Hanley *y col.*, 1999).

En ratón, *Sf1* se expresa también en el primordio gonadal tanto XX como XY a los 9.5 dpc. Los niveles de *Sf1* disminuyen a los 11.5 dpc en el ovario, mientras que aumentan significativamente en el testículo, localizándose en las células de Leydig y en las de Sertoli (Hatano *y col.*, 1994; Ikeda *y col.*, 1994; Shen *y col.*, 1994).

En relación con su regulación, las proteínas WT1 (*Wilms' tumour suppressor protein 1*) y LHX9 (*lim homeobox gene 9*), implicadas en el desarrollo de la cresta genital, podrían actuar conjuntamente en la activación del promotor de *SF1* (Wilhelm y Englert, 2002). De la misma manera, el hecho de que el promotor de *SF1* presente una diana para GATA4, hace suponer que también pueda estar regulado por esta proteína (Tremblay y Viger, 2001a).

Aunque las mutaciones de *SF1* descritas en humanos son muy escasas, se han documentado diferentes cuadros clínicos asociados a ellas, incluyendo insuficiencia adrenal con disgenesia gonadal y reversión sexual de macho a hembra (Achermann *y col.*, 1999, 2002), insuficiencia adrenal con desarrollo ovárico normal (Biaison-Lauber y Schoenle, 2000) y disgenesia testicular con función adrenal normal (Correa *y col.*, 2004; Hasegawa *y col.*, 2004). En ratón, mutaciones de este gen provocan un desarrollo anormal del hipotálamo y la glándula pituitaria, con ausencia de hormona luteinizante (LH, *luteinizing hormone*) y hormona estimulante del folículo (FSH, *follicle-stimulating hormone*) (Shinoda *y col.*, 1995). Ratones transgénicos para un alelo nulo de *Sf1* (knock-out para *Sf1*) nacen a la edad esperada, lo que indica que no es necesario para la supervivencia del embrión, pero mueren poco después del nacimiento por insuficiencia adrenocortical. Estos ratones carecen de glándulas adrenales y gónadas, debido a que éstas sufren apoptosis y degeneran sobre los 12.5 dpc. Los ratones 46XY desarrollan los conductos de Müller presentando genitales internos femeninos. (Luo *y col.*, 1994; Sadovsky *y col.*, 1995).

Por tanto, según los datos anteriores, SF1 parece estar implicado en el desarrollo y función de las gónadas y las glándulas adrenales, así como en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante la función reproductiva.

Con respecto a su actuación en la gonadogénesis, SF1 presenta varias funciones importantes, como favorecer la proliferación y supervivencia de las

2.3. Control genético del sexo

células de la cresta genital (Luo *y col.*, 1994) y regular la síntesis de enzimas esteroideas (Hatano *y col.*, 1994; Ikeda *y col.*, 1994). Además, SF1 activa el promotor del gen *AMH* (Giuli *y col.*, 1997; Shen *y col.*, 1994), proceso en el que podría cooperar con las proteínas SOX9 (De Santa Barbara *y col.*, 1998), SOX8 (Schepers *y col.*, 2003), GATA4 (Tremblay y Viger, 1999) y WT1 (Nachtigal *y col.*, 1998). Aunque está ampliamente aceptado que la proteína DAX1 (*dosage-sensitive sex reversal-congenital adrenal hypoplasia critical region on the X chromosome protein 1*) antagoniza la función de SF1 en la diferenciación masculina (Nachtigal *y col.*, 1998; Tremblay y Viger, 2001b), estudios recientes apuntan a una cooperación entre ambas proteínas en la diferenciación de las células somáticas durante el desarrollo testicular (Park *y col.*, 2005).

SF1 es un gen muy conservado en el reino animal. Se han identificado ortólogos de *SF1* incluso en especies de invertebrados. Un ejemplo es el gen *FTZ-F1* de *Drosophila*, que interviene en el desarrollo embrionario de este díptero (Lala *y col.*, 1992).

En todos los vertebrados estudiados hasta la fecha se observa expresión de *SF1* en el primordio gonadal antes y durante la determinación sexual, aunque existen diferencias marcables en los niveles de expresión de machos y hembras entre las diferentes especies. En el anfibio *Rana rugosa*, por ejemplo, se ha observado expresión de *SF1* en el primordio gonadal de ambos sexos, pero esta expresión disminuye en el desarrollo ovárico y se mantiene hasta la etapa adulta en el testículo (Kawano *y col.*, 2001). De la misma manera, la expresión de *SF1* es mantenida en machos y reprimida en hembras en especies de tortugas con TDS durante el periodo sensible a la temperatura (Fleming *y col.*, 1999); sin embargo, en caimanes, que también presentan TDS, ocurre justo lo contrario (Western *y col.*, 2000). En pollos, por su parte, la expresión de *SF1* durante la determinación sexual es mantenida en machos pero aumenta significativamente en hembras (Smith *y col.*, 1999b). Los elevados niveles de SF1 en las gónadas de los embriones hembra de pollos y caimanes probablemente estén relacionados con la alta actividad esteroideogénica que muestran estas especies en el ovario en desarrollo; mientras que la presencia de SF1 en el testículo embrionario podría deberse a la función que desempeña en la regulación del gen *AMH*, la cual parece estar muy conservada (Morrish y Sinclair, 2002).

En peces teleosteos se han identificado una gran variedad de ortólogos de *SF1* (Chai y Chan, 2000; Ito *y col.*, 1998; Liu *y col.*, 1997; von Hofsten *y col.*, 2002; Watanabe *y col.*, 1999). Aunque la función concreta de estos genes no se conoce exactamente, en todos los casos está relacionada claramente con la esteroideogénesis y el desarrollo y función de la gónada.

2. Antecedentes

WT1

El tumor de Wilms (WT, *Wilms' tumour*) o nefroblastoma es un tipo de cáncer pediátrico del riñón en desarrollo que afecta a 1 de cada 10000 niños (Matsunaga, 1981). Este tumor puede ir acompañado de otras complicaciones en el sistema genitourinario dando lugar a diferentes síndromes, como el síndrome WAGR (*WT-aniridia-genitourinary tract abnormalities-mental retardation*), denominado así por la presencia de aniridia (hipoplasia del iris), anomalías genitourinarias y retraso mental (Pendergrass, 1976), el síndrome de Denys-Drash (DDS, *Denys-Drash syndrome*), caracterizado por nefropatía y malformaciones en el sistema reproductivo (Denys *y col.*, 1967; Drash *y col.*, 1970), y el síndrome de Frasier (FS, *Frasier syndrome*), en el que los pacientes muestran reversión sexual de macho a hembra o disgenesia gonadal masculina y nefropatía severa (Moorthy *y col.*, 1987). El análisis citogenético de pacientes con WT demostró que este tumor estaba relacionado en un alto porcentaje de casos con una delección en el cromosoma 11 (Riccardi *y col.*, 1978). En el interior del fragmento delecionado se identificó un gen al que se le denominó *WT1* (*Wilms' tumour suppressor gene 1*) (Gessler *y col.*, 1990). Estudios posteriores confirmaron que este gen estaba implicado además en los síndromes anteriormente mencionados (Baird *y col.*, 1992; Barbaux *y col.*, 1997; Jaubert *y col.*, 2003; Little *y col.*, 1995).

WT1 es un gen complejo formado por 10 exones y 9 intrones. Está situado en el locus 11p13 del cromosoma 11 humano y su tamaño es de unos 50 Kb. Los seis primeros exones codifican un dominio de regulación transcripcional rico en prolina y glutamina y los cuatro últimos codifican cuatro dominios de dedos de cinc (Call *y col.*, 1990; Gessler *y col.*, 1992).

Una de las características más importantes del gen *WT1* es la presencia de dos regiones de maduración alternativa situadas en los exones 5 y 9 (Gessler *y col.*, 1992; Haber *y col.*, 1991). La inclusión del exón 5 durante la maduración del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) inserta 17 aminoácidos dentro del dominio de regulación transcripcional, mientras que la no eliminación de una región del exón 9 conlleva la adición de una pequeña secuencia de 3 aminoácidos conocida como KTS (lisina-treonina-serina) entre los dedos de cinc 3 y 4. Dependiendo del tipo de maduración alternativa que se produzca pueden formarse cuatro grupos principales de proteínas *WT1* (uno con los 17 aminoácidos del exón 5 y KTS, otro sin ambas secuencias y otros dos con una sola de las secuencias), con un tamaño comprendido entre 52-54 KDa (Morris *y col.*, 1991). Aunque la existencia de otras modificaciones posteriores, por edición del ARNm (Sharma *y col.*, 1994) y presencia de sitios alternativos de iniciación de la traducción (Caricasole *y col.*, 1996; Scharnhorst *y col.*, 1999), hace que puedan producirse hasta 24 isoformas menores. Todas las proteínas *WT1* se clasifican en isoformas +KTS o -KTS en función de si portan o no estos tres aminoácidos.

La localización subcelular de *WT1* está determinada por la presencia o

2.3. Control genético del sexo

ausencia de la secuencia KTS en la proteína, de manera que las isoformas -KTS presentan localización nuclear mientras que las isoformas +KTS se disponen alrededor del núcleo. Este hecho apoya la idea de que las isoformas +KTS, que tienen sitios de unión al ARN, formen parte de los espliceosomas (complejos reguladores post-transcripcionales) y las isoformas -KTS, las cuales muestran una mayor afinidad por el ADN, sean factores o cofactores de la transcripción de genes (Bickmore *y col.*, 1992; Caricasole *y col.*, 1996; Hammes *y col.*, 2001; Larsson *y col.*, 1995).

Wt1 se expresa en ratón por primera vez en el mesodermo intermedio a los 9 dpc, en la zona que dará lugar a la cresta genital. Posteriormente, se ha detectado expresión en el epitelio celómico y los cordones sexuales del primordio gonadal de ambos sexos, así como en el mesonefros adyacente (Armstrong *y col.*, 1993; Rackley *y col.*, 1993). La expresión de *Wt1* se mantiene en las células de Sertoli en el testículo y en las células epiteliales y de la granulosa en el ovario hasta la edad adulta. *Wt1* también se expresa en el útero (embrionario y adulto), los oviductos y el endometrio de las hembras (Pelletier *y col.*, 1991).

En humanos, el primer momento en el que se observa expresión de *WT1* es en la séptima semana de gestación, en el mesonefros y la cresta genital (Mundlos *y col.*, 1993; Pritchard-Jones *y col.*, 1990).

Como ya se ha comentado, las mutaciones de *WT1* están relacionadas con los síndromes WAGR, DDS y FS. Actualmente se sabe que los problemas en el desarrollo testicular de los pacientes con WAGR son debidos a que *WT1* se encuentra en hemicigosis (Baird *y col.*, 1992). Asimismo, el origen de los casos de DDS es la existencia de mutaciones dominantes que afectan a los dominios de dedos de cinc codificados por los exones 7-10, algo que puede desembocar en casos de pseudohermafroditismo masculino (Little *y col.*, 1995). El FS, a su vez, está causado por mutaciones puntuales en el intrón 9 que afectan a la maduración de la secuencia KTS (Barboux *y col.*, 1997). La reducida fracción +KTS/-KTS produce feminización del testículo pudiendo desembocar en reversión sexual de macho a hembra. Esto, junto con el hecho de que ratones que sólo expresan la isoforma -KTS muestran este tipo de reversión sexual por una reducción drástica en los niveles de Sry (Hammes *y col.*, 2001), pone de manifiesto la importancia que deben tener las isoformas +KTS en la diferenciación sexual masculina.

Todos estos datos indican que *WT1* está implicado en el desarrollo de la cresta genital y se requiere para la supervivencia del primordio gonadal (Hammes *y col.*, 2001). Además, *WT1* podría ser necesario para el mantenimiento de la estructura tubular del testículo (Gao *y col.*, 2006), así como para la diferenciación de las células de Sertoli, la supervivencia y proliferación de las células germinales embrionarias y el desarrollo y función de las células de Leydig fetales (Natoli *y col.*, 2004).

Para analizar más profundamente el papel de *WT1* en la gonadogénesis,

2. Antecedentes

se obtuvieron ratones transgénicos homocigotos para un alelo mutante de *Wt1*, pero estos ratones morían durante la embriogénesis por fallos en el desarrollo del sistema genitourinario y del corazón (Kreidberg *y col.*, 1993). Este problema se ha solventado con el diseño de mutantes condicionados en los que no se expresa *Wt1* en las células de Sertoli, lo que permite estudiar la función de esta proteína durante todo el desarrollo testicular. En estos casos, se observa un incremento de la apoptosis en las células germinales, pérdida de las uniones adherentes, desregulación de genes asociados con la adherencia y problemas de fertilidad. Estas anomalías indican que WT1 podría intervenir en las señales de transducción que se producen a través de las uniones de las células de Sertoli y las células germinales, las cuales son necesarias en la regulación de la espermatogénesis (Rao *y col.*, 2006).

La existencia de diferentes isoformas por maduración alternativa confiere a WT1 la capacidad de interactuar con una gran variedad de proteínas y de realizar, por tanto, diversas funciones en la célula. En este sentido, las isoformas +KTS parecen intervenir en la regulación post-transcripcional de *SRY*, por lo que su presencia en la célula es fundamental en la determinación del sexo (Hammes *y col.*, 2001).

Las isoformas -KTS, por su parte, pueden actuar como cofactores de proteínas implicadas en la regulación transcripcional, como SRY (Matsuzawa-Watanabe *y col.*, 2003), LXH9 (Wilhelm y Englert, 2002) y SF1 (Nachtigal *y col.*, 1998). Se ha propuesto que el complejo LXH9-WT1 modula positivamente la expresión de *SF1* (Wilhelm y Englert, 2002), mientras que el complejo WT1-SF1 es capaz de activar el promotor de *AMH* (Nachtigal *y col.*, 1998). La asociación entre WT1 y SF1 parece estar reprimida por la proteína DAX1 *in vitro* (Nachtigal *y col.*, 1998), aunque experimentos *in vivo* no apoyan esta idea (Park *y col.*, 2005). Otros estudios, sin embargo, muestran que WT1 puede actuar conjuntamente con DAX1 para reprimir la función activadora de SF1 sobre genes de la síntesis de hormonas esteroideas (Gurates *y col.*, 2003). Por otro lado, se ha visto que también puede ocurrir multimerización de WT1 (Moffett *y col.*, 1995).

Del mismo modo, también hay indicios de que las isoformas -KTS actúen directamente como monómeros en la activación de genes como *SF1* (Wilhelm y Englert, 2002), *WNT4* (*Wingless-related MMTV integration site 4*) (Sim *y col.*, 2002), *DAX1* (Kim *y col.*, 1999) y *SOX9* (Gao *y col.*, 2006), e incluso en la represión de genes como el *receptor de andrógenos* (AR, *androgen receptor*) (Shimamura *y col.*, 1997; Zaia *y col.*, 2001). Asimismo, constructos que contienen *WT1* insertado tienen la capacidad de activar el promotor de *SRY* humano en cultivos celulares, aunque el sitio de unión presente en este promotor no está conservado en el ratón (Hossain y Saunders, 2001).

Por tanto, el fallo de las proteínas WT1 mutantes en la activación de los promotores de *SRY* y *AMH* podría ser la causa de los casos de reversión sexual, pseudohermafroditismo masculino y disgenesia gonadal que ocurren

2.3. Control genético del sexo

en los síndromes asociados a ellas.

Desde un punto de vista evolutivo, *WT1* es otro gen muy conservado imprescindible para el establecimiento del primordio gonadal de las diferentes especies de animales. En aves y reptiles con TDS, *WT1* presenta una alta expresión durante todo el desarrollo gonadal de ambos sexos, no observándose dimorfismo en ningún estadio (Smith *y col.*, 1999b; Western *y col.*, 2000), aunque estos estudios no hacen distinción entre las isoformas +KTS y -KTS. En anfibios, *WT1* se expresa en la gónada indiferenciada de ambos sexos antes de la determinación sexual, pero esta expresión sólo se mantiene en el desarrollo testicular, en donde continúa hasta la edad adulta (Yamamura *y col.*, 2005). Asimismo, *WT1* parece ser también un factor crucial en el desarrollo del primordio gonadal y renal de peces teleósteos (Hsu *y col.*, 2003).

GATA4

Las proteínas GATA conforman una familia de factores de transcripción con dedos de cinc que recibe su nombre por la secuencia consenso que reconocen en los promotores de los genes que regulan: (A/T) GATA (A/G) (Patient y McGhee, 2002). Inicialmente, estas proteínas fueron identificadas como moduladores fundamentales de la hematopoyesis (Weiss y Orkin, 1995), pero en los últimos años se ha comprobado que, además, están implicadas en el desarrollo embrionario de diversos órganos (Viger *y col.*, 2004).

Uno de los miembros de esta familia es *GATA4*, situado en el locus 8p23.1 del cromosoma 8 humano (Huang *y col.*, 1996; White *y col.*, 1995). Este gen codifica una proteína de 48 KDa que presenta dos dominios adyacentes de dedos de cinc por los que se une al ADN (Huang *y col.*, 1995).

Gata4 se expresa abundantemente en las células somáticas de la cresta genital de ambos sexos en ratón. A los 13.5 dpc, la expresión comienza a mostrar un dimorfismo, de manera que los niveles de *Gata4* se mantienen altos en las células de Sertoli, de Leydig y la túnica albugínea en la gónada XY, mientras que en la gónada XX son disminuidos en todos los tipos celulares. Después del nacimiento, la expresión persiste en las células somáticas de los testículos y es reactivada en los ovarios adultos, sobre todo en las células foliculares y de la teca (Heikinheimo *y col.*, 1997; Ketola *y col.*, 1999, 2002; Viger *y col.*, 1998). No obstante, en estudios más recientes se detecta expresión de *Gata4* en las células somáticas del ovario en desarrollo desde los 12.5 dpc hasta el nacimiento (Anttonen *y col.*, 2003).

En el testículo humano, el patrón de expresión de este gen es similar al de ratón, con la excepción de que tanto las células germinales fetales como las prepuberales también expresan *GATA4* (Ketola *y col.*, 2000). De igual forma, en el ovario adulto también hay expresión de *GATA4*, principalmente en las células foliculares y de la teca (Laitinen *y col.*, 2000).

Los datos existentes sobre la regulación de la expresión de *GATA4* son

2. Antecedentes

muy escasos. Se ha propuesto que FSH podría activar a este gen de forma indirecta, al menos en el ovario humano, por asociación de mutaciones en el receptor de FSH con niveles muy reducidos de proteína GATA4 (Vaskivuo *y col.*, 2002).

En relación con su actuación en la célula, se ha comprobado que para que los factores GATA ejerzan su función es necesario que interactúen físicamente con otras proteínas, como los miembros de la familia FOG (*friend of GATA*) (Cantor y Orkin, 2001; Crispino *y col.*, 2001). Teniendo en cuenta esto, y debido a que los ratones knock-out para *Gata4* mueren antes de la formación del primordio gonadal por fallos cardiovasculares (Kuo *y col.*, 1997; Molkentin *y col.*, 1997), se obtuvieron ratones transgénicos que portaban un gen *Gata4* modificado, el cual codifica una proteína que no puede unirse con Fog2 (Crispino *y col.*, 2001). Estos ratones sobreviven hasta los 13.5 dpc, de manera que puede estudiarse la influencia del complejo Gata4/Fog2 en los primeros estadios del desarrollo gonadal. Se observó que los homocigotos para este alelo modificado muestran una reducción significativa de la expresión de *Sry* durante la determinación sexual, acompañada de deficiencias severas en el desarrollo del testículo (Tevosian *y col.*, 2002). Los bajos niveles de proteína Sry provocaban que no se expresasen genes de la ruta masculina en las células de Sertoli, así como genes que codifican enzimas de la síntesis esteroidea en las células de Leydig. Estas observaciones, junto con la identificación de una diana para Gata4 en el promotor de *Sry*, hacen pensar que la interacción física de GATA4 y FOG2 es imprescindible en la determinación del sexo masculina (Tevosian *y col.*, 2002).

La primera diana directa de GATA4 que se identificó fue el promotor del gen *AMH* (Viger *y col.*, 1998). En este caso, GATA4 podría cooperar con SF1 para formar un complejo activador de la transcripción de *AMH* (Tremblay y Viger, 1999; Watanabe *y col.*, 2000). Esta asociación podría ser inhibida por DAX1 (Tremblay y Viger, 2001b) y, aunque no se han descrito casos de mutaciones de *GATA4* en humanos, hay evidencias de que la inactivación de esta cooperación puede dar lugar a anomalías en la diferenciación masculina por niveles insuficientes de AMH (Tremblay y Viger, 2003a). Asimismo, parece ser que FOG2 reprime la función activadora de GATA4 sobre *AMH* (Anttonen *y col.*, 2003; Tremblay *y col.*, 2001).

Además del promotor de *SRY* y *AMH*, se han localizado dianas de GATA4 en los promotores de otros marcadores moleculares de las células de Sertoli, como *SF1* (Tremblay y Viger, 2001a) y *DMRT1* (Lei y Heckert, 2004).

Todos estos estudios indican que *GATA4* es un gen maestro en la regulación de genes implicados en la diferenciación de las células de Sertoli y de Leydig. En este sentido, GATA4 parece desempeñar un papel importante en el desarrollo temprano del testículo (Tevosian *y col.*, 2002), la diferenciación sexual masculina (Tremblay y Viger, 2003a) y la esteroidogénesis (Tremblay y Viger, 2003b).

2.3. Control genético del sexo

Se han encontrado factores GATA que intervienen en la gonadogénesis de una gran variedad de especies, desde invertebrados a los humanos (Drevet *y col.*, 1994; Heikinheimo *y col.*, 1997; Ketola *y col.*, 2000; Lossky y Wensink, 1995; Singh *y col.*, 1994; Spieth *y col.*, 1991; Viger *y col.*, 1998; Yomogida *y col.*, 1994), sugiriendo que su papel funcional en las gónadas ha sido conservado durante la evolución. En mamíferos, se han descrito 6 factores GATA, de los que 4 de ellos se expresan en las gónadas: *GATA1* (Ito *y col.*, 1993; Yomogida *y col.*, 1994), *GATA2* (Siggers *y col.*, 2002), *GATA4* (Heikinheimo *y col.*, 1997; Viger *y col.*, 1998) y *GATA6* (Heikinheimo *y col.*, 1997; Ketola *y col.*, 1999). En general, estos cuatro factores GATA están presentes en los tipos celulares somáticos principales de la gónada, excepto *Gata2*, que se expresa específicamente en las células germinales del ovario del ratón durante un pequeño periodo en el desarrollo embrionario temprano (Siggers *y col.*, 2002) y *GATA4*, el cual, además de ser un marcador de células somáticas, también se ha visto que se expresa intensamente en células germinales fetales y prepuberales del testículo humano (Ketola *y col.*, 2000).

FOG2

La familia de proteínas FOG (*friend of GATA*) incluye una serie de factores de transcripción que se caracterizan por presentar múltiples dedos de cinc y dominios represores de la transcripción (Fox *y col.*, 1999; Lin *y col.*, 2004; Tevosian *y col.*, 1999; Tsang *y col.*, 1997). Aunque, al parecer, los factores FOG no tienen la capacidad de unirse al ADN, pueden actuar como cofactores de las proteínas GATA aumentando o disminuyendo su actividad según el contexto celular (Fox *y col.*, 1999; Holmes *y col.*, 1999; Lu *y col.*, 1999; Robert *y col.*, 2002; Tsang *y col.*, 1997). La actividad represora que estos factores realizan sobre las proteínas GATA se debe tanto al dominio de represión como a la unión que pueden formar en su extremo carboxilo con el potente correpressor transcripcional CtBP-2 (*C-terminal binding protein-2*) (Holmes *y col.*, 1999; Lin *y col.*, 2004; Svensson *y col.*, 2000; Turner y Crossley, 1998).

La primera proteína FOG se describió como un cofactor de *GATA1* en la hematopoyesis (Tsang *y col.*, 1997). Poco después, se identificó un segundo factor FOG, al que se denominó FOG2, que también podía formar complejos con proteínas GATA y que intervenía en la diferenciación del corazón, las neuronas y las gónadas (Tevosian *y col.*, 1999).

FOG2, también conocido como *ZFPM2* (*zinc finger protein multitype 2*), se encuentra en la banda 8q23.1 del cromosoma 8 humano. Alteraciones de este locus han sido asociadas con anomalías congénitas en el diafragma (Ackerman *y col.*, 2005; Temple *y col.*, 1994). El gen de ratón codifica un factor nuclear que contiene ocho dedos de cinc y un dominio de represión transcripcional. Esta proteína se une físicamente a *Gata4* por su extremo

2. Antecedentes

amino-inicial (Lin *y col.*, 2004; Svensson *y col.*, 1999, 2000).

En ratón, *Fog2* se expresa en la cresta genital XX y XY a los 10.5 dpc. En el desarrollo ovárico, se observa expresión en las células somáticas a partir de los 12.5 dpc, con un patrón similar al descrito por Anttonen *y col.* (2003) para *Gata4*, manteniéndose hasta el ovario adulto, en donde se localiza en las células foliculares y de la teca. En la gónada XY, la expresión de *Fog2* se observa en las células de Sertoli a los 12.5 dpc, aunque, en contraste con la gónada XX, ésta va disminuyendo conforme avanza el desarrollo testicular. A los 13.5 dpc la presencia de *Fog2* en las células de Sertoli es considerablemente baja, mientras que la de *Gata4* y *Amh* aumenta. Dos días después ya no se detecta expresión de *Fog2* en los núcleos de las células que están expresando *Amh* y ésta sólo se observa en las células de la túnica albugínea y unas pocas células intersticiales. Después del nacimiento, *Fog2* se expresa abundantemente en las células de Sertoli hasta la tercera semana de vida, volviendo a reactivarse cíclicamente en los túbulos seminíferos que se encuentran las etapas VII–XII de la espermatogénesis (Anttonen *y col.*, 2003; Ketola *y col.*, 2002).

Ratones deficientes del gen *Fog2* mueren a los 13.5 dpc por problemas en el desarrollo del sistema cardiovascular y, al igual que en los casos en los que no hay una copia activa de *Gata4*, se producen anomalías en el desarrollo testicular (Tevosian *y col.*, 2000). Este fenotipo gonadal se debe, como ya se ha comentado, al bloqueo de la función reguladora de la expresión de *Sry* que desempeña el complejo *Gata4/Fog2* durante las etapas tempranas de la gonadogénesis (Tevosian *y col.*, 2002). Estas observaciones hicieron que, en principio, se propusiese a FOG2 como otro factor implicado en la ruta de diferenciación masculina; sin embargo, cuando se verificó que su expresión disminuía en la gónada XY coincidiendo con la activación de *AMH*, se concluyó que su actuación en la diferenciación del testículo debía estar reducida únicamente al determinismo del sexo masculino.

Aunque, como se verá más adelante, el dimorfismo existente en la expresión de *AMH* entre machos y hembras está bastante bien estudiado, no está claro cómo son reducidos los niveles de esta hormona en las células de Sertoli post-natales. En este sentido, se ha sugerido que FOG2 podría llevar a cabo esta función, debido a que niveles altos de esta proteína causan un descenso notable en la actividad del promotor de *AMH* en cultivos primarios de células de Sertoli (Tremblay *y col.*, 2001). Asimismo, la expresión de *FOG2* en el desarrollo ovárico hace pensar en que esta proteína pueda tener un papel en la represión de *AMH* en hembras (Anttonen *y col.*, 2003).

La familia FOG también está muy conservada, habiéndose mostrado hasta ahora ser fundamental en la hematopoyesis y el desarrollo del sistema cardiovascular de invertebrados, peces, aves, anfibios y mamíferos (Deconinck *y col.*, 2000; Fossett *y col.*, 2001; Huggins *y col.*, 2001; Tevosian *y col.*, 2000; Tsang *y col.*, 1998; Walton *y col.*, 2006).

Otros genes

En los últimos años, estudios realizados en ratón han añadido nuevos candidatos a la compleja red de factores implicados en el desarrollo temprano y supervivencia de la gónada. Algunos de estos genes provocan reversión sexual cuando son retirados del genoma, como *M33*, cuya alteración causa defectos en el desarrollo gonadal, sin regresión gonadal o apoptosis, con una alta tasa de reversión sexual de macho a hembra. Este gen está involucrado en el remodelado de la cromatina, pero su función exacta en la diferenciación gonadal no se conoce aún (Katoh-Fukui *y col.*, 1998).

Una triple mutación en los genes *Ir* (*insulin receptor*), *Igf1r* (*insulin-like growth factor receptor 1*) e *Irr* (*insulin receptor-related receptor*) también provoca reversión sexual en ratones XY (Nef *y col.*, 2003). En este caso, se produce una expresión normal de *Sry* pero no se expresan los marcadores moleculares de las células de Sertoli, probablemente por una baja proliferación de las células somáticas de la cresta genital.

Lhx9 (*LIM homeobox gene 9*) codifica un factor de transcripción cuya ausencia produce fallos en la proliferación celular y regresión de las gónadas sobre los 13 dpc. Este gen podría estar implicado en la regulación de la expresión de *Sf1* o de la proliferación de las células somáticas del epitelio celómico positivas para *Sf1* (Birk *y col.*, 2000).

La proteína *Pod1* (*podocyte protein 1*) es un factor de transcripción de tipo hélice-giro-hélice que actúa en la diferenciación de los podocitos y en la organogénesis del riñón y el pulmón (Quaggin *y col.*, 1999). Se ha localizado expresión de *Pod1* en las células intersticiales de la gónada XY. Los ratones knock-out para este gen presentan gónadas poco desarrolladas y no se observa diferencia en el tracto urogenital de ambos sexos (Cui *y col.*, 2004).

Asimismo, mutaciones en el gen *Emx2* (*empty spiracles gene 2*) causan regresión de las gónadas a los 13.5 dpc, de forma similar a lo observado en los casos en los que no se expresa *Wt1*, *Sf1* y *Lhx9* (Miyamoto *y col.*, 1997).

Por último, otros genes recientemente implicados en el desarrollo gonadal son *Mro* (*maestro gene*) (Smith *y col.*, 2003), *Pn1* (*protease nexin gene 1*) (Grimmond *y col.*, 2000) y *Vn1* (*Vanin gene 1*) (Bowles *y col.*, 2000a; Grimmond *y col.*, 2000). Los tres se expresan en el primordio gonadal XY. Posteriormente, *Mro* continúa expresándose en las células de Sertoli y germinales del testículo, mientras que *Pn1* y *Vn1* se expresan exclusivamente en las células de Sertoli.

2. Antecedentes

2.3.2. Genes implicados en el determinismo del sexo y la diferenciación gonadal

En la segunda mitad del siglo XX se realizaron grandes esfuerzos encaminados a la identificación de un gen maestro responsable de la determinación del sexo en mamíferos. Estudios en ratón y humano mostraban que el determinismo masculino estaba relacionado directamente con el cromosoma Y (Ford *y col.*, 1959; Welshons y Russell, 1959; Jacobs y Strong, 1959), por lo que se propuso que en dicho cromosoma debía existir un locus responsable de inducir el desarrollo testicular. A ese hipotético gen determinante de testículo se le denominó *TDF* (*testis determining factor*) en humano y *Tdy* (*testis determining gene on the Y*) en ratón.

Una vez aceptada la existencia de *TDF*, comenzó una intensa búsqueda de posibles genes cuya expresión coincidiese con el momento de la diferenciación testicular de la gónada y cuya alteración provocase reversión sexual. En este sentido, se propusieron candidatos como el antígeno *H-Y* (*histocompatibility-Y antigen*) (Wachtel *y col.*, 1975), la secuencia repetida *BKM* (*banded krait minor satellite DNA*) (Chandra, 1984, 1985) y *ZFY* (*zinc finger Y gene*) (Page *y col.*, 1987), pero fueron rechazados debido a que no cumplían todos los requisitos para ser *TDF*.

La elaboración de mapas de delección indicó que *TDF* debía estar situado próximo al límite con la región pseudoautosómica (Guellaen *y col.*, 1984; Palmer *y col.*, 1989). De esta manera, la búsqueda finalizó en 1990 con el descubrimiento del gen *SRY* en el genoma humano (Sinclair *y col.*, 1990) y en el de ratón (Gubbay *y col.*, 1990). El análisis de hembras XY con el gen *SRY* mutado (Berta *y col.*, 1990; Jager *y col.*, 1990; Harley *y col.*, 1992; Hawkins *y col.*, 1992) y la obtención de ratones transgénicos XX con fenotipo masculino (Koopman *y col.*, 1991), a los que se les había insertado un fragmento de 14 *Kb* que incluía a *Sry*, confirmó que *SRY* equivalía efectivamente a *TDF*.

SRY

El gen *SRY* pertenece a la familia génica *SOX* (*SRY-related HMG box*), cuyos miembros desempeñan un papel fundamental en la organogénesis de vertebrados (Wegner, 1999). Los genes *SOX* codifican factores de transcripción que se caracterizan por presentar un dominio de unión al ADN de 79 aminoácidos conocido como caja HMG (*high-mobility group*) (Sinclair *y col.*, 1990) que tiene una gran homología con el de proteínas no histónicas de alta movilidad asociadas al ADN (Jantzen *y col.*, 1990). Esta familia génica está a su vez subdividida en 12 grupos en función de homologías adicionales fuera de la caja HMG (Bowles *y col.*, 2000b).

La proteína SRY está presente sólo en mamíferos y presenta una localización nuclear (Poulat *y col.*, 1995; Salas-Cortes *y col.*, 1999). La caja HMG de

2.3. Control genético del sexo

SRY se une a la secuencia consenso (A/T)AACAA(T/A) (Harley *y col.*, 1994; Pollock y Treisman, 1990), induciendo una curvatura en el ADN que oscila entre 60° en humano y 85° en ratón (Ferrari *y col.*, 1992; Giese *y col.*, 1992, 1994). Se han identificado dos señales de localización nuclear (NLS) situadas a ambos extremos de la caja HMG que están conservadas en otros miembros de la familia SOX y que podrían intervenir en el transporte de la proteína a través de la membrana nuclear (Li *y col.*, 2001; Sudbeck y Scherer, 1997). El dominio NLS del extremo carboxilo (C-NLS) se une a la importina β (Forwood *y col.*, 2001), mientras que el que se encuentra en el extremo amino (N-NLS) se une a la calmodulina (Harley *y col.*, 1996; Sim *y col.*, 2005). Aunque la caja HMG está muy conservada en los mamíferos, el resto de la proteína SRY no presenta homología entre las diferentes especies, incluso aunque estén muy emparentadas (Koopman, 1999).

En ratón, *Sry* se expresa en una estrecha ventana temporal. Este gen comienza a expresarse a los 10.5 dpc en las células somáticas (pre-Sertoli) de la cresta genital y alcanza un pico de expresión a los 11.5 dpc, coincidiendo con el comienzo de la diferenciación de las células de Sertoli. Esta expresión se mantiene hasta los 12.5 dpc, momento en el cual disminuye rápidamente hasta desaparecer (Hacker *y col.*, 1995; Jeske *y col.*, 1995; Koopman *y col.*, 1990). Se ha observado que la expresión de *Sry* en ratón ocurre desde el centro hacia los polos del primordio gonadal, en una onda dinámica a través del eje antero-posterior (Bullejos y Koopman, 2001).

En humanos, la expresión de *SRY* se observa por primera vez en el primordio gonadal XY a los 41 dpo, detectándose un pico durante el periodo en el que ocurre la determinación sexual masculina, sobre los 44 dpo (sexta semana de gestación). Al contrario que en ratón, los transcritos de *SRY* persisten a bajos niveles durante el desarrollo embrionario, localizándose en el interior de los núcleos de las células de Sertoli en la décimo octava semana de gestación (Hanley *y col.*, 2000).

Con respecto a su regulación, se sabe que las proteínas FOG2, GATA4 y la isoforma +KTS de WT1 están implicadas de alguna manera la modulación transcripcional o post-transcripcional de *SRY* (Hammes *y col.*, 2001; Tevosian *y col.*, 2002). Por otro lado, el control de la translocación de SRY al núcleo vía importina β y calmodulina debe ser esencial, puesto que mutaciones en los dominios NLS producen reversión sexual en individuos XY (Forwood *y col.*, 2001; Harley *y col.*, 2003; Sim *y col.*, 2005). También se ha propuesto que la actividad de unión al ADN de la caja HMG está regulada mediante fosforilación por medio de la quinasa A dependiente de AMPc (Desclozeaux *y col.*, 1998). Estudios recientes muestran que la proteína SRY interacciona con la histona acetiltransferasa p300 (HAp300) y la histona desacetilasa 3 (HDAC3) *in vitro* (Thevenet *y col.*, 2004). Ambas proteínas se expresan en las células somáticas de la cresta genital de humano y ratón a la misma vez que *SRY*, por lo que podría pensarse que SRY, además,

2. Antecedentes

está regulado por un sistema de acetilación/desacetilación.

En relación con la función de *SRY*, su patrón de expresión es coherente con el de un gen regulador maestro que pone en marcha la cascada génica implicada en la diferenciación testicular; no obstante, a pesar de que ha pasado ya más de una década desde su identificación, aún no se conoce cómo actúa exactamente y cuales son sus posibles dianas directas. Estudios de expresión de genes en células somáticas de la cresta genital revelan una extensa red de candidatos a ser regulados por *SRY*, como *SOX9*, *DHH* (*desert hedgehog*), *FGF9* (*fibroblast growth factor 9*) y *PGDS* (*prostaglandin D synthase*) (Beverdam y Koopman, 2006). Algunos autores han descrito una posible cooperación entre *SRY* y *WT1*, de forma que ambas proteínas formarían un complejo que permitiría a *SRY* realizar su función como regulador de la transcripción (Matsuzawa-Watanabe *y col.*, 2003). Asimismo, los marcados efectos que causa *SRY* en la estructura del ADN (Werner *y col.*, 1995) sugieren a otros autores que esta proteína podría actuar permitiendo la unión y el acceso de un complejo activador de la transcripción de genes implicados en el desarrollo testicular a su diana en el ADN (Bewley *y col.*, 1998). Este complejo podría estar formado por las proteínas *KRAB-0* (*Kruppel associated box-0*), *KAP1* (*KRAB-associating protein 1*) y *HP1* (*heterochromatin protein 1*) (Oh *y col.*, 2005). La propiedad de *SRY* de producir curvatura en el ADN es fundamental en su papel como factor determinante de testículo, debido a que las mutaciones que la alteran resultan en casos de reversión sexual en humanos (Pontiggia *y col.*, 1994).

Aunque se han encontrado transcritos de *SRY* en diferentes tejidos fetales y adultos (Capel *y col.*, 1993; Clepet *y col.*, 1993; Salas-Cortes *y col.*, 1999), el hecho de que los individuos XY con mutaciones en este gen presenten un fenotipo femenino normal hace suponer que su actuación se limita únicamente al determinismo del sexo masculino.

SOX9

Otro de los genes *SOX* más estudiado es *SOX9* que, junto a *SOX8* y *SOX10*, pertenece al subgrupo E (Bowles *y col.*, 2000b). Mutaciones en heterocigosis de *SOX9* producen displasia campomélica (CD, *campomelic dysplasia*), una osteocondrodisplasia caracterizada por una malformación de los huesos largos y deficiencias en diversos órganos como oído interno, cerebro, páncreas y corazón (Houston *y col.*, 1983; Mansour *y col.*, 1995, 2002). Se observó que un alto porcentaje de los pacientes XY con CD presentaban también defectos en el desarrollo testicular e incluso reversión sexual completa (Houston *y col.*, 1983). La localización cromosómica de los loci de la displasia campomélica (CMPD1) y la reversión sexual asociada (SRA1) fueron descritos en la misma región cromosómica en humanos (17q24.3-q25.1) por Tommerup *y col.* (1993). Al cartografiar esta región se

2.3. Control genético del sexo

identificó el gen *SOX9* como el responsable de ambos síndromes (Foster *y col.*, 1994; Wagner *y col.*, 1994). Posteriormente, se encontraron duplicaciones cromosómicas que contenían el locus de *SOX9* en pacientes XX con reversión sexual (Huang *y col.*, 1999), lo que confirmó la hipótesis del papel de *SOX9* en los procesos de determinación del sexo en humanos.

El gen *SOX9* humano posee dos intrones. La proteína SOX9 tiene un tamaño de 509 aminoácidos y su estructura es la típica de un factor de transcripción con un dominio de unión al ADN, la caja HMG, situado entre los aminoácidos comprendidos en las posiciones 104–182 y tiene una homología del 71 % con la caja HMG del SRY. En el extremo carboxi-terminal de la proteína hay una región rica en prolina, glutamina y serina, similar a los dominios de trans-activación de los factores de transcripción (Foster *y col.*, 1994). Como en SRY, la proteína SOX9 contiene dos dominios NLS y, además, una señal de exportación nuclear (NES) dependiente de CRM1 (*chromosomal region maintenance 1 protein*). Estos dominios también podrían actuar en el transporte de la proteína a través de la membrana nuclear (Gasca *y col.*, 2002; Sudbeck y Scherer, 1997). La caja HMG, al igual que la de SRY y otras proteínas SOX, se une a las secuencias consenso AACAAT y AACAAAG, pero también a las secuencias ATGAAT y CACAAT que están en el intensificador específico de condrocito en el primer intrón del gen *COL2A1* de colágeno de tipo II humano (Bell *y col.*, 1997).

SOX9 es un factor de transcripción que interviene en la determinación sexual, el desarrollo de diferentes órganos y la condrogénesis, actuando en diferentes pasos de la diferenciación del cartílago (Akiyama *y col.*, 2002; Mansour *y col.*, 2002). Se ha identificado un tercer dominio conservado, anterior a la caja HMG, que es requerido para la dimerización de SOX9 en presencia de intensificadores en genes involucrados en la diferenciación de los condrocitos. Al parecer, la dimerización cooperativa de SOX9 es necesaria para activar promotores de la condrogénesis pero no interviene en el determinismo del sexo. Por tanto, mutaciones en este dominio podrían explicar los casos de CD sin reversión sexual (Bernard *y col.*, 2003; Sock *y col.*, 2003).

En relación con el papel de *SOX9* en el determinismo del sexo, mutaciones en heterocigosis de este gen en humanos causan reversión sexual parcial o completa en individuos XX (Foster *y col.*, 1994; Wagner *y col.*, 1994), no habiéndose descrito casos de mutaciones en homocigosis. En ratón, sin embargo, la pérdida de una dosis de *Sox9* no provoca reversión sexual aunque los heterocigotos no son viables (Bi *y col.*, 2001). Embriones generados con mutaciones en homocigosis mueren poco después de los 11,5 dpc por defectos cardiovasculares (Akiyama *y col.*, 2004), por lo que para estudiar la haploinsuficiencia de *Sox9* en ratón se han desarrollado estudios con mutantes condicionados, en los que no se expresa *Sox9* en las gónadas, produciéndose reversión sexual completa en ratones XX, probablemente por la no regulación

2. Antecedentes

de genes de la ruta femenina como *Wnt4* y *Foxl2* (Barrionuevo *y col.*, 2006).

Estos datos sugieren que *SOX9* es uno de los primeros genes que se activan en el desarrollo gonadal y que, al igual que *SRY*, es suficiente para inducir una determinación del sexo masculina y producir reversión sexual completa en hembras (Bishop *y col.*, 2000; Huang *y col.*, 1999; Vidal *y col.*, 2001). El hecho de que se exprese poco después de que lo haga *SRY* en el mismo tipo celular, las células pre-Sertoli (Kent *y col.*, 1996), ha llevado a pensar en la posibilidad de que *SRY* regule directa o indirectamente a *SOX9* (Canning y Lovell-Badge, 2002), aunque todavía no se ha determinado la relación existente entre ambos genes. Recientemente, se ha comprobado que WT1 podría estar implicado en la regulación de la expresión de *SOX9* en las primeras etapas del desarrollo gonadal (Gao *y col.*, 2006) y que *FGF9* ayudaría a mantener esta expresión después de la determinación sexual (Kim *y col.*, 2006). Por otro lado, WNT4 parece actuar como inhibidor de *SOX9* (Kim *y col.*, 2006).

Existe gran controversia sobre la función concreta de SOX9 en las etapas tempranas del desarrollo gonadal, siendo varias las hipótesis que se barajan actualmente. Estudios en gónadas de ratón y humanas muestran una localización citoplasmática de la proteína en células somáticas del primordio gonadal de ambos sexos (sexta semana de gestación en humano y 10,5 dpc en ratón) que, posteriormente, pasa a ser nuclear en la gónada XY mientras que en la gónada XX desaparece, manteniéndose este patrón hasta la edad adulta (de Santa Barbara *y col.*, 2000; Kent *y col.*, 1996; Morais da Silva *y col.*, 1996). Según estos estudios, la regulación de la distribución subcelular de SOX9 sería esencial en el determinismo del sexo y estaría controlada por los dominios NLSs y NES (Gasca *y col.*, 2002; Sudbeck y Scherer, 1997). En los estadios tempranos del desarrollo gonadal, la proteína SOX9 sería importada al núcleo de las células pre-Sertoli por medio de un sistema Ca-Calmodulina y un receptor de membrana, la importina β . En el primer caso, el complejo SOX9/Calmodulina se formaría mediante el NLS del extremo amino y produciría un cambio conformacional en la proteína que facilitaría su importación en el núcleo. Por otro lado, el NLS del extremo carboxilo sería reconocido por la importina β que transportaría a SOX9 al interior del compartimento nuclear. Ambos mecanismos contribuirían de igual manera en este proceso (Argentaro *y col.*, 2003; Preiss *y col.*, 2001). Estudios recientes muestran que la importación nuclear vía importina β se induciría por medio del sistema prostaglandina D₂ (PGD₂), que fosforilaría a la proteína SOX9 mediante activación de la quinasa de proteína A dependiente de AMPc (Malki *y col.*, 2005b). En este sentido, la pérdida de la translocación celular produciría un fenotipo de reversión sexual en gónadas XY, de tal manera que para que se active la ruta masculina SOX9 debería pasar al núcleo, mientras que la ruta femenina requeriría una permanencia de esta proteína en el citoplasma (Argentaro *y col.*, 2003). Aunque los mecanismos que retendrían la proteína en los distintos compartimentos celulares no se han descrito todavía, Malki *y col.*

2.3. Control genético del sexo

(2005a) han observado una reorganización del citoesqueleto y una interacción fosfodependiente con la proteína SOX9 en las células Sertoli. Según este estudio, la tubulina se dispone en el polo basal de las células Sertoli, mientras que queda dispersa en el resto de líneas celulares así como en gónadas XX.

Por el contrario, otros estudios no detectan localización citoplasmática de SOX9 en ningún estadio y proponen que ésta solo ocurre en el núcleo de las células pre-Sertoli una vez que ya han tomado esa vía de desarrollo, en la séptima semana de gestación en humano y 11,5 dpc en ratón (Sekido *y col.*, 2004; Wilhelm *y col.*, 2005).

Adams y McLaren (2002) observaron que PGD₂ masculiniza parcialmente gónadas femeninas en cultivos debido, probablemente, a que las células gonadales XX de tipo epitelial son forzadas a desarrollarse como células de Sertoli. Basándose en lo anterior, se ha desarrollado un modelo mediante el cual SRY podría activar la expresión de SOX9 vía PGD₂ de manera paracrina e incluso autocrina, lo que apoyaría algunas observaciones en las que se detecta presencia de SOX9 sin expresión previa de SRY (Wilhelm *y col.*, 2005). Esta función paracrina podría ser reforzada por las células germinales, las cuales también expresan PGD₂ (Adams y McLaren, 2002).

En lo referente al desarrollo del testículo, SOX9 podría actuar como activador transcripcional en las células de Sertoli regulando la expresión de otros genes implicados en el determinismo del sexo y la diferenciación sexual, como AMH, en cuya activación podría interactuar con SF1 (Arango *y col.*, 1999; Chaboissier *y col.*, 2004; De Santa Barbara *y col.*, 1998), y SOX8 que, a su vez, reforzaría la expresión de SOX9 en un proceso de retroalimentación positiva (Chaboissier *y col.*, 2004). Se ha observado que la expresión de Sry continúa en gónadas XY de ratón deficientes en Sox9 (Chaboissier *y col.*, 2004; Sekido *y col.*, 2004), sugiriéndose que la proteína Sox9 podría ser la responsable de la rápida desaparición de Sry sobre los 12,5 dpc (Wilhelm *y col.*, 2005).

Recientemente, Notarnicola *y col.* (2006) han propuesto una posible influencia de Sox9 en el desarrollo del folículo en el ovario adulto de ratón, fundamentándose en la presencia de esta proteína en el núcleo de las células de la teca interna.

SOX9 es un gen altamente conservado en mamíferos, aves, reptiles y peces (Chiang *y col.*, 2001; Morais da Silva *y col.*, 1996; Pask *y col.*, 2002; Spotila *y col.*, 1998). En este sentido, fue uno de los primeros genes descritos con un papel conservado en especies con mecanismos de determinación sexual tanto cromosómica como ambiental (Spotila *y col.*, 1998).

En aves y reptiles, al igual que en mamíferos, SOX9 se expresa durante el desarrollo gonadal en el testículo, quedando reprimido en el ovario (Morais da Silva *y col.*, 1996; Moreno-Mendoza *y col.*, 1999); no obstante, aunque actúa en múltiples puntos en la diferenciación testicular, parece ser que sólo algunas de esas funciones han sido conservadas durante la evolución; por ejemplo, la

2. Antecedentes

expresión del gen *AMH* está regulada por *SOX9* en mamíferos, pero en el pollo y el caimán *SOX9* se expresa después de que lo haga *AMH* (Sinclair *y col.*, 2002).

En peces teleósteos se han aislado varios ortólogos de *SOX9* con diferente patrón de expresión tanto espacial como temporal; por ejemplo, en el pez cebra, *SOX9a* se expresa en el testículo mientras que *SOX9b* lo hace en el ovario (Chiang *y col.*, 2001) y, en medaka, se ha identificado un ortólogo que no está implicado en la determinación del sexo pero podría estar relacionado con el mantenimiento del desarrollo del testículo (Nakamoto *y col.*, 2005).

De Falco *y col.* (2003) han detectado una posible influencia de *Sox100B*, un gen ortólogo de *SOX9* que presenta una homología del 80% en la caja HMG, en el desarrollo del testículo de *D. melanogaster*, lo que supone un ejemplo más de la importancia que ha mantenido este gen durante la evolución.

DAX1

En humanos, duplicaciones de una región de 160 Kb en el brazo p del cromosoma X provocan disgenesia gonadal y desarrollo de genitales externos ambiguos o femeninos (Bardoni *y col.*, 1994). Esta situación es conocida como reversión sexual sensible a dosis (DSS, *dosage-sensitive sex-reversal*). Alternativamente, deleciones de este locus o mutaciones puntuales en su interior causan hipoplasia adrenal congénita ligada al X (AHC, *X-linked adrenal hypoplasia congenita*), una enfermedad que produce insuficiencia adrenal e hipogonadismo hipogonadotrópico en individuos XY (Zanaria *y col.*, 1994). Al analizar esta región se identificó un gen implicado en estas anomalías al que se le denominó *DAX1* (*DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1*) (Muscatelli *y col.*, 1994; Zanaria *y col.*, 1994).

DAX1, también conocido como *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily type 0, group B, member 1 gene*), es un gen ligado al sexo que se localiza en la banda Xp21 (Bardoni *y col.*, 1994; Zanaria *y col.*, 1994). Está compuesto por 2 exones que codifican una proteína de 470 aminoácidos, la cual pertenece a la familia de los receptores nucleares (Bae *y col.*, 1996). En el extremo carboxi-terminal, la proteína presenta un dominio de unión a ligando (LBD, *ligand-binding domain*) similar al del resto de los miembros de la familia. En la región amino-inicial existe un dominio de unión al ADN, formado por 3.5 repeticiones de una secuencia de 65-67 aminoácidos, que contiene dos dedos de cinc (Guo *y col.*, 1996; Lalli *y col.*, 2000). Además, la proteína *DAX1* tiene dos dominios silenciadores de la transcripción situados a ambos lados del LBD (Lalli *y col.*, 1997).

Se han identificado dos correpresores, NCoR (*nuclear co-repressor*) y Alien, que podrían interaccionar con estas regiones silenciadoras para formar complejos implicados en la inactivación de promotores (Altincicek *y col.*, 2000; Crawford *y col.*, 1998), de los cuales Alien presenta una localización testicular

2.3. Control genético del sexo

(Schaefer *y col.*, 1999). Por otro lado, DAX1 también podría tener un papel en la regulación post-transcripcional, uniéndose directamente al ARNm y a los polirribosomas (Lalli *y col.*, 2000).

La expresión de *DAX1* está íntimamente relacionada con la de *SF1*. Estudios en ratón muestran una expresión conjunta de ambos genes en los tejidos en desarrollo y adultos de las glándulas adrenales, las gónadas, el hipotálamo y la glándula pituitaria (Ikeda *y col.*, 1996), indicando que DAX1 también interviene en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En relación con su actividad durante la gonadogénesis, *Dax1* se expresa en el primordio gonadal de ambos sexos poco después de que lo haga *Sf1*. En la gónada XY, su expresión aumenta significativamente en las células de Sertoli a los 12.5 dpc. Esta expresión disminuye rápidamente pero vuelve a incrementarse en las células intersticiales entre los 13.5 y los 17.5 dpc. En la gónada XX, la expresión de *Dax1* aumenta entre los 12.5 y los 14.5 dpc y después comienza a descender (Ikeda *y col.*, 2001).

En humanos, se detecta una expresión sutil de *DAX1* en la cresta genital tanto XY como XX, que continúa constante mientras la gónada permanece indiferenciada. En la diferenciación testicular, esta expresión se localiza principalmente en las células de Sertoli de los cordones testiculares en formación a los 52 dpo. De igual forma, *DAX1* se expresa en las células somáticas del ovario en desarrollo. Estos bajos niveles continúan observándose en el testículo y el ovario fetales a las 18 y 15 semanas de gestación respectivamente (Hanley *y col.*, 2000).

Se ha propuesto que la proteína WNT4 puede estimular la expresión de *DAX1*, de forma directa o indirecta, debido a que se ha encontrado sobreexpresión de este gen en individuos que portan una duplicación de *WNT4* (Jordan *y col.*, 2001; Mizusaki *y col.*, 2003). Además, algunas isoformas -KTS de *WT1* parecen estar implicadas en la activación del promotor de *DAX1* durante las etapas tempranas de la gonadogénesis (Kim *y col.*, 1999).

Se ha comprobado que DAX1 interviene en la esteroidogénesis. Estudios *in vitro* indican que esta proteína antagoniza la función activadora de SF1 sobre genes implicados en la síntesis de hormonas esteroideas (Gurates *y col.*, 2003). En este sentido, los casos de AHC podrían estar causados por mutaciones en el dominio LBD del extremo carboxilo, que provocarían una disminución de dicho efecto antagonista (Achermann *y col.*, 2001; Ito *y col.*, 1997). De la misma manera, las interacciones entre SF1 y DAX1 en el desarrollo gonadal podrían ser similares a las descritas en la esteroidogénesis. Se han realizado estudios en cultivos celulares que muestran que DAX1 reprime la cooperación entre SF1 y las proteínas WT1 y GATA4 en la activación del promotor de *AMH* (Nachtigal *y col.*, 1998; Tremblay y Viger, 2001b). Pero, aunque estos datos indican que DAX1 antagoniza la función de SF1 tanto en la esteroidogénesis como en la gonadogénesis, observaciones más recientes *in*

2. Antecedentes

vivo contradicen esta idea. Paradójicamente, estos experimentos muestran una cooperación entre ambas proteínas para activar genes de la ruta masculina en las células somáticas de la gónada XY (Park *y col.*, 2005).

El posible papel de DAX1 en el desarrollo gonadal ha estado inmerso en una gran controversia en los últimos años. En principio, el estudio de pacientes con DSS hizo que se le asignase a DAX1 una función anti-testículo. Los individuos con este síndrome tienen un cariotipo 46XY y no desarrollan testículos. Como ya se ha comentado, estos pacientes tienen duplicada una región de 160 KB en el cromosoma X. Esta región, además del gen *DAX1*, contiene genes de la familia DAM (*DSS-AHC critical interval MAGE*) que están relacionados con la familia MAGE (*melanoma antigen gene family*), cuyos miembros codifican antígenos asociados a tumores (Bardoni *y col.*, 1994). Jiménez *y col.* (1996b) propusieron una hipótesis según la cual DAX1 antagonizaría la función de SRY en una actuación dependiente de dosis. Esta idea fue apoyada por experimentos posteriores en ratones que expresaban *Dax1* a niveles muy superiores a los normales y que mostraban retraso en el desarrollo testicular y reversión sexual de macho a hembra (Swain *y col.*, 1998). No obstante, los casos de AHC ponían en duda estas afirmaciones, debido a que estos pacientes tienen delecionada una copia de *DAX1* y, aunque no muestran reversión sexual, presentan anomalías en sus testículos (Muscatelli *y col.*, 1994).

Recientemente, se han realizado cinco trabajos que han cambiado el concepto que se tenía sobre la actuación de DAX1 en el desarrollo gonadal, sugiriendo que esta proteína, lejos de ser un represor de genes de la ruta masculina, es necesaria para una correcta diferenciación testicular.

En un primer experimento, Yu *y col.* (1998) estudiaron el desarrollo gonadal en ratones que presentaban una deleción en el exón 2 de *Dax1*, el cual codifica el dominio LBD (a partir de ahora este alelo se representará con el signo -). Los machos adultos *Dax1*-/*Y* presentaban testículos más pequeños de lo normal con un pobre desarrollo del epitelio germinativo y pérdidas eventuales de células germinales. Contrariamente, las hembras homocigotas para este alelo (*Dax1*-/-) eran fértiles y mostraban un sistema reproductivo normal.

Posteriormente, Meeks *y col.* (2003a) examinaron la embriogénesis de estos mismos ratones, observando que el desarrollo testicular era normal hasta los 13.5 dpc, en donde algunos cordones testiculares aparecían desorganizados e incompletos.

En un tercer estudio, Meeks *y col.* (2003b) analizaron los efectos del alelo que contenía la deleción en ratones de la cepa *Mus musculus poschiavinus Y chromosome* (*Y^{POS}*), que portan un gen *Sry* débil (Eicher *y col.*, 1995). Estos autores observaron que los ratones *Dax1*-/*Y^{POS}* sufrían reversión sexual completa.

Dos años después, Bouma *y col.* (2005) observaron las consecuencias del

2.3. Control genético del sexo

alelo anterior en una cepa de ratones sensibles a cambios en el determinismo del sexo, denominada B6 (Eicher *y col.*, 1982, 1996; Eicher y Washburn, 1986), y en otra en la que los ratones XY desarrollan testículos en condiciones en las que los de la cepa B6 desarrollan ovarios u ovotestes, denominada D2 (Eicher *y col.*, 1996). Los ratones *Dax1*-/*Y B6* sufren reversión sexual completa, mientras que los *Dax1*-/*Y D2* desarrollan testículos anormales. La expresión de *Sox9* no está activada en los embriones *Dax1*-/*Y B6*, incluso mostrando unos niveles normales de *Sry*. El desarrollo ovárico es bloqueado en los embriones *Dax1*-/*Y B6* si se aumenta la expresión de *Sry* por adición de un constructo con múltiples copias de este gen. Además, estos investigadores han identificado un gen en la parte distal del cromosoma 4, al que han denominado *Tda1* (*testis-determining autosomal 1*), implicado en la reversión sexual de los ratones B6 XY. Estos resultados les han llevado a proponer que *Dax1* regula la expresión de *Sox9* junto a *Sry* y la nueva proteína *Tda1*.

Finalmente, Park *y col.* (2005) han analizado las consecuencias de una pérdida de función de los genes *Dax1* y *Sf1* en ratones transgénicos para una copia nula de cada uno de ellos. La pérdida de un alelo activo de *Sf1* provoca una disminución en la expresión de marcadores de las células de Sertoli, como *Dhh* y *Amh*, y de las células de Leydig fetales durante el desarrollo testicular. Sorprendentemente, una pérdida de función de *Dax1* no sólo no compensa los efectos de la heterocigosis para un alelo nulo de *Sf1*, sino que los aumenta. Basándose en estos resultados, han concluido que *Dax1* actúa sinérgicamente con *Sf1* durante la gonadogénesis masculina.

El hecho de que una sobreexpresión de *DAX1* provoque efectos similares a una baja expresión (reversión sexual en DSS y desarrollo anormal de los testículos en AHC), indica *DAX1* debe encontrarse en unos niveles adecuados para ejercer su papel correctamente. Se ha propuesto que los valores superiores e inferiores a la ventana de expresión óptima de *DAX1* alteran su función en la gonadogénesis masculina (Ludbrook y Harley, 2004). Este rango debe ser muy sensible y diferente entre distintas especies, debido a que duplicaciones de este gen causan reversión sexual en humanos y en ratón sólo provocan defectos en el desarrollo testicular (Swain *y col.*, 1998).

DAX1 también está muy conservado entre los distintos taxones de animales. Se han identificado ortólogos de este gen tanto en invertebrados (Alonso *y col.*, 2001), como en aves (Smith *y col.*, 2000), reptiles (Western *y col.*, 2000), anfibios (Sugita *y col.*, 2001), peces (Wang *y col.*, 2002) y primates (Patel *y col.*, 2001).

2. Antecedentes

WNT4

La familia génica *WNT* (*Wingless-related MMTV integration site family*) codifica una serie de proteínas de actuación local que ponen en marcha una cascada de señales de transducción cuyo último objetivo es la activación transcripcional de los genes que regulan (Dale, 1998). Estas proteínas intervienen en diversos procesos del desarrollo, como la gastrulación, el establecimiento de los ejes del embrión, la polaridad celular, el mantenimiento y diferenciación de células madre y el desarrollo de diversos órganos (Cadigan y Nusse, 1997).

El gen *WNT4* está situado en el locus 1p36.12 del cromosoma 1 humano (Peltoketo *y col.*, 2004). Está formado por cuatro intrones y cinco exones que codifican una proteína de unos 350 aminoácidos (Jordan *y col.*, 2001). Mutaciones en esta región cromosómica han sido asociadas a varios tipos de tumores (Yang *y col.*, 2001). Además, pacientes que portan duplicaciones de este locus muestran diferentes anomalías en el desarrollo sexual, desde criptorquidia a reversión sexual (Elejalde *y col.*, 1984; Jordan *y col.*, 2001; Wieacker *y col.*, 1996).

WNT4 interviene en muchos procesos de diferenciación y su deficiencia causa anomalías en el desarrollo de los riñones, la glándula pituitaria, las glándulas mamarias y en el sistema reproductivo tanto masculino como femenino. En el desarrollo del sistema genitourinario, esta proteína es necesaria para la nefrogénesis del riñón metanéfrico y está específicamente involucrada en la formación de los conductos de Müller y el desarrollo del ovario (Stark *y col.*, 1994; Vainio *y col.*, 1999). Como se ha comentado anteriormente, hay estudios que indican que WNT4 podría activar el promotor de *DAX1* de forma directa o indirecta porque pacientes que tienen duplicada una región que contiene a *WNT4* presentan niveles muy elevados de *DAX1* (Jordan *y col.*, 2001; Mizusaki *y col.*, 2003).

En la gonadogénesis de ratón, *Wnt4* se expresa antes de la aparición de la cresta genital en el mesénquima mesonéfrico. Posteriormente, esta expresión se localiza en las células somáticas del primordio gonadal de ambos sexos hasta los 11.5 dpc. A partir de ese momento, los niveles de *Wnt4* son incrementados en la gónada XX y disminuidos en la gónada XY. También se ha observado expresión de *Wnt4* en el conducto de Müller a lo largo de todo el desarrollo fetal (Vainio *y col.*, 1999).

Con respecto a la regulación de su expresión en la gónada, el promotor de *WNT4* podría ser activado por isoformas -KTS de WT1 (Sim *y col.*, 2002) y algunos miembros de la familia de proteínas supresoras de tumores P53 (Osada *y col.*, 2006). Asimismo, hay evidencias que indican que SOX9 inhibe a *WNT4*, puesto que se ha detectado expresión de *Wnt4* a los 12.5 y 15.5 dpc en la gónada XY de ratones transgénicos condicionados que carecen de *Sox9* (Barrionuevo *y col.*, 2006). Además, se ha observado que una expresión

2.3. Control genético del sexo

ectópica de *Sox9* en la gónada XX produce un descenso de los niveles de *Wnt4* (Qin y Bishop, 2005).

Para analizar la función concreta de WNT4 en el desarrollo gonadal, se obtuvieron ratones XY transgénicos que presentaban una sobreexpresión de *Wnt4*. En estos ratones se aprecia un descenso en los niveles de testosterona y un desarrollo anormal de la vasculatura del testículo, aunque no llegan a sufrir reversión sexual (Jordan *y col.*, 2003; Jeays-Ward *y col.*, 2003). Según estos trabajos, WNT4 podría actuar suprimiendo la migración de las células endoteliales al interior de la gónada XX (Jeays-Ward *y col.*, 2003) y la esteroidogénesis, bien por represión de *SF1* (Jordan *y col.*, 2003) o bien por inhibición de la migración de las células precursoras esteroidogénicas al interior del ovario (Jeays-Ward *y col.*, 2003).

Por otro lado, ratones homocigotos para un alelo nulo de *Wnt4* mueren por insuficiencia renal poco después del nacimiento mostrando varios defectos en el desarrollo ovárico. Las hembras presentan ovarios redondeados sin cubierta que contienen pocos oocitos porque éstos sufren un proceso de degeneración. Tanto las gónadas como los conductos sexuales de estas hembras muestran un fenotipo masculinizado. El conducto de Müller degenera completamente, mientras que el de Wolff continúa el desarrollo (Vainio *y col.*, 1999). Se ha detectado expresión de *Sox9* y *Fgf9* en la gónada XX de estos ratones (Kim *y col.*, 2006). De la misma manera, se observa un aumento en la expresión de *Wnt4* en ratones homocigotos para un alelo nulo de *Sox9* (Barrionuevo *y col.*, 2006) y *Fgf9* (Kim *y col.*, 2006), habiéndose propuesto que *Fgf9* y *Wnt4* actúan como señales antagónicas durante el proceso de determinación del sexo (Kim *y col.*, 2006).

Todos estos resultados, junto con el hecho de que *WNT4* sea reprimido en la gónada XY en el momento de la determinación sexual, hacen pensar que este gen debe estar involucrado en las rutas de diferenciación femenina y/o en la inhibición de la diferenciación masculina. No obstante, hay estudios que apuntan hacia un posible papel de WNT4 en las etapas tempranas del desarrollo testicular, concretamente en la diferenciación de las células de Sertoli, actuando entre la expresión de *SRY* y *SOX9* (Jeays-Ward *y col.*, 2004).

WNT4 es homólogo del gen *Wingless* de *Drosophila*, el cual interviene en la regulación de la motilidad celular durante el desarrollo ovárico de este díptero (Cohen *y col.*, 2002). En vertebrados no mamíferos, se han estudiado ortólogos de *WNT4* en el pez cebra, la rana africana y el pollo (Hollyday *y col.*, 1995; Ungar *y col.*, 1995). En esas especies, *WNT4* se expresa en el cerebro en desarrollo y parece desempeñar un papel crucial en la inhibición del movimiento celular durante la embriogénesis.

2. Antecedentes

FGF9

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factors*) forman una familia de proteínas que desempeñan diversas funciones en una gran variedad de procesos biológicos, como la proliferación, diferenciación, supervivencia y migración de muchos tipos celulares y la angiogénesis. Para llevar a cabo su función, los FGF interactúan con la heparina y se unen a receptores específicos (FGFRs, *fibroblast growth factors receptors*) en las membranas celulares, provocando una cascada de señales intracelulares (Ornitz y Itoh, 2001).

Uno de los miembros de esta familia es FGF9, cuyo gen se localiza en la región cromosómica 13q11–12 del cromosoma 13 humano (Mattei *y col.*, 1995) y codifica una proteína de 208 aminoácidos (Miyamoto *y col.*, 1993).

Durante la embriogénesis de ratón, *Fgf9* se expresa en una amplia variedad de tejidos, entre los que se incluyen el mesodermo intermedio, el miocardio ventricular, la pleura pulmonar, los mioblastos, las neuronas motoras de la espina dorsal y el bulbo olfativo (Colvin *y col.*, 1999). En relación con su papel en el desarrollo gonadal, se ha detectado expresión de *Fgf9* en el primordio gonadal indiferenciado. A partir de los 11.5 dpc, esta expresión desaparece en la gónada XX y se incrementa en la gónada XY poco después de que se exprese *Sry*, localizándose en las células somáticas de los cordones testiculares (Kim *y col.*, 2006; Schmahl *y col.*, 2004).

Como se ha indicado en el apartado anterior, recientemente se ha propuesto que FGF9 y WNT4 desempeñan un papel importante en la determinación sexual actuando de manera antagónica. Esta hipótesis se basa en trabajos recientes que muestran que *Wnt4* podría reprimir a *Fgf9*, puesto que se ha detectado expresión de este gen en la gónada XX de ratones homocigotos para un alelo nulo de *Wnt4* (Kim *y col.*, 2006).

Ratones transgénicos que carecen de *Fgf9* mueren poco después del nacimiento con defectos en los pulmones, observándose reversión sexual en los animales XY (Colvin *y col.*, 2001a,b). En estos ratones, la diferenciación testicular es abortada sobre los 12.5 dpc debido a que las células pre-Sertoli no logran proliferar y diferenciarse. Esta situación hace que no se produzca migración celular desde el mesonefros e impide la formación de los cordones testiculares (Colvin *y col.*, 2001a; Schmahl *y col.*, 2004). Se ha comprobado que la ausencia de *Fgf9* no afecta a la expresión de *Sry* ni a su actuación sobre *Sox9*, pero sí influye en el mantenimiento de los niveles de *Sox9* después de la determinación sexual (Kim *y col.*, 2006). Además, se ha observado que en estos mutantes prácticamente la totalidad de las células germinales sufren apoptosis y hay expresión de marcadores del desarrollo ovárico en la gónada XY a los 12.5 dpc (DiNapoli *y col.*, 2006). Todos estos datos han llevado a pensar que *FGF9* es un gen esencial para el desarrollo testicular, que es necesario para la proliferación y diferenciación de las células de Sertoli y la

2.3. Control genético del sexo

supervivencia de las células germinales XY (DiNapoli *y col.*, 2006; Schmahl *y col.*, 2004). De esta forma, FGF9 podría actuar favoreciendo la continuidad de la proteína SOX9 en las células de Sertoli y reprimiendo la expresión de genes de la ruta femenina como *WNT4* (Kim *y col.*, 2006).

Las proteínas FGF están muy conservadas entre los metazoos. Estos factores están presentes en invertebrados y en todos los grupos de vertebrados (Itoh y Ornitz, 2004). Se han identificado ortólogos de *FGF9* en el pollo, relacionándose con la función de las neuronas motoras (Garces *y col.*, 2000) y en el anfibio *Rana rugosa*, en donde interviene en el desarrollo gonadal (Yamamura *y col.*, 2005).

PDGFR α

Los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factors*) son una familia de señales moleculares que fueron identificadas por primera vez como factores del suero que estimulaban la proliferación de las células mioides de las arterias (Ross *y col.*, 1978). Desde entonces, han sido ampliamente estudiados mostrando ser fundamentales en diversos procesos biológicos como la proliferación, supervivencia y migración celular y la deposición de la matriz extracelular. Esta familia está compuesta por cuatro ligandos, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C y PDGF-D, que pueden formar diferentes combinaciones de homo y heterodímeros que se unen a uno de los dos receptores PDGFR (*platelet-derived growth factors receptor*), PDGFR α o PDGFR β . Generalmente, los ligandos PDGF son sintetizados por células epiteliales o endoteliales, mientras que los receptores se suelen encontrar en las células mesenquimáticas. La proliferación y migración de las células mesenquimáticas en respuesta a estos factores contribuye a la morfogénesis e integridad de diversos órganos (Hoch y Soriano, 2003).

Desde hace tiempo se sabe que tanto los PDGFs como los PDGFRs están implicados en el desarrollo testicular (Gnessi *y col.*, 1995). Ratones transgénicos que carecen de *Pdgf-a* muestran testículos muy pequeños con pocas células de Leydig adultas y arresto espermatogénico al mes del nacimiento (Gnessi *y col.*, 2000). Asimismo, se ha visto que los homodímeros de PDGF-A y PDGF-B así como los heterodímeros de estos dos factores intervienen en la migración de células mesoneféricas hacia la gónada XY (Brennan *y col.*, 2003; Ricci *y col.*, 2004).

El gen *PDGFR α* codifica un receptor que puede unirse a los ligandos homodímeros PDGF-A, PDGF-B y PDGF-C así como al heterodímero PDGF-AB. Este receptor es esencial en la proliferación de las células mesenquimáticas durante el desarrollo temprano del intestino, la piel, los pulmones, los riñones y las gónadas (Brennan *y col.*, 2003; Karlsson *y col.*, 1999, 2000; Li y Hoyle, 2001; Sun *y col.*, 2000). En todos esos casos, *PDGFR α* es expresado en el mesénquima y su función es activada por señales paracrinas

2. Antecedentes

locales procedentes de células epiteliales (Hoch y Soriano, 2003).

Durante la gonadogénesis de ratón, *Pdgfra* se expresa en el primordio gonadal de ambos sexos a los 11.5 dpc, pero su expresión aumenta rápidamente en las células intersticiales de la gónada XY y desciende en la gónada XX a los 12.5 dpc (Brennan *y col.*, 2003; Ricci *y col.*, 2004).

Ratones homocigotos para un alelo nulo de *Pdgfra* mueren durante la gestación después del periodo de determinación del sexo, por lo que se puede analizar el efecto de este gen en el desarrollo gonadal temprano. Los embriones XY muestran una alta desorganización de la vasculatura en sus gónadas, observándose que los vasos sanguíneos celómicos son irregulares y apenas tienen ramificaciones. Además, el desarrollo testicular está retardado y se produce un desarrollo anómalo de los cordones testiculares y las células intersticiales, incluyendo a las células de Leydig y las mioides peritubulares. Estas observaciones indican que PDGFR α es necesario para la migración desde el mesonefros y el desarrollo tanto de la vasculatura como del compartimento intersticial del testículo. Sorprendentemente, en el transcurso de esta migración, PDGFR α sólo está presente en las células de la gónada, no detectándose expresión en las células mesonéfricas. Este hecho sugiere que las señales PDGF no inducen directamente la migración celular, aunque si son necesarias como segundos mensajeros para que ésta se lleve a cabo (Brennan *y col.*, 2003).

Con respecto a su papel en la diferenciación de las células de Leydig, se piensa que PDGFR α podría actuar paralelamente a la proteína DHH (*desert hedgehog*) (Brennan *y col.*, 2003).

Las funciones que los PDGFs y sus receptores desempeñan en los mamíferos están conservadas tanto en invertebrados como en el resto de vertebrados (Hoch y Soriano, 2003). Se ha comprobado que la migración celular que ocurre en el desarrollo testicular temprano también está controlada por estos factores en aves (Smith *y col.*, 2005).

DMRT1

La familia génica *DMRT* (DSX- and MAB3-related transcription factors) está formada por un grupo de genes que intervienen en la determinación del sexo y el desarrollo gonadal de varios filos de metazoos. Esta familia fue el primer caso que se describió de genes reguladores del sexo tanto en vertebrados como invertebrados (Volf *y col.*, 2003; Zarkower, 2001).

Las proteínas DMRT son factores de transcripción que comparten un dominio de unión al ADN, similar al dedo de cinc, denominado dominio DM, el cual fue identificado por primera vez en las proteínas MAB-3 de *C. elegans* y doublesex (DSX) de *D. melanogaster* (Raymond *y col.*, 1998).

Deleciones subteloméricas en el brazo p del cromosoma 9 humano han

2.3. Control genético del sexo

sido asociadas con reversión sexual y disgenesia gonadal en individuos XY (Bennett *y col.*, 1993; Flejter *y col.*, 1998; Guioli *y col.*, 1998; Hoo *y col.*, 1989; Huret *y col.*, 1988; McDonald *y col.*, 1997; Muroya *y col.*, 2000; Ogata *y col.*, 1997; Ounap *y col.*, 2004; Pfeiffer *y col.*, 1999; Privitera *y col.*, 2005; Raymond *y col.*, 1999b; Shan *y col.*, 2000; Veitia *y col.*, 1997, 1998; Vialard *y col.*, 2002). Se denominó TD9 a la mínima región cromosómica capaz de provocar esta reversión sexual (Hoo *y col.*, 1989). Después de realizar muchos esfuerzos por aislar genes en el locus TD9, se identificó el gen *DMRT1* en el testículo humano a 30 Kb de dicha región crítica (Raymond *y col.*, 1998, 1999b) y, aunque no se han encontrado mutaciones de *DMRT1*, se le propuso un papel en el determinismo del sexo por estar presente en todas las deleciones del cromosoma 9 asociadas a la reversión sexual anteriormente mencionada (Ottolenghi y McElreavey, 2000; Raymond *y col.*, 1999b).

El gen *DMRT1* humano se localiza en la banda 9p24.3 (Raymond *y col.*, 1998, 1999b) y forma parte de un grupo de genes *DMRT* (*DMRT1-DMRT3-DMRT2*) que está conservado en ratón, peces y aves (Brunner *y col.*, 2001; Kim *y col.*, 2003; Nanda *y col.*, 1999, 2000; Ottolenghi *y col.*, 2002; Smith *y col.*, 2002). Contiene cuatro exones y codifica un factor de transcripción de 373 aminoácidos con un único dominio DM cerca del extremo amino-inicial, el cual presenta una homología del 67% y 50% con el de DSX y MAB-3 respectivamente (Raymond *y col.*, 1999b). La única similitud entre las tres especies en el resto de la proteína corresponde a una región rica en prolinas y serinas situada en el extremo carboxi-terminal, cuya función está aún por determinar (Ottolenghi *y col.*, 2002; Raymond *y col.*, 1999b). Recientemente, Cheng *y col.* (2006) han identificado dos nuevas isoformas de la proteína humana, DMRT1b de 275 aminoácidos y DMRT1c de 175 aminoácidos, producidas por maduración alternativa.

Con respecto a su expresión en humano, ésta se ha detectado en el primordio gonadal indiferenciado XY, en la sexta semana de gestación. A las siete semanas, cuando ya ha comenzado la diferenciación testicular, la expresión continúa y se localiza en los cordones testiculares, probablemente en la células pre-Sertoli. En cambio, no se ha encontrado expresión de *DMRT1* en ningún momento del desarrollo embrionario de la gónada femenina (Moniot *y col.*, 2000).

En ratón, sin embargo, *Dmrt1* se expresa en el primordio gonadal de ambos sexos a los 10.5 dpc. A partir de los 12.5 dpc su expresión disminuye hasta desaparecer en el desarrollo ovárico y aumenta en el testículo, manteniendo unos altos niveles hasta el adulto en el interior de las células de Sertoli y las células germinales pre-meióticas (De Grandi *y col.*, 2000; Raymond *y col.*, 1999a, 2000). Inesperadamente, la eliminación de *Dmrt1* del genoma de ratón no produjo anomalías en la determinación sexual ni en el desarrollo gonadal embrionario, lo que indujo a pensar que no tenía función en los estadios tempranos de la gonadogénesis o bien que ésta no era relevante

2. Antecedentes

(Raymond *y col.*, 2000). Por el contrario, si se observaron importantes defectos en la diferenciación testicular después del nacimiento. Las células de Sertoli no conseguían completar su diferenciación y proliferaban más de lo normal hasta rellenar los cordones testiculares. Estas células inmaduras eventualmente morían, provocando una alta desorganización del testículo con pocos túbulos seminíferos en el adulto. Las células germinales, a su vez, no migraban a la periferia de los túbulos seminíferos y morían poco después de 7 dpp. Estos datos indican un papel fundamental de *DMRT1* en el desarrollo testicular post-natal (Raymond *y col.*, 2000).

DMRT1 ha sido clonado en una gran variedad de especies, mostrando ser un gen de gran importancia en el desarrollo gonadal.

En aves, *DMRT1* es un gen ligado al sexo por lo que su dosis génica es fundamental en la gonadogénesis (Nanda *y col.*, 1999, 2000). *DMRT1* se localiza en el cromosoma sexual Z, requiriéndose dos copias activas para un desarrollo testicular normal (ZZ) y una sola para el desarrollo ovárico (ZW), en donde se expresa en menor medida (Raymond *y col.*, 1999a).

En reptiles con mecanismos de determinación sexual dependiente de la temperatura, se ha detectado expresión de *DMRT1* en estadios tempranos del desarrollo gonadal en ambos sexos, aunque la expresión es significativamente mayor en embriones incubados a las temperaturas que producen un determinismo masculino (Kettlewell *y col.*, 2000; Murdock y Wibbels, 2003; Smith *y col.*, 1999a; Torres Maldonado *y col.*, 2002).

DMRT1 también está implicado en el desarrollo testicular en anfibios. Se ha encontrado *DMRT1* en las células intersticiales y las células de Sertoli en los testículos un mes después de la metamorfosis, así como en las células germinales de los individuos adultos, no habiéndose detectado en ningún estadio del desarrollo ovárico (Aoyama *y col.*, 2003; Shibata *y col.*, 2002).

En teleosteos, *DMRT1* se expresa exclusivamente en el testículo (Brunner *y col.*, 2001; Marchand *y col.*, 2000; Veith *y col.*, 2003). En el pez medaka se ha identificado una copia funcional de *DMRT1* (*DMRT1Y/DMY*) en el cromosoma Y, que actúa como el gen maestro regulador en la determinación del sexo masculina (Matsuda *y col.*, 2002; Nanda *y col.*, 2002).

Como ya se ha indicado, en invertebrados se han encontrado genes con el dominio DM en grupos tan alejados filogenéticamente como insectos y nematodos (Raymond *y col.*, 1998). En *D. melanogaster*, la proteína DSX controla la diferenciación sexual somática tanto en machos como en hembras mediante maduración alternativa (Burtis y Baker, 1989); a su vez, MAB-3 es requerida para una correcta diferenciación sexual masculina en *C. elegans* (Shen y Hodgkin, 1988).

Todos estos estudios indican que *DMRT1* muestra un patrón conservado que, excepto en *Drosophila*, influye tanto en el desarrollo testicular como en el mantenimiento del testículo adulto y que ha sido funcionalmente mantenido

2.3. Control genético del sexo

durante la evolución en la determinación sexual tanto en vertebrados como en invertebrados (Zarkower, 2002).

Sin duda, la comprensión de los mecanismos que regulan la expresión de *DMRT1* contribuirá a entender un poco mejor la cascada génica que interviene en la gonadogénesis. Algunos de ellos han sido identificados en *D. melanogaster* y *C. elegans* y giran en torno a la proteína YOLK (Yi y Zarkower, 1999; Yi *y col.*, 2000). En mamíferos, en los que todavía no existen muchos datos, los factores de transcripción SP1, EGR1 y GATA4 parecen desempeñar un papel importante en la regulación de *DMRT1* en la gónada de rata (Lei y Heckert, 2002, 2004). En vertebrados no mamíferos, se han realizado varios trabajos para estudiar la posible influencia de hormonas esteroideas sobre la expresión *DMRT1* (Marchand *y col.*, 2000; Murdock y Wibbels, 2006; Shibata *y col.*, 2002). Según apuntan estos estudios, *DMRT1* queda inhibido ante la presencia de estrógenos en peces y reptiles, en los que un exceso de éstos provoca una feminización de los individuos (Marchand *y col.*, 2000; Murdock y Wibbels, 2006). Por otro lado, en anfibios, un exceso de andrógenos, que puede llegar a producir reversión sexual en ranas hembra, aumenta considerablemente la expresión de *DMRT1* (Shibata *y col.*, 2002). Recientemente se han encontrado evidencias de que SOX5 inhibe la expresión de *DMRT1* en los estadios tempranos de la embriogénesis del pez cebra (Gao *y col.*, 2005).

Otras proteínas de la familia DMRT también presentan localización gonadal. En ratón, por ejemplo, *Dmrt3*, *Dmrt4* y *Dmrt7* se expresan en la gónada embrionaria. *Dmrt3* se expresa en ambos sexos en el primordio gonadal aunque, poco después, su expresión aumenta en el testículo y disminuye en el ovario; *Dmrt7*, por el contrario, presenta unos niveles mayores en el ovario y *Dmrt4* se expresa de igual manera en ambos sexos (Kim *y col.*, 2003). En medaka, se ha detectado expresión diferencial de *Dmrt3* en el testículo, mientras que *Dmrt2* se expresa de forma similar en gónadas tanto masculinas como femeninas (Brunner *y col.*, 2001).

Algunos estudios indican una posible existencia de especificidad de expresión en algunos genes *DMRT*; el gen *DMRT4* fue descrito en el pez teleosteo *Tilapia* como un gen específico de ovario (Guan *y col.*, 2000), sin embargo, en medaka se expresa también en testículo y otros muchos órganos (Kondo *y col.*, 2002).

AMH

A mediados del siglo XX, Alfred Jost (1953) observó que el conducto de Müller sufría regresión en los fetos XY, lo que le llevó a proponer la existencia de una segunda hormona fetal diferente de la testosterona, a la que se denominó AMH (*antimullerian hormone*) o MIS (*mullerian inhibiting substance*). El estudio del Freemartinismo hizo sospechar que esta hormona

2. Antecedentes

también debía tener un papel en la diferenciación sexual. Los freemartin son animales XX de ganado bovino, gemelos de animales XY, que presentan un fenotipo masculinizado. Se sugirió que este fenotipo podría deberse al paso de AMH del feto XY a la hembra gemela a través de una anastomosis en la placenta. Los animales freemartin carecían de conducto de Müller y presentaban masculinización del ovario, el cual contenía estructuras parecidas a cordones testiculares y un número de oocitos muy reducido (Jost *y col.*, 1975). Una vez clonado y secuenciado el gen que codifica la AMH bovina y humana (Cate *y col.*, 1986), las ideas de Jost fueron confirmadas por Vigier *y col.* (1987) mediante el cultivo de ovarios fetales de rata expuestos a AMH bovina y por Behringer *y col.* (1990) con el estudio de ratones transgénicos que presentaban sobreexpresión de *Amh*.

El gen *AMH* humano tiene un tamaño de 2.75 Kb y está dividido en cinco exones (Cate *y col.*, 1986). Se localiza en la región 19p13.3 del cromosoma 9 (Cohen-Haguenauer *y col.*, 1987) y codifica una proteína precursora de 560 aminoácidos que, posteriormente, sufre maduración alternativa para formar una hormona compuesta por dos monómeros (Wilson *y col.*, 1993a).

En humanos, el gen que codifica el receptor de AMH se expresa en el embrión de ambos sexos en el momento de la determinación sexual; sin embargo, *AMH* presenta un dimorfismo, de manera que sólo se expresa en la gónada XY sobre la séptima semana de gestación, coincidiendo con la diferenciación de las células de Sertoli y la formación de los cordones testiculares. En este periodo, AMH se localiza en el citoplasma de las células de Sertoli, siendo uno de los primeros marcadores sertolianos que se detectan. La secreción de AMH provoca la regresión irreversible del conducto de Müller, la cual se completa sobre la novena semana de gestación. Los niveles de AMH son mantenidos altos hasta la pubertad, momento en el que descienden drásticamente (de Santa Barbara *y col.*, 2000; Taguchi *y col.*, 1984).

En el ratón no se ha observado expresión de *Amh* en el primordio gonadal indiferenciado. En el macho, este gen comienza a expresarse a los 12.5 dpc en las células de Sertoli, cuando ya ha comenzado la diferenciación testicular. Al igual que en humanos, esta expresión continúa durante todo el desarrollo testicular hasta la pubertad, en donde la transcripción disminuye a unos niveles basales, coincidiendo con la primera ronda de espermatogonias que entran en meiosis. En los ratones hembra no se ha encontrado expresión de *Amh* durante el desarrollo ovárico, pero a partir de los 6 dpp se observan bajos niveles de transcritos en las células foliculares, que se mantienen durante toda la época fértil y cuyo significado se desconoce (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991).

El hecho de que los niveles altos de AMH durante el desarrollo gonadal femenino coincidan con una disminución en el número de oocitos, y de que en el testículo estos niveles disminuyan con la entrada en meiosis de las espermatogonias, ha llevado a proponer que esta hormona pueda resultar

2.3. Control genético del sexo

tóxica para las células germinales meióticas (McLaren, 1990). En este sentido, se cree que las propias células germinales junto con la secreción de andrógenos podrían contribuir al descenso de la expresión de *AMH* en la pubertad (Al-Attar *y col.*, 1997).

Se han realizado un gran número de estudios encaminados a comprender las interacciones moleculares que intervienen en la regulación de la expresión de *AMH*. Parece claro que SF1 está directamente implicado en la activación del promotor de este gen (Giuli *y col.*, 1997; Shen *y col.*, 1994). En este proceso, la proteína SF1 podría cooperar con otros factores como WT1, SOX9, GATA4 y SOX8 (Arango *y col.*, 1999; Chaboissier *y col.*, 2004; De Santa Barbara *y col.*, 1998; Nachtigal *y col.*, 1998; Schepers *y col.*, 2003; Tremblay y Viger, 1999; Watanabe *y col.*, 2000). Experimentos *in vitro* muestran que DAX1 es capaz de reprimir estas asociaciones (Nachtigal *y col.*, 1998; Tremblay y Viger, 2001b), aunque este hecho se ha puesto en duda últimamente, habiéndose propuesto que DAX1 podría incluso ser necesario para una expresión normal de *AMH* (Park *y col.*, 2005). Asimismo, la proteína FOG2 parece ser la responsable de inhibir la transcripción de *AMH*, tanto en el desarrollo ovárico como en la pubertad de los individuos XY (Anttonen *y col.*, 2003; Tremblay *y col.*, 2001).

El gen *AMH* también se ha aislado en la rata (Haqq *y col.*, 1992), el cerdo (Lahbib-Mansais *y col.*, 1997), el pollo (Neeper *y col.*, 1996), el caimán (Western *y col.*, 1999) y el topo (Zurita *y col.*, 2003). En todas esas especies los niveles de *AMH* son mantenidos altos hasta la pubertad. En aves, la expresión de *AMH* es bastante singular, debido a que ésta puede detectarse en el desarrollo embrionario de ambos sexos (Oreal *y col.*, 1998). En el feto XY de pollo, ambos conductos de Müller degeneran de forma normal; sin embargo, en el desarrollo femenino, el ovario izquierdo se desarrolla y el conducto de Müller del mismo lado da lugar a los oviductos; pero en el lado derecho, la gónada permanece indiferenciada y el conducto de Müller degenera. Curiosamente, tanto en aves como en caimanes la expresión de *AMH* precede a la de *SOX9*, lo que provoca ciertas dudas acerca del papel regulador de *SOX9* sobre la expresión de *AMH* (Oreal *y col.*, 1998; Western *y col.*, 1999).

Otros genes

Otros miembros de la familia génica *SOX*, como *SOX3* y *SOX8*, también se expresan en las gónadas embrionarias (Takada y Koopman, 2003; Weiss *y col.*, 2003). La proteína *SOX3* no parece desempeñar ninguna función durante el determinismo del sexo, pero es necesaria para una correcta diferenciación de las células germinales y la gametogénesis, tanto en la gónada XX como en la gónada XY (Raverot *y col.*, 2005; Weiss *y col.*, 2003). Con respecto a *SOX8*, su patrón de expresión espacio-temporal es similar al de *SOX9* (Schepers *y col.*, 2000, 2003), indicando que podría tener una función importante en el

2. Antecedentes

desarrollo testicular. No obstante, ratones que carecen de *Sox8* no muestran anomalías en la determinación y diferenciación sexual, sino sólo una apreciable pérdida de peso (Sock *y col.*, 2001), lo que hace suponer que su papel en la gonadogénesis masculina pueda ser secundario. Se ha propuesto que SOX8 podría cooperar con SOX9 y SF1 en la activación del promotor de *AMH* y actuar reforzando la expresión de *SOX9* en un proceso de retroalimentación positiva entre ambos genes (Chaboissier *y col.*, 2004; Schepers *y col.*, 2003).

DHH (*desert hedgehog gene*) codifica una señal celular de acción local homóloga a la proteína Hedgehog de *Drosophila* (Bitgood y McMahon, 1995). En ratón, este gen se expresa en las células de Sertoli poco después de que lo haga *Sry* (Bitgood *y col.*, 1996). Ratones homocigotos para un alelo nulo de *Dhh* muestran un bloqueo en la diferenciación de las células de Leydig fetales. En el adulto, estos mutantes presentan defectos en la espermatogénesis y en el desarrollo de las células de Leydig adultas y de las mioides peritubulares (Bitgood *y col.*, 1996; Clark *y col.*, 2000; Pierucci-Alves *y col.*, 2001; Yao *y col.*, 2002). Mutaciones en el gen *DHH* humano provocan disgenesia gonadal parcial o total en individuos XY, como consecuencia de que las células de Leydig no llegan a desarrollarse completamente (Canto *y col.*, 2004, 2005; Umehara *y col.*, 2000). Estos datos indican que DHH es una proteína necesaria para la espermatogénesis y la diferenciación de las células de Leydig, tanto fetales como adultas.

Alteraciones en el gen *ARX* (*aristales-related homeobox X-linked gene*), situado en el segmento no apareante del cromosoma X, han sido asociadas con casos de genitales anormales en pacientes XY humanos (Kitamura *y col.*, 2002). En ratón, deleciones de *Arx* provocan fenotipos similares a los descritos en estos pacientes. En estos ratones, se observa un desarrollo inicial normal de las células de Sertoli y de los cordones testiculares, por lo que la función de ARX parece estar restringida a la diferenciación de las células de Leydig, en la que podría cooperar con DHH y PDGFR α . ARX debe ser una señal de actuación paracrina, porque la expresión de *Arx* no se detecta en las células esteroideogénicas, sino en las mioides peritubulares, las endoteliales y los fibroblastos (Kitamura *y col.*, 2002).

ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked gene*) es otro gen ligado al sexo implicado en el desarrollo testicular, aunque su función concreta no se conoce todavía. Mutaciones en este gen causan retraso mental ligado al cromosoma X en individuos XY que, generalmente, va acompañado de anomalías en los testículos y reversión sexual (Gibbons *y col.*, 1991). El papel de ATRX podría estar relacionado también con la diferenciación de las células de Leydig, debido a que los pacientes con disgenesia gonadal muestran unos niveles muy bajos de testosterona y otros defectos en la línea esteroideogénica (Tang *y col.*, 2004).

En relación con los genes implicados en el desarrollo ovárico, se han identificado algunos candidatos que podrían estar regulados por WNT4.

2.3. Control genético del sexo

Uno de ellos es *FOXL2* (*forkhead box gene L2*), el cual codifica un factor de transcripción y se expresa exclusivamente en la gónada XX (Uhlenhaut y Treier, 2006). En humanos, mutaciones en este gen provocan un síndrome denominado BPES (*Blepharophimosis Ptosis Epicanthus Inversus Syndrome*), que es un complejo desorden asociado con fallos prematuros en el ovario (Crisponi *y col.*, 2001). Estudios con ratones knock-out para este gen, indican que la proteína Foxl2 se requiere para la diferenciación de las células foliculares y el mantenimiento del ovario (Schmidt *y col.*, 2004).

Otros dos genes de la ruta femenina son *BMP2* (*bone morphogenetic gene 2*) y *FST* (*follicle-stimulating gene*). Ambos codifican señales que son secretadas al intersticio gonadal y se expresan durante todo el desarrollo ovárico de ratón (Yao *y col.*, 2004). Se ha comprobado que ratones homocigotos para un alelo nulo de *Wnt4* no expresan *Bmp2* y *Fst*, lo que indica que están situados «aguas abajo» de *WNT4* (Menke y Page, 2002; Yao *y col.*, 2004). El estudio *in vivo* de la función de *Bmp2* es muy complicado, debido a que los ratones que carecen de este gen mueren muy tempranamente durante el desarrollo embrionario; sin embargo, se ha visto que los ratones homocigotos para un alelo nulo de *Fst* sí expresan *Wnt4*, aunque los embriones XX desarrollan un fenotipo similar a los dobles mutantes para *Wnt4*, incluyendo la formación de una vasculatura típica de testículo y una marcada pérdida de las células germinales. No obstante, las gónadas de estos ratones XX que carecen de *Fst* no desarrollan células de Leydig, algo que si ocurre en los knock-out para *Wnt4*. Este hecho hace pensar que *WNT4* podría desempeñar dos funciones en el ovario: inhibir la diferenciación de las células de Leydig y activar a *FST*, el cual sería el responsable directo de evitar la formación de la vasculatura mediante el bloqueo de la migración de células endoteliales desde el mesonefros (Yao *y col.*, 2004).

Las espondinas R conforman una pequeña familia de factores de crecimiento descrita recientemente. Parma *y col.* (2006) han comprobado que el gen humano *RSPO1* (*R-spondin 1*), el cual forma parte de dicha familia, provoca reversión sexual completa de hembra a macho cuando su expresión está bloqueada. Este trabajo describe por primera vez la existencia de machos XX, carentes de *SRY*, originados por alteraciones de un único gen. Se sospecha que *RSPO1* podría colaborar con *WNT4* durante el desarrollo ovárico, pudiendo actuar como el gen maestro de la determinación sexual femenina.

2. Antecedentes

2.4. Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal

La figura 2.4 muestra los perfiles de expresión de los principales genes que intervienen en los procesos más representativos del desarrollo gonadal de ratón. A su vez, las interacciones entre dichos genes y los eventos morfológicos que conllevan, quedan resumidos en la figura 2.5.

Los esquemas de la figura 2.5 proporcionan una visión general de las distintas rutas de diferenciación que tienen lugar durante el desarrollo sexual de los mamíferos, tomando al ratón como referencia cronológica. En ellos puede observarse que el evento clave de la determinación y diferenciación del sexo en este grupo de animales es la expresión del gen *SRY* en las células somáticas epiteliales (pre-Sertoli) de la gónada indiferenciada XY. Como consecuencia de ello, se produce la activación directa o indirecta de *SOX9* y *FGF9*, que están localizados muy al principio de la cascada génica de la gonadogénesis. Al parecer, estos últimos son los responsables de inhibir al gen *WNT4* y permitir así que el primordio gonadal siga la vía testicular.

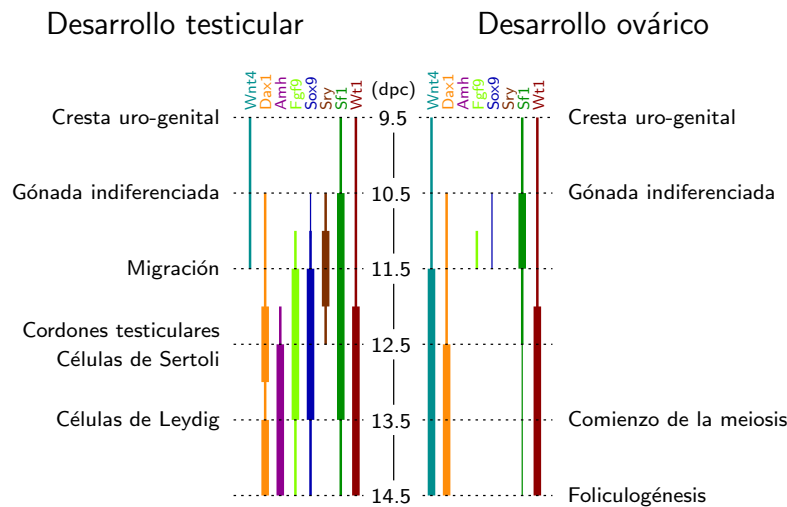


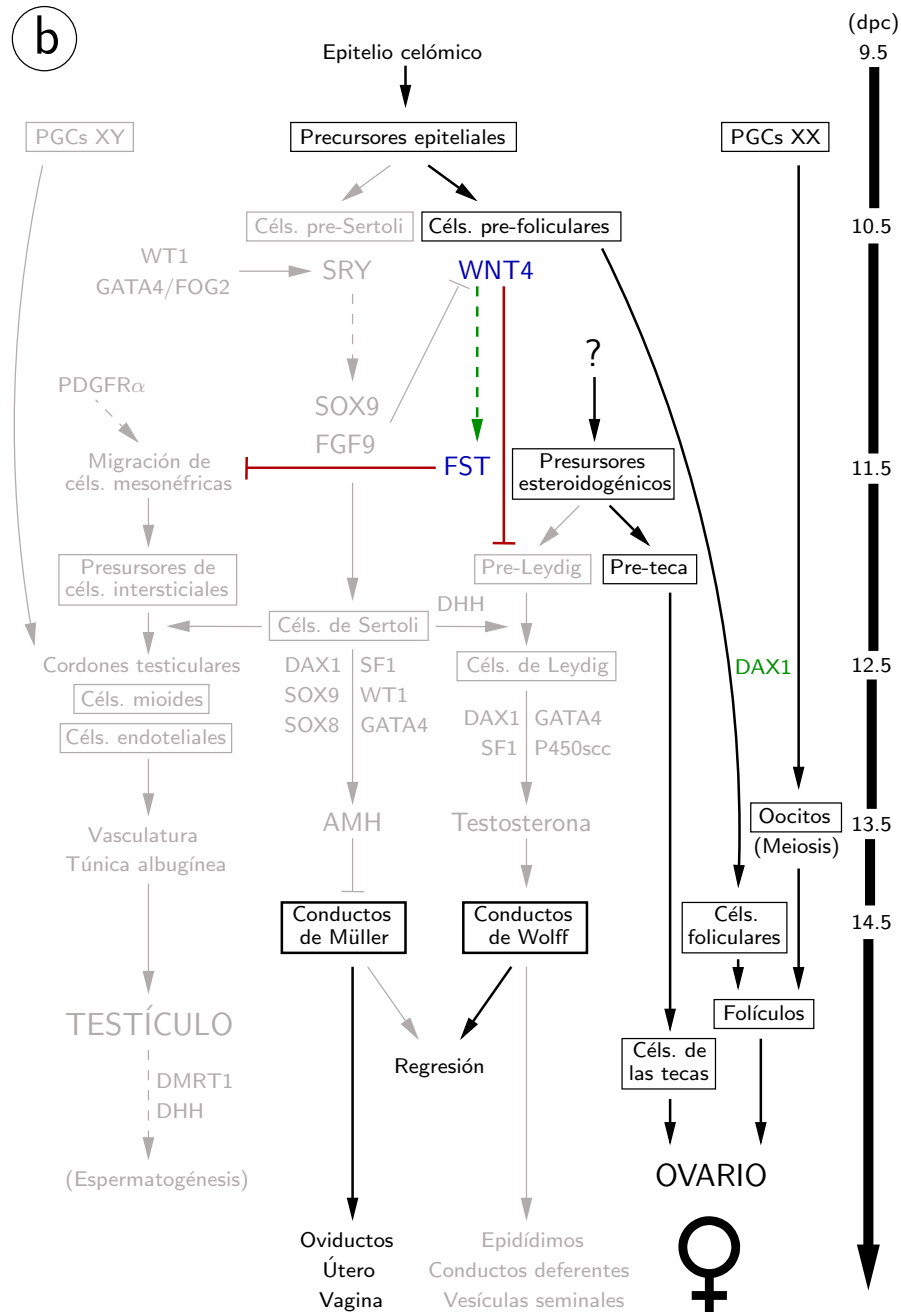
Figura 2.4: Patrones de expresión génica y eventos más relevantes durante el desarrollo gonadal temprano de ratón. La intensidad relativa de la expresión génica está representada con líneas de diferente grosor. (dpc) Días post-coito.

2.4. Interacciones génicas en el desarrollo gonadal

En este modelo actualmente aceptado, las células de Sertoli se establecerían como el tipo celular maestro sobre el que pivotan todos los procesos de diferenciación sexual en machos. Las hembras, por el contrario, carecen de *SRY*, por lo que no se ve favorecida la expresión de *SOX9* y *FGF9* que, a su vez, quedan controlados por genes de la ruta femenina como *WNT4*. Esto hace que las células epiteliales se diferencien como células foliculares, dejando vía libre al desarrollo ovárico (Ross y Capel, 2005).

Figura 2.5: (ver página siguiente) Esquema de la determinación y diferenciación sexual masculina (*a*) y femenina (*b*) en mamíferos según los datos obtenidos en ratón. El avance cronológico relativo del desarrollo gonadal está representado a la derecha de ambas figuras con una barra gruesa en la que se indican los días post-coito de gestación (dpc). Los tipos celulares y las estructuras morfológicas que aparecen a lo largo del desarrollo se muestran en el interior de cajas. Los principales genes implicados en el proceso de la determinación sexual están representados en azul. El resto de los genes aparecen en verde cuando están activos. Las flechas verdes indican procesos de activación génica, mientras que las líneas rojas indican procesos de inhibición. Las flechas negras apuntan al paso siguiente en el proceso de desarrollo. Las flechas discontinuas indican que no se conoce si la actuación correspondiente se produce de forma directa o indirecta. En ambas figuras se representan en gris todos aquellos eventos inhibidos correspondientes al sexo opuesto (femenino en *a* y masculino en *b*).

2.4. Interacciones génicas en el desarrollo gonadal



2. Antecedentes

2.5. Reversión sexual en mamíferos

En mamíferos, el sexo genético está determinado por la dotación cromosómica del individuo, de tal forma que si éste posee un cromosoma Y se considera masculino y si no es así se considera femenino. En condiciones normales, los embriones XY forman testículos y se desarrollan como machos, mientras que los embriones XX forman ovarios y se desarrollan como hembras. Se puede decir que el sexo fenotípico (el cual está definido por el desarrollo de las características sexuales secundarias incluyendo los genitales internos y externos) depende del sexo gonadal (que será masculino si se desarrollan testículos y femenino si se desarrollan ovarios) y éste a su vez depende del sexo genético. En este sentido, se produce reversión sexual cuando el sexo gonadal o el fenotípico no coincide con el sexo genético del individuo. La reversión sexual, a su vez, puede ser primaria, si la incoherencia se produce entre el sexo gonadal y el genético, o secundaria, si es el sexo fenotípico el que no coincide con el gonadal.

2.5.1. Factores relacionados con reversión sexual y disgenesia gonadal

En ausencia de ovarios funcionales un embrión puede llegar a desarrollarse como hembra; sin embargo, el desarrollo masculino requiere inevitablemente la presencia de testículos funcionales. Esto es así porque, aunque las hormonas sexuales no son imprescindibles en las rutas de diferenciación femenina, las hormonas producidas por los testículos son necesarias y suficientes para inducir el desarrollo masculino (Jost *y col.*, 1975). De esta manera, la hormona AMH es responsable de la regresión de los genitales internos femeninos, los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona inducen el desarrollo de los genitales internos y externos masculinos, y el factor 3 semejante a insulina (INSL3, *insulin-like factor 3*) es requerido para el descenso de los testículos al escroto. Por tanto, un individuo podrá tener un sexo fenotípico femenino si sus gónadas se han desarrollado como ovarios, pero también si no se han desarrollado correctamente (situación conocida como disgenesia gonadal) o si las hormonas masculinizantes no han podido realizar su función.

Como consecuencia de lo anterior, la reversión sexual XY, que corresponde con machos genéticos que se desarrollan como hembras, es relativamente frecuente (aproximadamente 1 de cada 3000 nacimientos en humanos) y puede estar causada por factores muy diversos; sin embargo, la reversión sexual XX, en la que hembras genéticas se desarrollan como machos, es bastante más inusual (1 de cada 20000 nacimientos en humanos) y suele producirse casi exclusivamente por translocaciones del gen *SRY* en el cromosoma X o en autosomas (Camerino *y col.*, 2006).

Las reversiones sexuales XX independientes de *SRY* son muy raras

2.5. Reversión sexual en mamíferos

en humanos y su base molecular está aún por dilucidar. Mutaciones en heterocigosis del gen *WNT4* han sido asociadas con regresión de los conductos de Müller y virilización en pacientes XX (Biaison-Lauber *y col.*, 2004).

En ratón, sólo se ha podido inducir reversión sexual XX de forma artificial por expresión ectópica de los genes *Sry* y *Sox9* en la gónada femenina en desarrollo (Bishop *y col.*, 2000; Koopman *y col.*, 1991; Qin *y col.*, 2004; Vidal *y col.*, 2001), no habiéndose relacionado este tipo de reversión sexual con mutaciones en genes de la ruta femenina, como *Foxl2*, *Fst* y *Wnt4* (Uda *y col.*, 2004; Vainio *y col.*, 1999; Yao *y col.*, 2004). No obstante, Parma *y col.* (2006) han descrito recientemente un caso reversión sexual XX en humanos causado por una pérdida de función en el gen *RSPO1*, hecho que deberá ser investigado en ratón dada su gran relevancia.

Por el contrario, las causas que provocan reversión sexual XY son muy variadas y su estudio proporciona datos de gran interés para identificar los genes que intervienen en el desarrollo gonadal y comprender los mecanismos que determinan el sexo de un individuo. En estos casos, la presencia del cromosoma Y es incoherente con el fenotipo femenino. El origen más común de esta reversión sexual es la delección del gen determinante de testículo *SRY*, la cual puede ocurrir por intercambio desigual entre los cromosomas X e Y durante la meiosis paterna, por translocaciones Y-autosomas o por mutaciones puntuales. Estas hembras presentan disgenesia gonadal y suelen ser más altas de lo normal (Hawkins, 1993).

Asimismo, mutaciones en genes localizados al comienzo de la cascada génica del desarrollo testicular también pueden producir reversión sexual en individuos XY. Es el caso de *SOX9*, cuya alteración provoca displasia campomélica. Los individuos 46XY que presentan esta enfermedad muestran un amplio rango de fenotipos sexuales, incluyendo machos normales, hembras con tejido testicular, hembras con disgenesia testicular y hembras normales con ovarios que contienen oocitos. No se han encontrado individuos 46XX con las mismas disfunciones (Tommerup *y col.*, 1993).

El síndrome de Denys-Drash consiste en una nefropatía progresiva que va acompañada del tumor de Wilms. Este síndrome se produce en individuos XY con mutaciones en el gen *WT1*, los cuales suelen presentar genitales externos femeninos o ambiguos al nacer (Mueller, 1994).

Otra causa de reversión sexual XY son las duplicaciones de genes implicados en la gonadogénesis. Uno de ellos es *WNT4*, que al aumentar su dosis da lugar a individuos XY con fenotipo femenino (Jordan *y col.*, 2001). De igual manera, duplicaciones en *DAX1* producen hembras XY con genitales externos ambiguos (Bardoni *y col.*, 1994). Estudios de pérdida de función de *Dax1* han revelado que su ausencia también provoca reversión sexual en ratones XY (Meeks *y col.*, 2003b), lo que indica que probablemente se requieran unos niveles de proteína DAX1 concretos, por encima y por debajo de los cuales se vea afectada la función de este gen hasta el punto de

2. Antecedentes

producir reversión sexual.

También se ha descrito reversión sexual XY en ratones con triple mutación en los genes de la familia del receptor de la insulina *Ir*, *Igf1r* e *Irr* (Nef *y col.*, 2003). De igual forma, ratones con el gen *Fgf9* mutado presentan este tipo de reversión sexual que, además, va acompañada de muerte al nacimiento (Colvin *y col.*, 2001a).

En humanos, mutaciones en heterocigosis del gen *DHH* pueden producir disgenesia total o parcial (Canto *y col.*, 2005; Umehara *y col.*, 2000). Además, existen diversos casos de disgenesia gonadal en individuos XY asociados a múltiples anomalías congénitas cuya patogénesis se desconoce, como el síndrome genitopalatocardiaco (Simpson, 1976), el síndrome de Smith–Lemli–Opitz (Bialer *y col.*, 1987) y el síndrome de costilla corta de tipo IV Beemer–Langer (Cideciyan *y col.*, 1993).

2.5.2. Particularidades del género *Talpa*

Los topos (orden Insectivora, familia Talpidae) representan un caso único entre los mamíferos euterios debido a que, como se detalla a continuación, las hembras de este grupo de animales poseen un sistema reproductor excepcional no descrito anteriormente.

Biología del topo

Los topos son animales altamente especializados en la vida subterránea. En este sentido, presentan ciertas modificaciones en su anatomía que los diferencian del resto de mamíferos. Sus patas delanteras han evolucionado como poderosos órganos cavadores, lo que les impide ser dispuestas en la posición normal para caminar. Los músculos de los hombros también están muy desarrollados, algo que les proporciona un aspecto en el que no se aprecia el cuello, de forma que a simple vista parece que la cabeza está unida directamente al tronco del animal. El cuerpo es cilíndrico y acaba en una pequeña cola que suelen mantener erecta. La peculiaridad más llamativa en la cabeza de los individuos adultos es la aparente ausencia de ojos, porque quedan cubiertos completamente por un denso pelaje, en el caso de *T. europaea*, o por la piel, en el de *T. occidentalis* (las dos especies más estudiadas). Ambas especies no presentan orejas, aunque su oído es muy sensible (Godfrey y Crowcroft, 1960).

Exhiben una marcada territorialidad y construyen galerías a unas profundidades comprendidas entre 5 y 100cm de la superficie, cuyo diámetro es aproximadamente el del animal (de 3 a 5cm). Son insectívoros y obtienen el alimento buscando entre la tierra, en el interior de sus túneles o en la superficie, a la que suelen acceder ocasionalmente.

El topo ibérico, *Talpa occidentalis* (Cabrera, 1914), se distribuye a lo

2.5. Reversión sexual en mamíferos

largo de toda la península excepto en áreas del norte y del nordeste, en donde habita *T. europaea*. Los individuos de esta especie tienen reproducción estacional con un ciclo que varía en función de la latitud (Jiménez y col., 1990a). Su periodo de gestación es de 29 días y el promedio de crías por camada suele ser de cuatro. Se ha comprobado que el esfuerzo reproductivo de esta especie, definido por la fracción entre la masa corporal de la madre y la de la descendencia al destete, es un 36% mayor del que cabría esperar en función de su tamaño (Barrionuevo y col., 2004a). En la época fértil las hembras construyen nidos cuyo aspecto exterior es el de un montículo de tierra removida, de unos 20cm de altura y 60cm de diámetro, que suele estar disgregada si el nido es reciente y fuertemente compacta y más o menos cubierta de vegetación herbácea si es más antiguo. En su interior, estos nidos están formados por una cámara de unos 20cm de diámetro situada por encima del nivel de inundación del terreno, de la que parten tres o cuatro galerías de forma radial. Para conseguir un aislamiento térmico, rellenan la cámara con hojas secas y trituradas, lo que les permite mantener el calor incluso en días muy fríos (Barrionuevo, 2001).



Figura 2.6: Hembra adulta y crías de 15 días post-parto de *T. occidentalis*.

Hermafroditismo verdadero en *T. occidentalis*

Los hermafroditas verdaderos son individuos que poseen tanto tejido testicular como ovárico, ya sea porque contienen un testículo en un lado y un ovario en el otro, o bien porque presentan gónadas formadas por ambos tejidos gonadales. En este último caso las gónadas se denominan ovotestes y están formadas por una porción testicular y otra ovárica. La formación de ovotestes en humanos suele ocurrir en individuos 46XX con mutaciones en genes del desarrollo gonadal, aunque también se han descrito casos en

2. Antecedentes

individuos 46XY, quimeras 46XX/46XY (como consecuencia de errores en la disyunción meiótica o mitótica de los cromosomas sexuales) y mosaicos para los cromosomas sexuales (por doble fertilización de un óvulo y su cuero polar) (van Niekerk y Retief, 1981).

Jiménez *y col.* (1988) describieron en *T. occidentalis* el único caso conocido en mamíferos euterios de hermafroditismo verdadero que afecta a todas las hembras de una misma especie. Posteriormente, se ha comprobado que esta característica es común a otras especies del género *Talpa*, como *T. europaea*, *T. romana* y *T. stankovici* (Sanchez *y col.*, 1996b), por lo que ésta podría ser una característica adquirida por este grupo taxonómico.

Los machos tienen testículos normales aunque éstos sufren cambios estacionales, de forma que durante el periodo no reproductivo reducen su tamaño hasta una quinta parte de su peso durante la estación reproductiva y se hacen estériles. Al final de la época infértil se reanuda la meiosis masculina, que alcanza su máxima actividad coincidiendo con el periodo de ovulación de las hembras (Jiménez *y col.*, 1990a).

Las hembras de topo representan un caso excepcional en lo referente al desarrollo gonadal. Estas hembras son fértiles pero, en lugar de ovarios normales, poseen ovotestes bilaterales formados por una pequeña porción de tejido ovárico normal y otra, generalmente de mayor tamaño, de tejido testicular no funcional (Jiménez *y col.*, 1988, 1993). Los componentes testicular y ovárico de los ovotestes presentan una variación estacional independiente. Ambas regiones muestran un cambio de volumen periódico a lo largo del ciclo reproductivo, aumentando de tamaño la porción ovárica durante la época fértil y la testicular durante la infértil. De la misma manera, el peso del útero también varía estacionalmente, siendo mayor en la época reproductiva (Jiménez *y col.*, 1996a).

La porción ovárica del ovoteste se desarrolla a partir de la corteza del primordio gonadal. Está formada por tejido ovárico normal con oocitos maduros y es la que proporciona fertilidad a las hembras. A su vez, la porción testicular se origina a partir de la médula y es disgenésica. Ambas regiones no están separadas por una barrera continua de tejido conectivo y presentan características muy diferentes (Barrionuevo *y col.*, 2004b).

Características de la porción testicular del ovoteste del topo

La región testicular del ovoteste de las hembras de *T. occidentalis* está cubierta por una túnica albugínea típica compuesta por células epiteliales aplanadas con abundantes fibras de colágeno y vasos sanguíneos. Esta túnica se separa de la gónada sobre la región ovárica, constituyendo así una bursa ovárica conectada con el infundíbulo y los oviductos (Jiménez *y col.*, 1993).

El tejido testicular contiene un gran número de estructuras similares a pequeños cordones testiculares, denominadas esférulas, que se disponen en

2.5. Reversión sexual en mamíferos



Figura 2.7: Corte histológico longitudinal de un ovoteste de *T. occidentalis* tras tinción con hematoxilina–eosina. (PO) Porción ovárica; (PT) porción testicular; (OV) oviducto. La barra de escala representa 1mm.

una matriz de tejido intersticial. En esta matriz se desarrolla un sistema vascular completo y abundantes células de Leydig (Jiménez *y col.*, 1993), las cuales producen altos niveles de testosterona que varían durante el ciclo reproductivo, pudiendo llegar a ser mayores incluso que los de los machos durante la época infértil. La producción de testosterona durante el desarrollo gonadal podría estar relacionada con el desarrollo de los conductos de Wolff que ocurre en las hembras después del nacimiento y que da lugar a la formación de epidídimos rudimentarios y una rete testis con desarrollo variable (Zurita *y col.*, 2003). Rodeando a las esférulas existe una lámina basal sobre la que se disponen células mioides peritubulares, hecho de gran relevancia si se tiene en cuenta que este tipo celular no tiene homólogo en el ovario (Barrionuevo *y col.*, 2004b).

Otra característica claramente testicular es la existencia de migración celular desde el mesonefros a la médula de la gónada XX sobre los 18 dpc. Además, esta migración se produce al mismo tiempo que en la gónada XY (Barrionuevo *y col.*, 2004b).

La región testicular, no obstante, presenta algunas diferencias notables con respecto a la gónada XY. Una de ellas es que, como se ha indicado anteriormente, no contiene verdaderos cordones testiculares, sino numerosas esférulas compactas que están formadas por células somáticas. Estas células llegan a ser morfológicamente similares a células de Sertoli inmaduras tan sólo en la gónada adulta y no expresan marcadores moleculares sertolianos

2. Antecedentes

típicos como AMH (Zurita *y col.*, 2003). Otra diferencia remarcable es la ausencia total de células germinales, lo que confiere esterilidad a la médula del ovoteste (Barrionuevo *y col.*, 2004b). Finalmente, aunque algunos procesos en el desarrollo del tejido testicular ocurren a la vez en ambos sexos, otros están retardados en la gónada XX, tal como se indica en el cuadro 2.1. A pesar de ello, es en dicha gónada XX donde ocurre el primer signo de diferenciación gonadal, con la formación de un septo de tejido mesenquimático que separa la corteza de la médula y que desaparece a las pocas horas (Barrionuevo *y col.*, 2004b).

Actualmente se desconoce el origen de la reversión sexual que muestran las hembras de *T. occidentalis*, aunque mediante el análisis de complejos sinaptinémicos se ha comprobado que esta reversión no es atribuible a anomalías en el proceso de apareamiento de los cromosomas sexuales (Jiménez *y col.*, 1990c,b).

Cuadro 2.1: Comparación de los eventos más significativos en el desarrollo del tejido testicular XX y XY en *T. occidentalis* (Barrionuevo *y col.*, 2004b).

Procesos de desarrollo	Tejido testicular XY	Tejido testicular XX
Establecimiento del primordio gonadal.	4–16 dpc	4–16 dpc
Compartimentación de la gónada en médula y corteza.	18 dpc	17 dpc
Migración celular desde el mesonefros a la médula.	18 dpc	18 dpc
Formación de los cordones sexuales.	18 dpc	18 dpc
Diferenciación de células de Sertoli.	18 dpc	—
Inicio de la vascularización.	19 dpc	19 dpc
Diferenciación de células de Leydig.	19–21 dpc	3–7 dpp
Diferenciación de células mioides peritubulares.	21–23 dpc	7–12 dpp
Formación de la túnica albugínea.	24–28 dpc	24–28 dpc
Formación del epidídimo.	24–28 dpc	30 dpp
Formación de la rete testis.	7–12 dpc	30 dpp

dpc=días post-coito; dpp=días post-parto

3. Material y métodos

Contenidos

3.1. Material analizado	60
3.2. Métodos	61
3.2.1. Obtención del material	61
Cobertura legal de los métodos utilizados	61
Captura de topos adultos	61
Obtención de embriones y fetos	62
Obtención de crías	63
3.2.2. Determinación del estadio de desarrollo	63
3.2.3. Métodos citológicos e histológicos	65
Determinación del sexo de los embriones	65
Preparaciones de material incluido en parafina	65
Preparaciones de material incluido en resina	67
3.2.4. Inmunofluorescencia indirecta	68
3.2.5. Otros métodos inmunológicos	69
Producción de anticuerpos frente a DAX1	69
Producción anticuerpos frente a WNT4	71
Test de ELISA para detección de anticuerpos	72
3.2.6. Métodos de análisis genético molecular	73
Extracción de ADN genómico	73
Extracción de ARNm	74
Diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR	75
Amplificación por PCR	77
RT-PCR	77
Purificación de productos de PCR	78
Clonación de fragmentos génicos	78
Minipreparaciones de ADN plasmídico	80
Secuenciación con dideoxinucleótidos marcados	80
3.3. Preparación de soluciones y medios	82

3. Material y métodos

3.1. Material analizado

El presente estudio se ha llevado a cabo mediante el análisis de un total de 118 embriones, fetos, crías y adultos de *T. occidentalis*, capturados entre los años 2002 y 2006 en varias alamedas de las localidades de Santa Fe y Chauchina, situadas en la vega de Granada.

Los embriones y fetos se obtuvieron a partir de hembras preñadas de topo. Para ello, se realizó un seguimiento de cada animal mediante reconocimiento *in situ* de características morfológicas como la existencia o no de un orificio vaginal abierto, el grado de inflamación y la cantidad de mucosidad de la vulva, el tamaño y el estado de los pezones de las mamas y la presencia o no de embriones en el útero. En caso de estar preñadas, el estadio de gestación se determinó mediante palpación directa del abdomen de las hembras, teniendo en cuenta el tamaño de los sacos vitelinos. Las crías se obtuvieron directamente de sus nidos una vez que éstos fueron localizados mediante el rastreo de hembras lactantes, identificadas por el tamaño y el color de sus pezones. En el cuadro 3.1 se muestran todos los datos básicos del material analizado.

Cuadro 3.1: Material analizado.

Estadio	Edad ^a	Camadas	Gónadas analizadas ^b					
			Individuos analizados		Inclusión en parafina		Inclusión en resina	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
s4	14-16 dpc	3	6	5	5	4	1	1
s5a	17 dpc	4	7	8	5	6	2	2
s5b	18 dpc	4	7	7	5	5	2	2
s5c	19 dpc	3	5	6	5	6	–	–
s6	19-21 dpc	1	1	2	1	2	–	–
s7	21-23 dpc	1	1	2	1	2	–	–
s8	24-28 dpc	2	2	3	2	3	–	–
s9	0-3 dpp	2	2	4	2	4	–	–
s10	3-7 dpp	4	4	7	4	7	–	–
s11	7-12 dpp	2	2	6	2	6	–	–
s12	12-17 dpp	3	4	6	4	6	–	–
s13	17-22 dpp	1	2	1	2	1	–	–
s14	22-27 dpp	2	4	1	4	1	–	–
s15a	27-33 dpp	1	2	1	2	1	–	–
s15b	30-240 dpp	1	1	1	1	1	–	–
adultos	240 dpp-4 años	–	4	4	4	4	–	–

(a) dpc=días post-coito; dpp=días post-parto

(b) Una de las gónadas de cada animal se almacenó en nitrógeno líquido para su uso en técnicas moleculares por parte de otros miembros de nuestro laboratorio.

3.2. Métodos

La realización de este trabajo ha requerido el desarrollado de diversas técnicas histológicas, inmunológicas y moleculares, así como de captura y manipulación de animales salvajes. Los protocolos utilizados en cada caso quedan detallados en este apartado.

3.2.1. Obtención del material

Debido a que los topos son animales silvestres que no pueden ser mantenidos en cautividad durante periodos superiores a una semana, éstos debieron ser capturados en su medio natural, procurando alterar lo mínimo posible el número total de individuos de cada población.

Cobertura legal de los métodos utilizados

Todos los animales fueron capturados con el permiso expreso de la Dirección General de Gestión de Medio Natural de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, expedido anualmente para que dichos animales sean utilizados con fines de investigación científica.

La manipulación de los ejemplares capturados ha seguido las directrices y aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Captura de topos adultos

La captura de topos ha sido posible mediante la utilización de trampas diseñadas y construidas en nuestro laboratorio. En general, estas trampas consisten en tubos de PVC sanitario de aproximadamente 20cm de longitud y 5cm de diámetro (diámetro similar al de una galería de topo), a los que se les acoplan dos puertas en los extremos. Las puertas están unidas mediante un sistema mecánico de muelles y palancas a un resorte que sobresale en el interior del tubo. Al atravesar la trampa, el topo desplaza el resorte de su posición haciendo que las puertas se cierren y quede atrapado sin sufrir daño alguno; no obstante, el animal no puede permanecer con vida mucho tiempo en el interior de la trampa (debido al frío en invierno y al calor en verano). Para evitar esta situación, la trampa lleva acoplada un nido al que el topo accede a través una puerta de un solo sentido (ver figura 3.1). Este nido está constituido por una capa exterior de un material impermeable (lámina de plástico) y una cubierta interior absorbente (lona). El nido se rellena además con hojas secas, que sirven de abrigo para el animal. Dentro del nido los topos pueden permanecer con vida durante mucho más tiempo, por lo que las trampas pueden ser instaladas por la mañana y revisadas por la tarde.

3. Material y métodos



Figura 3.1: Trampa de topos.

Obtención de embriones y fetos

Los topos son animales territoriales con reproducción estacional. Por ello, para la obtención de embriones y fetos de topo, se llevaron a cabo capturas intensivas en diferentes alamedas de la Vega de Granada durante su época reproductiva, que suele estar comprendida entre los meses de octubre y marzo (Jiménez *y col.*, 1990a; Sanchez *y col.*, 1996a). Inicialmente se capturaron topos al azar, colocando numerosas trampas. Cuando se conseguía una hembra, ésta era marcada utilizando técnicas de radio-rastreo, que permiten la localización rápida y exacta de la posición del nido. Para controlarla, se le adhería un pequeño radio transmisor sujetado a su cola con esparadrapo. Posteriormente, con la ayuda de una antena direccional (tipo Yagi) conectada a un receptor de radio sintonizado con el radiotransmisor, se realizaba un seguimiento de la hembra preñada que, una vez liberada de nuevo en una galería de su territorio, generalmente se dirigía a su nido, permitiéndonos así su localización. Entonces, la hembra era recapturada para recuperar el radiotransmisor, que podía así ser utilizado para el seguimiento de otra hembra distinta. El conocimiento de la posición del nido de cada hembra garantizaba la recaptura de la misma, permitiendo así un seguimiento preciso de su estatus reproductivo.

La determinación del estadio de desarrollo de los embriones o fetos se realizó mediante palpación del abdomen de la madre, lo que permitía estimar la longitud del embrión con una precisión de $\pm 1mm$. De esta manera, podíamos liberar la hembra preñada si era necesario para volver a recapturarla unos días después, una vez que los embriones hubiesen alcanzado el estadio de desarrollo de interés en cada caso.

Obtención de crías

Las crías de topo no se pueden capturar por los métodos anteriores, puesto que permanecen en el nido hasta que son destetados. Para la obtención de este material, se localizaron en el campo nidos de hembras lactantes y se procedió a su apertura. Esto se realizó de dos maneras diferentes.

En la primera de ellas, los nidos de hembras preñadas o lactantes fueron localizados mediante radio-rastreo. Las hembras preñadas eran recapturadas semanalmente para comprobar el estadio de desarrollo de los embriones. Esto nos permitía estimar con cierta precisión el día del parto y, en consecuencia, abríamos el nido para retirar las crías el día en que éstas hubiesen alcanzado la edad de nuestro interés. Las hembras lactantes fueron reconocidas mediante examen ocular de los pezones, debido a que éstas los tienen considerablemente agrandados. Una vez reconocidos sus nidos por radio-rastreo, éstos se abrían y se examinaban las crías para estimar su edad en función del tamaño, peso y morfología externa.

En la segunda modalidad, los nidos fueron localizados mediante la simple observación del terreno en las alamedas. En determinadas circunstancias es posible su reconocimiento directo, debido a que aparecen como un montículo de entre 10 y 30cm de altura y entre 50 y 70cm de diámetro formado por tierra removida, suelta si el nido es reciente y no ha llovido desde su construcción, o fuertemente compacta y cubierto de vegetación herbácea si tiene varios meses. Estos nidos son los que habitualmente ocupan las hembras preñadas y lactantes; sin embargo, los machos e individuos jóvenes construyen nidos de menor tamaño y menos elaborados. Gracias a ello pudimos reconocer qué nidos eran de hembras adultas y cuales no.

Una vez localizado un nido con crías, éstas eran llevadas rápidamente al laboratorio para su análisis o bien devueltas al nido, si el estadio de desarrollo no era el adecuado, el cual se cerraba cuidadosamente para que la madre no dejase de amamentarlas.

3.2.2. Determinación del estadio de desarrollo

La determinación del estadio de desarrollo de los animales capturados se realizó siguiendo los criterios de clasificación establecidos por Barrionuevo *y col.* (2004a). Esta clasificación se basa en la medida del CRL y el peso, así como en la observación directa de caracteres tales como la presencia o ausencia de uñas en las manos, pelo en la piel o el hocico, orientación del plano de las manos y forma de la cabeza entre otros. Debido a que en el estadio s5 ocurren importantes eventos en la diferenciación gonadal, éste se ha subdividido en tres subestadios para permitir un análisis cronológico más preciso (Barrionuevo *y col.*, 2004b). El cuadro 3.2 muestra las características fundamentales de los diferentes estadios.

3. Material y métodos

Cuadro 3.2: Estadios de desarrollo de *T. occidentalis*.

Estadio	Edad ^a	CRL ^b (mm)	Peso (g)	Características morfológicas externas
s4	4-16 dpc	6-9.5	0.05-0.08	Ojo pigmentado. Extremidades anteriores aplanadas.
s5a	17 dpc	9.5-11.5	0.08-0.17	Palmas de las manos identificables. Dedos no marcados. Hocico corto.
s5b	18 dpc	10.5-12	0.15-0.22	Inicio de la formación de los dedos. Folículos pilosos de las vibrisas del labio superior.
s5c	19 dpc	12-15	0.21-0.45	Pabellones auditivos. Hocico alargado. Dedos de las manos marcados.
s6	19-21 dpc	15-18.5	0.45-0.6	Folículos pilosos presentes por todo el cuerpo. Dedos separados.
s7	21-23 dpc	18.5-25	0.6-1	Párpados fusionados. Reposición de la hernia umbilical.
s8	24-28 dpc	25-29	1-3	Piel aún no arrugada. Columna cervical y dorsal recta.
s9	0-3 dpp	29-45	3-5	Animales recién nacidos. Color del cuerpo rojizo. Sin pelo.
s10	3-7 dpp	45-60	5-15	Color más rosado y sin pelo. La piel comienza a arrugarse. Uñas de las manos prominentes.
s11	7-12 dpp	60-70	15-20	Color rosa intenso. Piel muy arrugada. Pelo en crecimiento por todo el cuerpo. Gran diámetro corporal.
s12	12-17 dpp	60-75	17-27	Pelo corto por todo el cuerpo. Manos y uñas casi tan grandes como las de un adulto. Menor diámetro corporal que en s11. Color gris-ceniza.
s13	17-22 dpp	70-85	25-36	Pelo muy denso, aún paralelo a la piel. Hocico muy largo (más que en los juveniles).
s14	22-27 dpp	80-95	28-46	Similares a s13 pero con pelo perpendicular a la piel. Alimentación exclusivamente láctea. No salen del nido.
s15a	27-33 dpp	85-110	38-57	Aspecto similar a un adulto. Viven en el nido materno, aunque salen de vez en cuando. Alimentación mixta. Respuesta no agresiva a la manipulación.
s15b	30-240 dpp	85-110	32-70	Aspecto similar al de un adulto. Con nido propio. Alimentación exclusivamente insectívora. Respuesta agresiva a la manipulación.
adultos	240 dpp-4 años	85-130	40-75	Reproducción estacional.

(a) dpc=días post-coito; dpp=días post-parto

(b) CRL=Crown-rump length (longitud corona-grupa)

3.2.3. Métodos citológicos e histológicos

Las crías fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y pesadas para verificar su estadio de desarrollo. En las hembras preñadas, los embriones o fetos fueron extraídos del útero, medidos y pesados en una balanza de precisión. Las gónadas de los animales fueron aisladas para su posterior procesamiento en métodos histológicos o para su utilización en técnicas de análisis genético molecular.

Determinación del sexo de los embriones

Para la determinación del sexo genético de los embriones y fetos que, por su temprano estadio de desarrollo (inferior a s5b), no pudieron ser sexados en función de las características morfológicas de sus gónadas, se realizaron preparaciones de cromatina sexual de sus células amnióticas, utilizando un método desarrollado en nuestro laboratorio (Jiménez *y col.*, 2000). Esta técnica, cuyo protocolo se muestra a continuación, permite teñir el cuerpo de Barr, que corresponde a uno de los dos cromosomas X inactivado en las células del amnios de los embriones hembra.

Protocolo:

- Extraer una pequeña muestra de amnios del embrión.
- Introducir la en fijador metanol:ácido acético (3:1).
- Después de 1 minuto, transferir la muestra a un microtubo que contenga una gota de ácido acético al 60 % y agitar suavemente hasta disgregar el tejido.
- Transcurrido 1 minuto, extender la suspensión celular resultante sobre un portaobjetos que estará colocado sobre una placa termostática estabilizada a 60 °C.
- Recoger y expeler la gota sucesivamente en diferentes zonas del portaobjetos.
- Teñir la preparación directamente con azul de toluidina al 1 % y, tras colocar el cubreobjetos, observar inmediatamente al microscopio.

Preparaciones de material incluido en parafina

Una de las gónadas de cada individuo fue congelada en N₂ líquido inmediatamente después de la disección, con objeto de poder ser analizada posteriormente mediante técnicas moleculares. La otra gónada fue procesada de acuerdo con los métodos que se muestran a continuación para realizar estudios histológicos e inmunológicos.

3. Material y métodos

Fijación. Una vez extraídas, las gónadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4 %⁽ⁱ⁾, donde permanecieron un máximo de 24 horas.

Deshidratación e inclusión. Tras la fijación, se procede con el siguiente protocolo:

- Realizar dos lavados en PBS⁽ⁱⁱ⁾ de 20 minutos cada uno.
- Deshidratar las piezas en una serie de soluciones de etanol:PBS de menor a mayor concentración de etanol (EtOH 50 %, 70 %, 96 %, 100 %) dejándolas 20 minutos en cada solución.
- Sumergirlas en etanol 100 % durante toda la noche a -20°C .
- Pasar las piezas por las siguientes soluciones:
 - Etanol 100 % durante 2 horas a 4°C .
 - Mezcla etanol absoluto:xileno 1:1 durante 1 hora a temperatura ambiente.
 - Xileno durante 1 hora a temperatura ambiente.
 - Añadir xileno a temperatura ambiente y colocar en una estufa a 60°C durante 1 hora (para que las piezas se calienten gradualmente).
 - Mezcla xileno:parafina 1:1 durante 1 hora a 60°C .
 - Parafina durante 12-24 horas a 60°C .
 - Parafina nueva durante 4-5 horas a 60°C .

Confección de los bloques. Los bloques de parafina se realizaron en moldes de plástico. Durante este proceso se orientó la pieza en la posición deseada y se dejó solidificar a temperatura ambiente entre 4-5 horas. Transcurrido ese tiempo, los bloques se guardaron a 4°C hasta su uso.

Corte de los bloques. Previo tallado de los bloques de parafina, se obtuvieron cortes seriados de $8\mu\text{m}$ de espesor utilizando un microtomo rotativo tipo Minot.

Extensión y adhesión de los cortes. Para obtener las preparaciones histológicas, los cortes se colocaron flotando sobre un baño de agua destilada a 40°C (esta temperatura permite que la parafina se extienda sin llegar a fundirse). Después de unos minutos, los cortes se recogieron con portaobjetos tratados con TESPA⁽ⁱⁱⁱ⁾. Algunas de estas preparaciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina, mientras que el resto se utilizaron en técnicas de inmunofluorescencia.

Tinción y montaje. Las preparaciones fueron desparafinadas antes de ser teñidas. Para ello, se introdujeron los portaobjetos en racks de vidrio y se les aplicaron tres lavados con xileno de 10 minutos cada uno.

Posteriormente, las muestras fueron rehidratadas mediante la aplicación de alcoholes de mayor a menor gradación (EtOH 100 %, 96 %, 70 % y 50 %) y finalmente H₂O destilada.

Las preparaciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina según el siguiente protocolo:

- Teñir con hemalumbre de Harris^(iv) (reactivo con carácter básico que tiene afinidad por los componentes celulares ácidos como el núcleo, que se teñirá de violeta) durante 4-5 minutos.
- Virar el colorante mediante baño en H₂O corriente durante 5 minutos.
- Lavar con H₂O destilada durante 10 segundos.
- Teñir con Eosina^(v) (colorante de naturaleza ácida que presenta afinidad por componentes básicos como el citoplasma, que adquirirá un color rosado) durante unos 3 minutos.
- Deshidratar en la serie de alcoholes (50 %, 70 %, 96 % y 100 %) durante 4-5 segundos en cada uno.
- Sumergir en xileno durante 1 minuto.

Finalmente se aplicó el medio de montaje (DePeX) y se colocó un cubreobjetos sobre la muestra.

Preparaciones de material incluido en resina

Las preparaciones de cortes semifinos (2 μ m de grosor) se obtuvieron a partir de gónadas incluidas en resina con el siguiente protocolo:

- Se introducen las gónadas en un tubo con fijador Karnovsky^(vi) durante 1 hora.
- Se realizan 3 lavados en PBS de 20 minutos cada uno.
- Posteriormente, se fijan en OsO₄ al 1 % durante 2 horas.
- Una vez fijadas, se lavan 3 ó 4 veces en H₂O.
- Se deshidratan en una serie de alcoholes (EtOH 70 %, 90 % y 100 %) durante 15 minutos en cada uno.
- Tras la deshidratación, se sumergen en óxido de propileno durante 1 hora.

3. Material y métodos

- Se incluyen en epon/araldite:óxido de propileno (1:1) durante 2-3 horas a temperatura ambiente.
- Pasado ese tiempo, se colocan las muestras en un molde con epon/araldite recién mezclado, se dejan sumergir y se trasladan a un horno de 60 °C donde se dejan 24-48 horas para que ocurra la polimerización.

3.2.4. Inmunofluorescencia indirecta

Para analizar el patrón de expresión de los genes de estudio, se determinó la presencia o ausencia de las proteínas que codifican mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. El protocolo utilizado fue el siguiente:

- Poner las preparaciones en una placa termoestable estabilizada a 50 °C durante 20 minutos.
- Desparafinar con dos lavados de xileno de 20 minutos cada uno.
- Rehidratar las muestras en una serie de alcoholes de mayor a menor concentración (EtOH 100 %, 75 %, 50 % y 25 %) dejándolas 5 minutos en cada uno.
- Realizar dos lavados en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) de 5 minutos cada uno.
- Transferir las preparaciones a un vaso de Coplin que contenga citrato de sodio 0,01M *pH* 6 (excepto para el estudio del gen *SF1* que se utilizó a *pH* 2) y calentar en el microondas a la máxima temperatura hasta llevarlas a ebullición.
- Dejar enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Lavar con PBT durante 30 minutos.
- Bloquear con BSA al 10 % en PBT durante 1 hora en cámara húmeda.
- Exponer las preparaciones a una dilución de anticuerpo primario preparado en BSA al 1 % en PBT.
- Incubar a 4 °C durante toda la noche en cámara húmeda.
- Realizar tres lavados en PBT de 20 minutos cada uno.
- Añadir el anticuerpo secundario diluido en BSA al 1 % en PBT e incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad en cámara húmeda.
- Realizar dos lavados de PBT de 30 minutos cada uno en oscuridad.
- Montar en DAPI-Vectashield y observar al microscopio de fluorescencia.

En los cuadros 3.3 y 3.4 se muestran los anticuerpos utilizados.

Cuadro 3.3: Anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpo	Tipo	Conjugado	Origen	Procedencia
Anti-ratón (IgG)	policlonal	FITC	cabra	SIGMA. Ref. F2012
Anti-cabra (IgG)	policlonal	FITC	conejo	SIGMA. Ref. F7367
Anti-cabra (IgG)	policlonal	Cy3	conejo	SIGMA. Ref. C2821
Anti-conejo (IgG)	monoclonal	FITC	ratón	SIGMA. Ref. F4151
Anti-conejo (IgG)	policlonal	Cy3	oveja	SIGMA. Ref. C2306
Anti-conejo (IgG-P)	policlonal	Peroxidasa	cabra	SIGMA. Ref. A6154

3.2.5. Otros métodos inmunológicos

Debido a que los anticuerpos comerciales no reconocen las proteínas DAX1 y WNT4 de *Talpa*, fue necesario elaborar nuestros propios anticuerpos. Para ello, se sintetizaron péptidos cuya secuencia de aminoácidos se obtuvo con el paquete informático EMBOSS, compilado para Linux, el cual permite identificar regiones potencialmente antigénicas a partir de una secuencia de nucleótidos (Rice *y col.*, 2000).

Producción de anticuerpos frente a DAX1 de *Talpa*

Para la síntesis del péptido de DAX1, se utilizó una secuencia del gen de *T. occidentalis* de 355pb de longitud, correspondiente a la tercera y cuarta repetición del DBD (dominio de unión al ADN), clonada y secuenciada por Barrionuevo (2001).

```

5'-GCTGCTGCTT TTGCGGAGAA GACCACCCGC GGCAGGGCAG CATCCTCTAC
AGCTTGCTCA CCAGCGCAA GCAAACGCAC GTGGCTCCGG AAGCCCCGA
GGCGCGGCTG GGAGGCTCCT GGTGGGACCG GTCCTACTCG GCGCAGAGGC
CGGGGGCAG AGAGGAGCAG CTGGGCGGGA GGGTCGTGGC GCCCTGTGC
CGCTGCTGCT GCTGTGATGA AGACCACCCG CAGCCGGGCG GCATCCTGTA
CCACAAGCCC GGGAGCGCAA AGCAAACGCA CGCGGCTCCC GAGATGCCAT
CGGGGGCCCC CTGGTGGGAC CCCCCTGTG GCGCGGAGCG CCGGGTGACC
CTCAA-3'

```

Figura 3.2: Secuencia nucleotídica del fragmento de DAX1 utilizado.

La secuencia de aminoácidos se obtuvo con el programa *Transeq*. Esta aplicación del EMBOSS traduce una secuencia de nucleótidos según el código genético universal, generando las 6 posibles secuencias de aminoácidos (según las tres pautas de lectura en cada sentido). Posteriormente, se detectó la secuencia correcta mediante alineamiento con la secuencia de humano en las bases de datos del EMBL.

3. Material y métodos

Cuadro 3.4: Anticuerpos primarios utilizados.

Proteína	Descripción	Fuente del anticuerpo	Procedencia
AMH	Hormona anti-Mülleriana. Marcador de células de Sertoli.	Policlonal de cabra, obtenido a partir de la proteína humana.	Santa Cruz Biotech. Ref. sc-6886
α SMA	Actina de músculo liso. Marcador de células mioides peritubulares.	Policlonal de ratón, obtenido a partir de la proteína de conejo.	SIGMA. Ref. A2547
DAX1	Proteína implicada en el desarrollo gonadal.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de topo.	Elaborado en nuestro laboratorio.
DMRT1	Factor de transcripción DM. Marcador de células germinales y de Sertoli.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de ratón.	Dra. Silvana Guioli ^a
γ H2AX	Histona relacionada con la recombinación. Marcador meiótico.	Policlonal de ratón, obtenido a partir de la proteína humana.	Dr. Paul Burgoyne ^a
MT1-MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular. Marcador de células migratorias.	Monoclonal de ratón, obtenido a partir de la proteína humana.	Dra. Alicia G. Arroyo ^b
MVH	Helicasa de ARN dependiente de ATP. Marcador de células germinales.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de ratón.	Dr. Toshiaki Noce ^c
OCT4	Factor POU. Marcador pre-meiótico.	Policlonal de cabra, obtenido a partir de la proteína humana.	Santa Cruz Biotech. Ref. sc-8628
P450scc	Enzima que interviene en la síntesis de testosterona. Marcador de células de Leydig.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de oveja.	Dr. Fumiko Mitani ^d
PDGFR α	Receptor de factores PDGF que interviene en la transmisión de la señal inductora de la migración celular.	Policlonal de conejo obtenido a partir de la proteína humana.	Santa Cruz Biotech. Ref. sc-338
SF1	Factor esteroideogénico. Marcador de células de Leydig y de Sertoli.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de ratón.	Dr. Ken Morohashi ^e
SOX9	Factor de transcripción SOX. Marcador de células de Sertoli.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína humana.	Dr. Peter Goodfellow ^f
SYCP3	Proteína del complejo sinapinéptico. Marcador meiótico.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína humana.	Dr. José Luis Barbero ^g
WNT4	Proteína implicada en el desarrollo ovárico	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de topo.	Elaborado en nuestro laboratorio.

(a) National Institute for Medical Research, Londres, UK; (b) Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid; (c) Mitsubishi-Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo, Japón; (d) Department of Biochemistry and Integrative Medical Biology, Keio University, Tokyo, Japón; (e) National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japón; (f) Department of Genetics, University of Cambridge, UK; (g) Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología CSIC, Universidad Autónoma de Madrid.

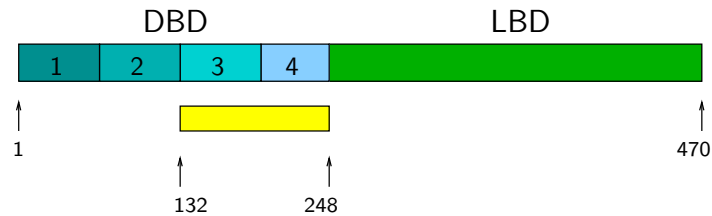


Figura 3.3: Esquema de la proteína *DAX1* humana (Zanaria y col., 1994). El bloque amarillo indica la posición de los aminoácidos codificados por el fragmento de ADN de *T. occidentalis* utilizado para la obtención del anticuerpo anti-*DAX1*. DBD: dominio de unión al ADN; LBD: dominio de unión al ligando.

Por otro lado, la región potencialmente antigénica del péptido obtenido fue determinada con el programa *Antigenic*, el cual utiliza el método de Kolaskar y Tongaonkar (1990). Este es un método semiempírico que se basa en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos y su frecuencia de aparición en epitopos conocidos. Mediante el análisis de un gran número de proteínas, estos autores comprobaron que los residuos hidrofóbicos Cys, Leu y Val, si están en la superficie de la proteína, presentan mayor probabilidad de formar parte de sitios antigénicos.

Una vez determinada la secuencia del oligopéptido, se encargó su elaboración y la posterior producción del anticuerpo específico a la compañía *SIGMA-GENOSYS*.

Producción de anticuerpos frente a WNT4 de *Talpa*

La síntesis del oligopéptido de WNT4 se llevó a cabo a partir de una secuencia del gen *WNT4* de topo. Para ello, se clonó y se secuenció un fragmento de ADN complementario (ADNc) de dicho gen, siguiendo el procedimiento detallado en el apartado 3.2.6 (*Métodos de análisis genético*).

La secuencia de aminoácidos de la región potencialmente más antigénica se obtuvo utilizando los programas *Transeq* y *Antigenic* de la misma manera que en el caso anterior; sin embargo, en esta ocasión, el oligopéptido fue sintetizado en el *Servicio de Síntesis de Péptidos* del *Centro de Biología Molecular (CBM)*, en Madrid. El anticuerpo anti-WNT4 se obtuvo como se indica a continuación.

Obtención de sueros inmunizados. Se inmunizó un conejo de la raza *Nueva Zelanda*, de dos meses de edad, con muestras que contenían el oligopéptido seleccionado de la proteína WNT4 de *T. occidentalis*. El conejo se mantuvo a 18 °C en un animalario en condiciones de esterilidad.

3. Material y métodos

El protocolo de inmunizaciones utilizado fue el siguiente:

- En una primera inmunización se inoculó, vía subcutánea, una mezcla de $900\mu g$ de péptido liofilizado, $300\mu l$ de adyuvante completo de Freud y $300\mu l$ de PBS.
- Se realizaron otras 4 inoculaciones, vía intramuscular, a intervalos de 10 días. En estas inmunizaciones, la mezcla preparada contenía $500\mu g$ de péptido liofilizado, $300\mu l$ de adyuvante incompleto de Freud y $300\mu l$ de PBS. Entre cada inmunización se midió el título del suero del conejo previa obtención de $1.5ml$ de sangre.
- Transcurridos 10 días después de la última inmunización, se sangraron los conejos de la vena marginal de la oreja y se realizó titulación mediante ELISA, obteniendo un título de $1/450$. Considerándose el título obtenido como alto, se realizó un segundo sangrado mediante punción cardiaca con el conejo anestesiado, para obtener muestras mayores de sangre.

Test de ELISA para detección de anticuerpos

El título del suero anti-WNT4 de conejo obtenido fue determinado por ELISA (*enzyme linked immunoabsorbent assay*), de la siguiente manera:

- Activar la placa de microtitulación añadiendo a los pocillos $25\mu l$ de metanol y dejando que se evapore.
- Añadir a cada pocillo $1\mu g$ de antígeno disuelto en $100\mu l$ de tampón carbonato^{vii} y dejar que el antígeno se fije a la placa durante 16 horas a $4^\circ C$ en cámara húmeda.
- Realizar tres lavados con PBT (Tween20 0.3% en PBS).
- Bloquear la placa añadiendo a cada pocillo $200\mu l$ de tampón de bloqueo (leche en polvo 2% en PBS + Tween20 0.1%) y dejándola 1 hora a $37^\circ C$.
- Realizar tres lavados con PBT.
- Añadir $100\mu l$ por pocillo de suero diluido en PBS de forma seriada ($1/12.5$, $1/50$, $1/100$, $1/200$, $1/400$, $1/800$, $1/1600$, $1/3200$, $1/6400$, $1/12800$) y dejarlo a $37^\circ C$ durante 45 min.
- Realizar cuatro lavados con PBT.
- Añadir $100\mu l$ de una dilución $1/1000$ de anticuerpo secundario conjugado (anti-conejo IgG marcado con peroxidasa) e incubar durante 30 min a $37^\circ C$.

- Realizar cuatro lavados con PBT.
- Agregar $1\mu\text{l}/\text{ml}$ de H_2O_2 30% (P/V) a la solución sustrato de la peroxidasa^{viii}, añadir $100\mu\text{l}$ de esta nueva solución a cada pocillo y dejar en oscuridad durante 20 min.
- Detener la reacción agregando al volumen de cada pocillo $50\mu\text{l}$ de solución de parada (HCl 3M).
- Medir la absorbancia a 492nm en un lector de ELISA y determinar la concentración más baja de suero que presenta inmuno-reactividad.

3.2.6. Métodos de análisis genético molecular

Para obtener anticuerpos anti-WNT4 y anti-DAX1 específicos de *Talpa*, se realizaron diversas técnicas moleculares cuyos protocolos se muestran a continuación.

Extracción de ADN genómico

Se utilizó ADN genómico de *T. occidentalis* como control positivo. La extracción de dicho ADN se realizó siguiendo el método descrito por Sambrook *y col.* (1989) con algunas modificaciones, tal como se muestra a continuación.

- Extraer el bazo y homogeneizarlo en PBS.
- Centrifugar a 1000rpm durante 10 minutos.
- Desechar el sobrenadante y lavar el precipitado 2 veces más en PBS, centrifugando a 1000rpm durante 10 minutos cada vez.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 4ml de tampón de extracción^(ix).
- Añadir $50\mu\text{l}$ de solución de proteinasa K^(x) y 4ml de tampón de lisis^(xi).
- Mezclar suavemente e incubar durante 5-12 horas en un baño de agua caliente a 56°C .
- Añadir $100\mu\text{l}$ de una solución de ARNasa^(xii) e incubar a 37°C durante 3 horas.
- Añadir un volumen igual de fenol, mezclar y centrifugar a 14000rpm durante 10 minutos.
- Transferir la fase acuosa (fase superior que contiene el ADN) a un tubo nuevo.

3. Material y métodos

- Realizar otras dos extracciones, la primera de ellas con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y la segunda con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). En ambas extracciones se añade un volumen igual al de la muestra.
- Pasar el ADN (fase acuosa) a un tubo en hielo y añadir $200\mu\text{l}$ de NaCl $5M$ y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C .
- Mezclar suavemente e incubar en hielo durante 30 minutos.
- Recoger el ADN enrollándolo en una pipeta Pasteur con la punta sellada por calor.
- Introducir la pipeta con el ADN en etanol al 70 % a -20°C y lavar.
- Secar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.
- Resuspender en agua ultrapura autoclavada.
- Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (para comprobar el estado del ADN) y almacenar a 4°C .

Extracción de ARNm

La clonación de un fragmento de *WNT4* de topo se llevó a cabo a partir de ADNc. Para ello, se realizó una extracción de ARNm en gónadas de individuos comprendidos entre 19 dpc y 3 dpp. El tejido se homogeneizó de acuerdo con el siguiente método, desarrollado en nuestro laboratorio.

- Extraer las gónadas mediante microdisección y colocarlas en un trozo de vidrio de $5\times 15\text{mm}$ (obtenido cortando un portaobjetos convencional, que previamente es sumergido durante 10 minutos en H_2O_2 al 3% y secado a la llama tras ser enjuagado en metanol).
- Añadir una gota de agua ultrapura estéril al vidrio (para evitar que se forme una pasta seca).
- Ejercer presión sobre el tejido deslizando un segundo vidrio similar al anterior, hasta conseguir una buena maceración.
- Introducir los vidrios en un criotubo de 2ml y añadir 1ml de tampón de lisis.
- Agitar el criotubo vigorosamente en un vortex y centrifugarlo durante 3 minutos a 14000rpm .
- Retirar los vidrios con unas pinzas rectas previamente flameadas y almacenar la muestra en N_2 líquido hasta su uso.

Una vez obtenido el homogeneizado, se procedió a la extracción de todo el ARNm del tejido usando el «*mRNA Capture Kit*» de *ROCHE*. El protocolo de este kit comienza con la adición de una *sonda de captura*, que consiste en un oligo(dT)₂₀ unido a biotina, a un volumen del homogeneizado diluido en tampón de lisis hasta completar un total de 25 μ l. Una vez que la cola de 3'-Poli(A) del ARNm se une a la *sonda de captura*, se traslada todo el volumen a un tubo de 0,2ml que tiene las paredes recubiertas de estreptavidina. La biotina del oligo(dT)₂₀ se une a las moléculas de estreptavidina formando un complejo biotina-estreptavidina, de manera que el ARNm queda unido a las paredes del tubo. Por último, para eliminar el ADN genómico y otras impurezas, se realizan 3 lavados con tampón de lavado. Los tubos con el ARNm pueden ser utilizados para obtener amplificadores de ADNc mediante RT-PCR.

Diseño de oligonucleótidos para PCR y RT-PCR

Se diseñó una pareja de oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen *WNT4* de *T. occidentalis*. Para ello, se alinearon las secuencias de este gen en humano, ratón y cerdo obtenidas en las bases de datos del EMBL. La elección de los oligonucleótidos se realizó con el programa *Primer3* (Rozen y Skaletsky, 1998), el cual considera la longitud de los cebadores, la temperatura teórica de hibridación, el contenido en GC, la probabilidad de formación de dímeros entre ambos cebadores y el tamaño del producto final de PCR. Los oligonucleótidos elegidos fueron los siguientes:

WNT4(524S): 5'-TTG TGG ATG TGC GGG AGA G-3'

Correspondiente a los nucleótidos 506 a 524 en la secuencia del ARNm de humano a partir del codón de inicio de la traducción.

WNT4(779AS): 5'-TGT GTG CGG CTT GAA CTG TG-3'

Correspondiente a los nucleótidos 779 a 798 en la secuencia del ARNm de humano a partir del codón de inicio de la traducción.

Estos oligonucleótidos flanquean un fragmento de 963pb en el ADN genómico humano. El cebador *con sentido* (S), con la misma secuencia del ARNm, se localiza en el cuarto exón. A su vez, el cebador *anti-sentido* (AS), con secuencia complementaria al ARNm, está situado en el quinto exón. Ambos exones están separados por un intrón de 690pb (ver figura 3.4).

El tamaño esperado del fragmento amplificado a partir de ADNc es de 293pb, de los que 21pb corresponden a los dos cebadores y 254pb al fragmento que se pretende aislar (ver figura 3.5). La temperatura teórica de hibridación de los cebadores es de 62°C.

3. Material y métodos

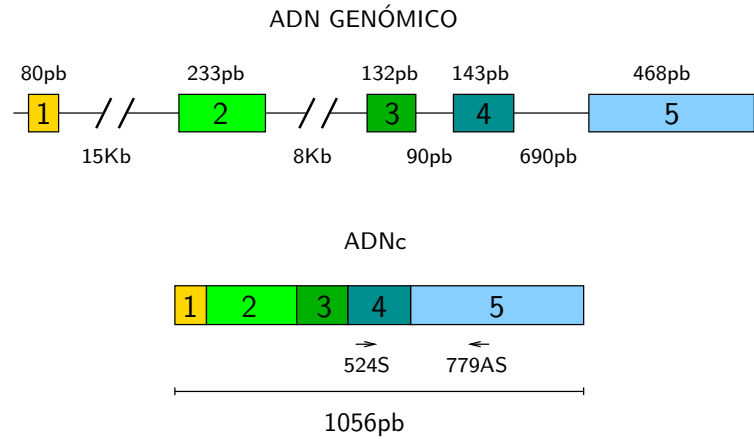


Figura 3.4: Esquema del gen *WNT4* humano (Jordan *y col.*, 2001). Las flechas indican los cebadores diseñados y el lugar donde hibridan en el ADNc.

```

506 TTGTGGATGT GCGGGAGAGa agcaaggggg cctcgtccag cagagccctc
556 atgaacctcc acaacaatga ggccggcagg aaggccatcc tgacacacat
606 gcggttgaa tgcaagtgcc acggggtgtc aggctcctgt gaggtaaaga
656 cgtgctggcg agccgtgcc ccttccgcc aggtgggtca cgactgaag
706 gagaagttg atggtgccac tgagggtgag ccacgccgcg tgggctcctc
756 cagggcactg gtgccacgca acgCACAGTT CAAGCCGCAC ACA

```

Figura 3.5: Secuencias a las que se unen los oligonucleótidos 524S y 779AS (representadas en mayúscula) en el ADNc del gen *WNT4* humano. La secuencia está numerada a partir del primer nucleótido codificante.

Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con el siguiente protocolo:

- Se añaden 50ng de ADN genómico de topo.
- Se prepara la mezcla de componentes:
 - Tampón PCR 10X: 2.5 μ l.
 - Cloruro de magnesio (25mM): 1.5 μ l.
 - Oligonucleótidos (10mM): 0.5 μ l de cada uno.
 - dNTPs (10mM): 0.5 μ l.
 - Taq Polimerasa (2U/ μ l): 0.5 μ l.
 - Agua ultrapura filtrada y autoclavada: 19 μ l.
- Se agita y se centrifuga levemente.
- Se añaden 24 μ l de mezcla al molde.
- Se introducen los tubos de PCR en el termociclador.

La temperatura de hibridación de los cebadores fue determinada empíricamente tomando como referencia la temperatura teórica. Los ciclos de temperatura usados fueron los siguientes.

- (96 °C, 5 min) x 1
- (94 °C, 30 seg) (X °C, 30 seg) (72 °C, 30 seg) x 30
- (72 °C, 10 min) x 1

X = temperatura óptima para cada pareja de oligonucleótidos.

RT-PCR

El fragmento de ADNc de *WNT4* de *Talpa* utilizado para la obtención del anticuerpo anti-WNT4, se aisló mediante las reacciones de transcripción inversa y amplificación por PCR (RT-PCR). Ambas reacciones pueden producirse sucesivamente en el mismo tubo en donde se extrajo el ARNm. Para ello, se utiliza una mezcla de enzimas («*Titan One Tube RT-PCR System*» de *ROCHE*) que contiene la transcriptasa inversa AMV-RT y la Taq-polimerasa. Al realizarse las dos reacciones en el mismo tubo y de forma secuencial, el oligonucleótido anti-sentido actúa como cebador de la transcripción inversa y de la PCR. Para llevar a cabo la RT-PCR se preparó la siguiente mezcla de componentes, en un volumen final de 50 μ l.

3. Material y métodos

- Tampón 5X: 10.0 μ l.
- DTT (100mM): 2.5 μ l.
- Oligonucleótidos (10mM): 2.0 μ l de cada uno.
- dNTPs (10mM): 1.0 μ l.
- Mezcla de enzimas: 1.0 μ l.
- Agua ultrapura filtrada y autoclavada: 31.5 μ l.

Los ciclos de temperatura usados fueron los siguientes.

- (50 °C, 30 min) x 1 (Durante este paso ocurre la reacción de transcripción inversa, en la que se sintetiza la primera hebra de ADNc.)
- (96 °C, 5 min) x 1
- (94 °C, 30 seg) (*X* °C, 30 seg) (72 °C, 30 seg) x 30
- (72 °C, 10 min) x 1

X = temperatura óptima para cada pareja de oligonucleótidos.

Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y extraídos usando el «*Agarose Gel DNA Extraction Kit*» de *ROCHE*, según las instrucciones del fabricante. Este método se basa en la unión del ADN a una matriz de sílice en condiciones de elevada fuerza iónica, tras la solubilización de la agarosa con sales caotrópicas. Posteriormente esta matriz se lava varias veces para, finalmente, eluir el ADN con agua estéril.

Clonación de fragmentos génicos

Una vez purificado, el fragmento amplificado del gen *WNT4* de *T. occidentalis* fue clonado tal como se indica a continuación.

Preparación del vector. La clonación de productos de PCR se realizó con el vector *PGEM-T* de *PROMEGA* («*PGEM vector T System 1*»). Este vector presenta extremos protuberantes en 3' en los que hay dTTP, lo que permite su ligado con los productos de PCR obtenidos con polimerasas Taq, que dejan extremos protuberantes en 3' en los que suele encontrarse un dATP. Además confiere resistencia a la ampicilina y permite seleccionar las bacterias recombinantes en medios con IPTG y X-gal usando una cepa bacteriana hospedadora adecuada. Para esta finalidad se usó la cepa *XL1-Blue MRF'* de *Escherichia coli*.

3.2. Métodos

Ligado del ADN con el vector. El ligado se llevó a cabo poniendo una proporción 2:1 de plásmido y producto de PCR purificado (inserto), en presencia de la ligasa del *fago T4* de *ROCHE*. La mezcla de componentes utilizada fue la siguiente:

- 7 μ l de solución de inserto (a una concentración adecuada).
- 1 μ l de vector T (concentración dependiente de la relación molar).
- 1 μ l de tampón de ligasa 10X.
- 1 μ l de ligasa de T4 (1U/ μ l).

Las muestras fueron incubadas a 22 °C durante 6-12 horas.

Preparación de bacterias competentes. La cepa *XL1-Blue MRF'* se preparó según el siguiente protocolo:

- Sembrar una placa de medio mínimo M9^(xiii) con *XL1-Blue MRF'* procedente de un stock glicerolado.
- Incubar toda la noche a 37 °C.
- Aislar una colonia y sembrar con ella 5ml de medio LB líquido^(xiv) e incubar a 37 °C durante toda la noche con agitación.
- Inocular 40ml de medio LB líquido con 0,4ml del cultivo anterior e incubar a 37 °C con agitación.
- Medir la DO a 540nm periódicamente hasta que ésta alcance un valor comprendido entre 0,4-0,6.
- Enfriar el cultivo en hielo y centrifugar a 4000rpm y a 4 °C durante 10 minutos.
- Resuspender el precipitado en 20ml de una solución estéril y fría de CaCl₂ 50mM.
- Incubar 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 4000rpm y a 4 °C durante 10 minutos.
- Resuspender el sobrenadante en 4ml de la solución CaCl₂ 50mM.
- Incubar en hielo durante varias horas antes de usar las bacterias.

Las bacterias competentes se pueden almacenar en glicerol (solución estéril de glicerol 15 % en CaCl₂ 50mM) a -70 °C un tiempo máximo de 6 meses.

3. Material y métodos

Transformación de bacterias competentes. La transformación de las bacterias competentes con el producto de ligado se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Añadir $200\mu\text{l}$ de una suspensión de bacterias competentes y $2\mu\text{l}$ de la mezcla de ligado en un tubo de $1,5\mu\text{l}$.
- Incubar en hielo durante 30 minutos.
- Incubar a 42°C durante 40 segundos y pasar rápidamente a hielo donde permanecerán 3 minutos.
- Añadir 1ml de medio LB líquido e incubar 1 hora a 37°C .
- Sembrar alícuotas de $100\mu\text{l}$ de las bacterias transformadas en placas con medio LB sólido^(xv) con ampicilina, IPTG y X-gal.
- Puede verificarse la presencia de colonias transformadas en las placas, debido a que éstas presentan color blanco, al contrario que las bacterias transformadas con plásmidos no recombinantes que aparecerán de color azul.

Análisis de los transformantes positivos. La presencia de inserto en los plásmidos procedentes de clones positivos se comprobó mediante digestión con enzimas de restricción con dianas situadas en el *poli-linker*, o sitio de multiclonación, del vector a ambos lados del inserto y posterior análisis mediante electroforesis en gel de agarosa.

Minipreparaciones de ADN plasmídico

Para la obtención del inserto clonado se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico utilizando el «*QIAprep Spin Kit*» de *QIAGEN*. Este método utiliza columnas formadas por una membrana de silica-gel que, previo lisado de las bacterias transformadas, retiene cantidades superiores a $20\mu\text{g}$ de DNA plasmídico a altas concentraciones de sales caotrópicas y permite la elución en un pequeño volumen de tampón bajo en sales.

Secuenciación con dideoxinucleótidos marcados

El producto final de PCR fue secuenciado con el siguiente protocolo:

- Se prepara la reacción de secuenciación.
 - Premix (dNTPs, ddNTPs y polimerasa): $4\mu\text{l}$
 - Tampón 5X: $4\mu\text{l}$

3.2. Métodos

- DNA molde: 400ng
- Cebador ($1\mu M$): $3\mu l$
- H₂O ultrapura: hasta un volumen final de $20\mu l$
- Se realiza una amplificación lineal en el termociclador usando las siguientes temperaturas:
 - ($94^{\circ}C$, 3 min) x 1
 - ($96^{\circ}C$, 10 seg) ($50^{\circ}C$, 10 seg) ($60^{\circ}C$, 4 min) x 25
- Se precipita el ADN con etanol/NaOAc:
 - Añadir $80\mu l$ de la mezcla etanol/NaOAc ($62,5\mu l$ de etanol 95 % + $3\mu l$ de NaOAc 3M pH 4,6 + $14,5\mu l$ de H₂O) a los $20\mu l$ de reacción de secuenciación.
 - Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
 - Centrifugar a $14000rpm$ durante 20 minutos.
 - Eliminar la solución de etanol cuidadosamente.
 - Añadir $250\mu l$ de etanol 70 %.
 - Centrifugar a $14000rpm$ durante 15 minutos.
 - Eliminar completamente la solución de etanol.
 - Dejar secar el tubo abierto a $37^{\circ}C$ durante unos 5 minutos (el ADN seco se puede almacenar a $-20^{\circ}C$ durante un año).
- Añadir $20\mu l$ de formamida y cargar la muestra en el secuenciador (puede almacenarse a $4^{\circ}C$ tapado con papel de aluminio un máximo de una semana).

3. Material y métodos

3.3. Preparación de soluciones y medios

(i) **Paraformaldehído al 4 %**

Para un volumen total de 1l:

- Calentar 600ml de H₂O destilada en un matraz.
- Cuando la temperatura oscile entre 55 – 60 °C, añadir 40g de paraformaldehído y agitar vigorosamente.
- Para facilitar la disolución, añadir unas 5 ó 6 gotas de NaOH 1N.
- Cuando la solución esté transparente, añadir 100ml de PBS 10X.
- Filtrar.
- Ajustar el *pH* a 7.4.
- Añadir H₂O hasta completar 1l y autoclavar.

(ii) **PBS**

Para un volumen total de 1l:

- Pesar los siguientes componentes¹:
 - NaCl: 8g
 - KCl: 0.2g
 - Na₂HPO₄: 1.44g
 - KH₂PO₄: 0.24g
- Disolverlos en 800ml de agua destilada.
- Ajustar el *pH* a 7.4.
- Añadir H₂O hasta completar 1l y autoclavar.

¹Alternativamente, se puede preparar esta solución diluyendo 100ml de PBS 10X en 900ml de H₂O destilada. El PBS 10X se prepara de igual manera que el PBS 1X, pero multiplicando por diez las cantidades de cada una de las sales

3.3. Preparación de soluciones y medios

(iii) Portas con TESPА

- Desengrasar los portaobjetos conservándolos en una solución de HCl al 10% y etanol 70%.
- Enjuagar los portaobjetos con agua destilada y dejarlos secar en una estufa a 40°C.
- Una vez secos, sumergir los portaobjetos en una solución de TESPА al 2% en acetona durante 40 segundos.
- Pasarlos brevemente por dos cubetas con acetona y mantenerlos 10 minutos en una tercera con H₂O destilada.
- Dejarlos secar a 37°C durante toda la noche y guardarlos en cajas cerradas.

(iv) Hemalumbre de Harris

- Preparar por separado las siguientes soluciones:
 - 2g de hematoxilina en 20ml de etanol absoluto.
 - 40g de alumbre potásico (sulfato de Al y K) en 400ml de H₂O destilada.
- Transcurridas 24 horas, mezclar ambas soluciones añadiendo 1g de HgO.
- Calentar la solución y dejarla enfriar a temperatura ambiente.
- Filtrar y conservar en una botella de vidrio ámbar.

(v) Colorante de Eosina

- Disolver 4.5g de eosina en 450ml de H₂O destilada.
- Añadir 4 gotas de ácido acético glacial.
- Filtrar y conservar en una botella de vidrio ámbar.

3. Material y métodos

(vi) Karnowsky

Para un volumen total de 5ml:

- Añadir en un tubo de 10ml los siguientes componentes:
 - Paraformaldehido al 4%: 1.25ml
 - Cacodilato sódico 0.4M pH 7.3-7.4: 1.25ml
 - Glutaraldehido 25%: 0.5ml
 - Carbonato cálcico 0.25%: 1ml
 - H₂O destilada: 1ml
- Agitar en un vortex.

(vii) Tampón carbonato 0.1M

Para un volumen total de 500ml:

- Pesar los siguientes componentes:
 - Na₂CO₃: 5.30g
 - NaHCO₃: 4.24g
- Ajustar pH 9.3

(viii) Solución sustrato de la peroxidasa

Para un volumen total de 25ml:

- Añadir los siguientes componentes:
 - Tampón citrato sódico 0.15M pH 5: 12.5ml
 - H₂O desionizada: 12.5ml
 - 1 pastilla de OPD² (O-fenil diaminobenzidina)
- Cubrir con papel de aluminio y almacenar a 4°C una semana como máximo.

²OPD: O-Phenylendiamina dihydrochloride tablet (10mg/tablet), ref. SIGMA P8287-50TAB.

3.3. Preparación de soluciones y medios

(ix) Tampón de extracción

La solución contiene los siguientes componentes:

- Tris-HCl 10mM pH 7.5
- NaCl 10mM
- EDTA 2mM

(x) Solución de proteinasa K

- Disolver 100mg de proteinasa K liofilizada en 10ml de H₂O ultrapura estéril.

(xi) Tampón de lisis

La solución contiene los siguientes componentes:

- Tris-HCl 10mM pH 7.5
- NaCl 10mM
- EDTA 2mM
- SDS 5%

(xii) Solución de ARNasa libre de ADNasa

- Preparar la siguiente solución:
 - Tris-ClH 10mM pH 7.5
 - NaCl 15mM
- Disolver ARNasa A a una concentración de 10mg/ml en la solución anterior.
- Calentar la solución resultante a 100°C durante 15 minutos para inactivar las ADNasas.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

3. Material y métodos

(xiii) Placas con medio mínimo M9

Para 500ml de medio:

- Preparar por separado y autoclavar cada uno de los siguientes componentes:
 - 450ml de H₂O ultrapura con 7.5g de bacto-agar.
 - 50ml de solución salina M9, compuesta por:
 - Na₂HPO₄: 60g
 - KH₂PO₄: 30g
 - NH₄Cl: 10g
 - NaCl: 5g
 - Añadir agua ultrapura hasta un volumen final de 1l.
 - 0.5ml de solución 1M de MgSO₄.
 - 0.05ml de solución 1M de CaCl₂.
 - 2.5ml de solución de vitamina B1 (1mg/ml), esterilizada por filtración.
 - 5ml de solución estéril de glucosa al 20%.
- Mezclar todos los componentes en condiciones de esterilidad cuando se hayan enfriado a unos 50°C.

(xiv) Medio LB

Para 1l de medio:

- Mezclar los siguientes componentes:
 - Bacto-triptona: 10g
 - Extracto de levadura: 5g
 - NaCl: 10g
 - H₂O destilada: 950ml
- Ajustar el *pH* a 7.0 con NaOH 5N y completar hasta un volumen final de 1l.
- Autoclavar.
- Dejar enfriar y añadir 1ml de una solución de ampicilina de 100mg/ml cuando la temperatura baje a unos 50°C.

3.3. Preparación de soluciones y medios

(*xv*) Medio LB sólido

- Colocar *1l* de medio LB líquido en un matraz.
- Añadir *15g* de agar.
- Autoclavar.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente hasta que alcance una temperatura de unos 50°C .
- Si se requieren antibióticos, añadir *1ml* de una solución de ampicilina de 100mg/ml .
- Repartir en placas de Petri.

4. Resultados

Contenidos

4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4	90
4.1.1. Obtención de anticuerpos a partir de la secuencia de un fragmento del gen <i>DAX1</i> de <i>Talpa</i>	90
4.1.2. Clonación de un fragmento del gen <i>WNT4</i> de <i>Talpa</i> y obtención de anticuerpos a partir de su secuencia.	94
4.1.3. Análisis de la especificidad de los anticuerpos obtenidos	98
4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual	99
4.2.1. SF1	99
4.2.2. SOX9	102
4.2.3. DAX1	104
4.2.4. WNT4	106
4.2.5. AMH	110
4.2.6. DMRT1	112
4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano	114
4.3.1. MT1-MMP	114
4.3.2. PDGFR α	118
4.4. Caracterización molecular de las células germinales	122
4.4.1. Distribución de las PGCs en el desarrollo gonadal temprano	122
4.4.2. Localización de las células germinales XX	124
4.4.3. Localización de las células germinales XY	124
4.4.4. Comienzo de la meiosis femenina	128
4.4.5. Expresión de <i>DMRT1</i> en células germinales XX	130
4.5. Caracterización molecular de las células de Leydig	132

4. Resultados

4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4 específicos de *Talpa*

El estudio del patrón de expresión de los genes analizados en este trabajo se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Para ello, se utilizaron anticuerpos comerciales frente a proteínas humanas y murinas que reconocen regiones muy conservadas evolutivamente. No obstante, los anticuerpos disponibles frente a DAX1 y WNT4 no resultaron ser inmuno-reactivos frente a las proteínas de *T. occidentalis*, por lo que fue necesario producir anticuerpos específicos a partir de éstas.

4.1.1. Obtención de anticuerpos a partir de la secuencia de un fragmento del gen *DAX1* de *T. occidentalis*

Con objeto de obtener anticuerpos que reconociesen la proteína DAX1 de *Talpa*, se analizó la secuencia del péptido correspondiente a la tercera y cuarta repetición del dominio DBD (ver figuras 3.2 y 3.3). Esta secuencia se obtuvo con el paquete informático EMBOSS a partir de la secuencia nucleotídica de un fragmento del gen *DAX1* de *T. occidentalis* clonado previamente en nuestro laboratorio (Barrionuevo, 2001). Dicho fragmento tiene un tamaño de 355 *pb* (figura 4.5) y tanto su secuencia como la del péptido que codifica presentan una alta homología con las secuencias respectivas de humano y ratón obtenidas en las bases de datos del EMBL, tal como se muestra en las figuras 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4.

Utilizando la aplicación *Antigenic*, se determinó que la región con mayor antigenicidad potencial del péptido es la comprendida entre los aminoácidos 60 y 74. Este oligopéptido está formado por 15 residuos y su secuencia es la siguiente:

RVVAPLCRCCCCDED

Una vez producido el oligopéptido, se llevó a cabo el proceso de inmunización y se obtuvo un suero de conejo cuya especificidad para detectar la proteína DAX1 se analiza en el apartado 4.1.3.

4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4

T. occidentalis H. sapiens Consenso	G C T G C T G C T T T T G c G G a G A A G A C C A C C C G C G C T G C T G C T T T T G t G G t G A A G A C C A C C C G C *	30 30
T. occidentalis H. sapiens Consenso	G G C A G G G C A G C A T C C T C T A C A G C T T G C T C A G G C A G G G C A G C A T C C T C T A C A G C T T G C T C A *	60 60
T. occidentalis H. sapiens Consenso	C c A G C g C c A A G C A A A C G C A C G T G G C T C C G G C t A G C t C a A A G C A A A C G C A C G T G G C T C C G G *	90 90
T. occidentalis H. sapiens Consenso	a A G C c C C C G A G G C g C G G C t g G G a G G C t c c T c A G C g C C C G A G G C a C G G C c a G G g G G C g C g T *	120 120
T. occidentalis H. sapiens Consenso	G G T G G G A C C G g T C C T A C T c g G C G C A G A G G C G G T G G G A C C G c T C C T A C T t c G C G C A G A G G C *	150 150
T. occidentalis H. sapiens Consenso	C g G G G G G c A g A G A G G a G C a g C t g G G C G G G a C a G G G G G t A a A G A G G c G C t a C c a G G C G G G a *	180 180
T. occidentalis H. sapiens Consenso	G G G t C g t G G C G C c c C T G T g C C G C T G C T G C T G G G c C a c G G C G C t t C T G T a C C G C T G C T G C T *	210 210
T. occidentalis H. sapiens Consenso	g c T G t G a T G A A G A C C A C C C G C A G C c G G G C g t t T G c G g T G A A G A C A C C C G C A G C a G G G C a *	240 240
T. occidentalis H. sapiens Consenso	G C A t C C T g T A C c a C a a G C C C g g G A G C g C A A G C A c C C T c T A C t g C g t G C C C a c G A G C a C A A *	270 270
T. occidentalis H. sapiens Consenso	A g C A A a C G C A c G C G G C T C C c G A G a t G C c a t A t C A A g C G C A g G C G G C T C C g G A G g a G C g g c *	300 300
T. occidentalis H. sapiens Consenso	C G g G G G C C C C T G G T G G G A C c C C c C g T g T G C G a G G G C C C C T G G T G G G A C a C C t C c T c T G *	330 330
T. occidentalis H. sapiens Consenso	G c G C G g a G C G c C g G G T G a C c C T C A A G t G C G c t G C G g C c G G T G g C g C T C A A *	355 355

Figura 4.1: Comparación de secuencias del gen *DAX1* de *T. occidentalis* (Barriónuevo, 2001) y *H. sapiens*. Alineados: 355, coinciden (amarillo): 288, huecos: 0 (0%), homología: 81.1%. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

4. Resultados

T. occidentalis	G C T G C T G C T T t T G C G G A G A A G A c C A C C C G c	30
M. musculus	G C T G C T G C T T c T G C G G A G A A G A g C A C C C G a	30
Consenso	* *	
T. occidentalis	G G C A G G G C A G C A T C c T c T A C A G C T T G C T C A	60
M. musculus	G G C A G G G C A G C A T C t T a T A C A G C T T G C T C A	60
Consenso	* *	
T. occidentalis	C c A G C G C c a A G C A A A C G C A C G T G g C T C c G G	90
M. musculus	C t A G C G C t c A G C A A A C G C A C G T G t C T C g G G	90
Consenso	* *	
T. occidentalis	A A G C c C C C G A G G C g C g g C t g g G A G G C t c c T	120
M. musculus	A A G C a C C C G A G G C a C a t C g c a G A G G C g a g T	120
Consenso	* *	
T. occidentalis	G G T G G g A c C g G T C C T A C T c g g C g C A G A G g c	150
M. musculus	G G T G G c A g c t G T C C T A C T g t a c C C A G A G t g	150
Consenso	* *	
T. occidentalis	c G G G g G G C a g A G A G G a G C a G C t G g G C g g g a	180
M. musculus	t G G G t G G C c c A G A G G g G C t G C a G a G C a c a c	180
Consenso	* *	
T. occidentalis	g G G t C g T G G C G c c C C T G T g C C G C t G C T g c t	210
M. musculus	a G G c c a T G G C G t t C C T G T a C C G C a G C T a t g	210
Consenso	* *	
T. occidentalis	g c T G t G a T G A A G A c C A c C C g C A G C a G g g C g	240
M. musculus	t g T G c G g T G A A G A g C A g C C c C A G C a G a t C a	240
Consenso	* *	
T. occidentalis	G C a T . . C C T g T a c C A C A A G C C C G g G A G C G C	268
M. musculus	G C g T T G C C T c T g g C A C . . G C C C G t G A G C G C	268
Consenso	* *	
T. occidentalis	A a A g C A A A C g C a c G C G g C t C C . C g A G A T G C	297
M. musculus	A g A c C A A A C a C c a G C G a C c C C G c a A G A . G C	297
Consenso	* *	
T. occidentalis	c a t C G g G G G C c C C C T G G T G G G A C c C C c C g t	327
M. musculus	a g c C G a G G G C t C C C T G G T G G G A C g C C t C a c	327
Consenso	* *	
T. occidentalis	g T G G c G c G g A G C G c C g G g T g A C c C T C A A	355
M. musculus	c T G G t G t G c A G C G t C t G a T c A C a C T C A A	355
Consenso	* *	

Figura 4.2: Comparación de secuencias del gen *DAX1* de *T. occidentalis* (Barriónuevo, 2001) y *M. musculus*. Alineados: 352, coinciden (amarillo): 259, huecos (punto): 6 (1.7%), homología: 72.3%. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4

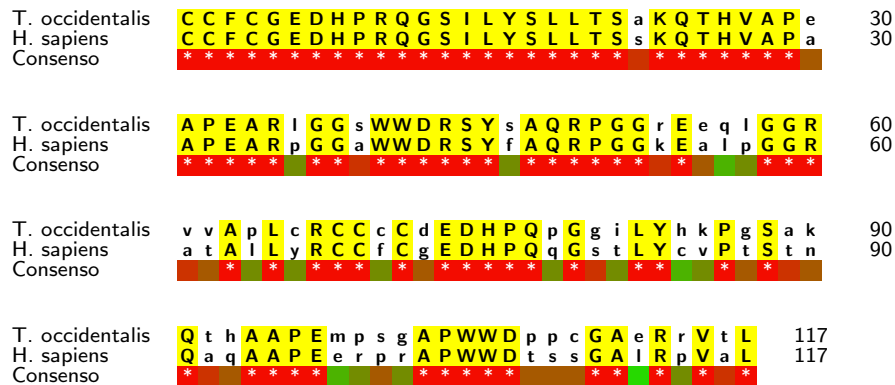


Figura 4.3: Comparación de secuencias del péptido de DAX1 de *T. occidentalis* (Barrionuevo, 2001) y *H. sapiens*. Alineados: 117, coinciden (amarillo): 82, similares: 85, huecos: 0 (0%), homología: 70.1%, similitud: 72.6%. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

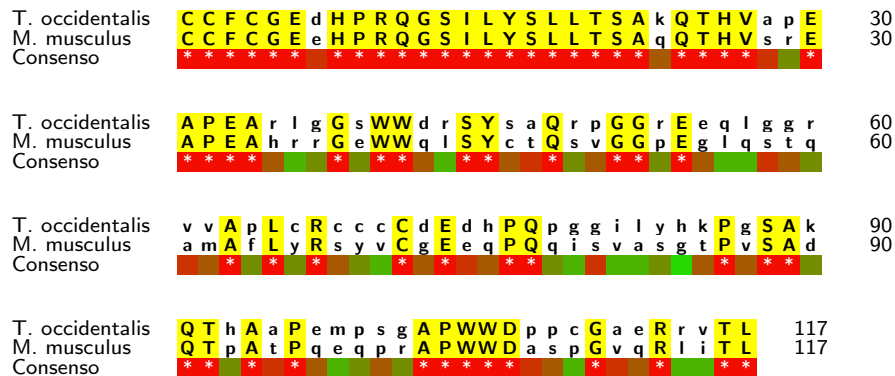


Figura 4.4: Comparación de secuencias del péptido de DAX1 de *T. occidentalis* (Barrionuevo, 2001) y *M. musculus*. Alineados: 117, coinciden (amarillo): 62, similares: 72, huecos: 0 (0%), homología: 53.0%, similitud: 61.5%. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

4. Resultados

4.1.2. Clonación de un fragmento del gen *WNT4* de *T. occidentalis* y obtención de anticuerpos a partir de su secuencia.

A partir de ADNc de gónadas XX de *T. occidentalis*, y usando los cebadores descritos previamente, se amplificó por PCR un fragmento de 293 pb del gen *WNT4*, tal como se muestra en la figura 4.5. En esta figura, se observa también el producto obtenido con los mismos oligonucleótidos utilizando como molde ADN genómico de *Talpa*. El tamaño de este fragmento es mayor (unos 700 pb) debido a la presencia de un intrón entre las regiones a las que se unen los cebadores.

El fragmento de ADNc amplificado se clonó y secuenció. La secuencia obtenida presenta una homología muy alta con las correspondientes de humano y ratón (figuras 4.6 y 4.7) y el péptido que codifica es idéntico al de estas dos especies (figuras 4.8 y 4.9).

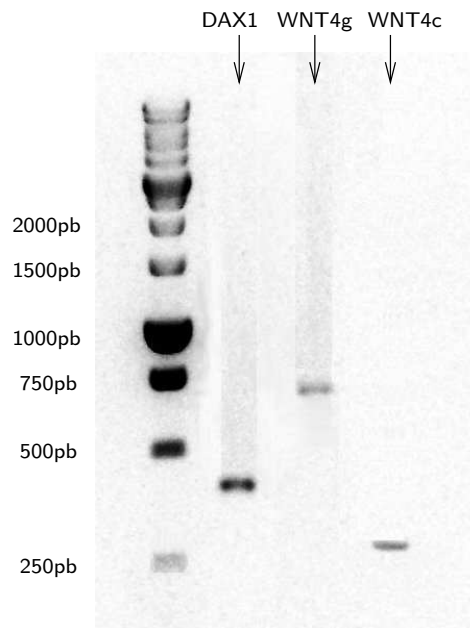


Figura 4.5: Electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) de productos de PCR obtenidos a partir de ADN genómico (DAX1 y WNT4g) y de ADNc (WNT4c) de *T. occidentalis*. Los fragmentos de *DAX1* y *WNT4* amplificados a partir de ADN genómico tienen un tamaño de 399pb (44 corresponden a los cebadores) y unos 700pb (39 corresponden a los cebadores), respectivamente; la longitud del fragmento de ADNc de *WNT4* (WNT4c) es de 293pb (39 corresponden a los cebadores), debido a que carece del intrón que separa los exones 4 y 5.

4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4

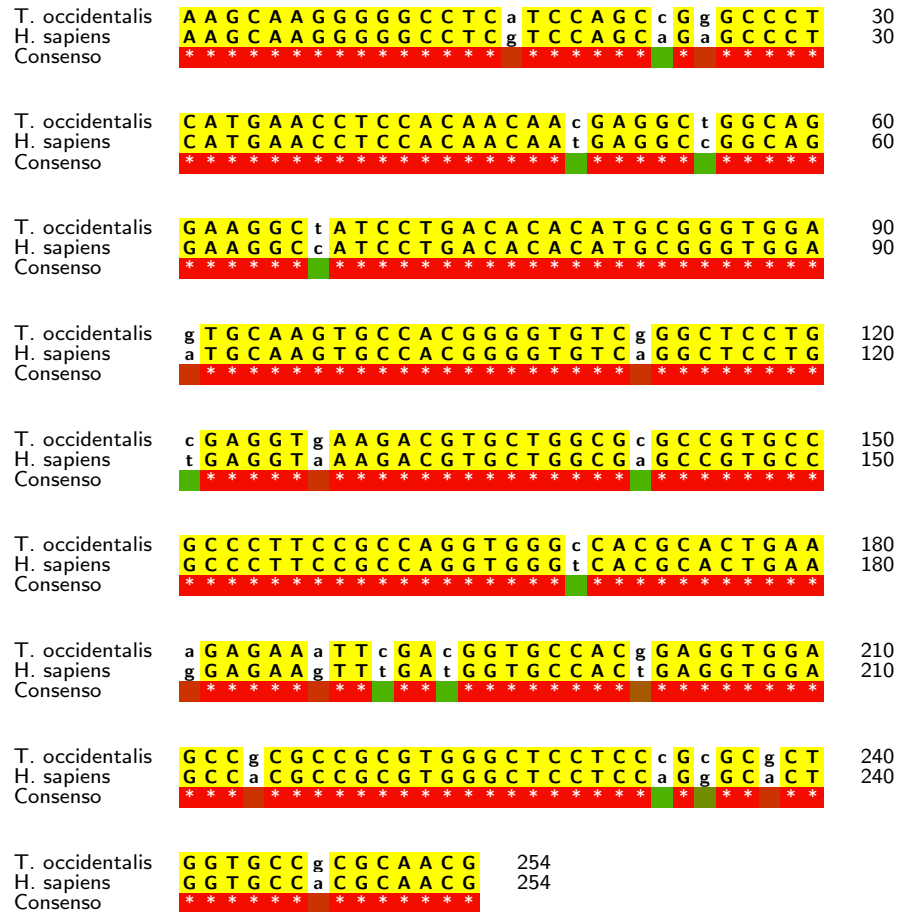


Figura 4.6: Comparación de la secuencia del fragmento clonado de *WNT4* de *T. occidentalis* y la del fragmento correspondiente de *H. sapiens*. Alineados: 254, coinciden: 232, huecos: 0 (0%), homología: 91.3%. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

4. Resultados

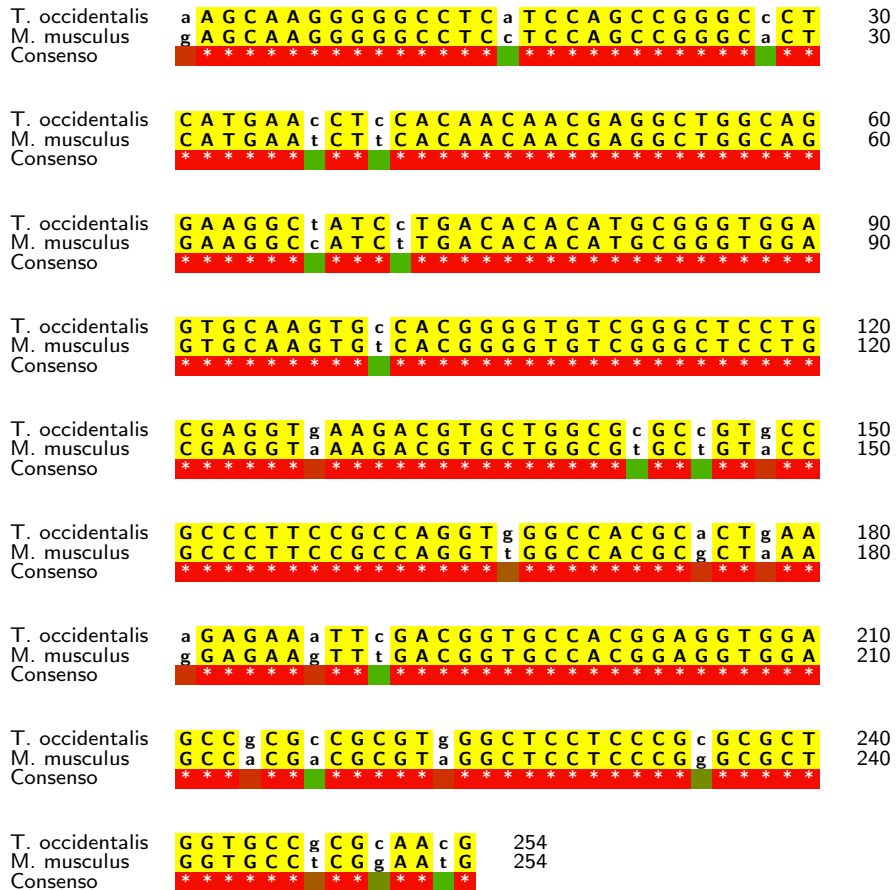


Figura 4.7: Comparación de la secuencia del fragmento clonado de *WNT4* de *T. occidentalis* y la del fragmento correspondiente de *M. musculus*. Alineados: 254, coinciden: 229, huecos: 0 (0%), homología: 90.2%. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

4.1. Producción de anticuerpos anti-DAX1 y anti-WNT4

T. occidentalis	S K G A S S S R A L M N L H N N E A G R K A I L T H M R V E	30
H. sapiens	S K G A S S S R A L M N L H N N E A G R K A I L T H M R V E	30
Consenso	* *	
T. occidentalis	C K C H G V S G S C E V K T C W R A V P P F R Q V G H A L K	60
H. sapiens	C K C H G V S G S C E V K T C W R A V P P F R Q V G H A L K	60
Consenso	* *	
T. occidentalis	E K F D G A T E V E P R R V G S S R A L V P R N	84
H. sapiens	E K F D G A T E V E P R R V G S S R A L V P R N	84
Consenso	* *	

Figura 4.8: Comparación de la secuencia del péptido codificado por el fragmento de *WNT4* de *T. occidentalis* y la del péptido correspondiente de *H. sapiens*. Alineados: 84, coinciden: 84, similares: 84, huecos: 0 (0%), homología: 100.0%, similitud: 100.0%.

T. occidentalis	S K G A S S S R A L M N L H N N E A G R K A I L T H M R V E	30
M. musculus	S K G A S S S R A L M N L H N N E A G R K A I L T H M R V E	30
Consenso	* *	
T. occidentalis	C K C H G V S G S C E V K T C W R A V P P F R Q V G H A L K	60
M. musculus	C K C H G V S G S C E V K T C W R A V P P F R Q V G H A L K	60
Consenso	* *	
T. occidentalis	E K F D G A T E V E P R R V G S S R A L V P R N	84
M. musculus	E K F D G A T E V E P R R V G S S R A L V P R N	84
Consenso	* *	

Figura 4.9: Comparación de la secuencia del péptido codificado por el fragmento de *WNT4* de *T. occidentalis* y la del péptido correspondiente de *M. musculus*. Alineados: 84, coinciden: 84, similares: 84, huecos: 0 (0%), homología: 100.0%, similitud: 100.0%.

Mediante el análisis de la secuencia del péptido obtenido con el programa *Antigenic*, se determinó que la región potencialmente más antigénica es la comprendida entre los aminoácidos 28 y 42. El oligopéptido resultante tiene 15 residuos y presenta la siguiente secuencia:

RVECKCHGVSGSCEV

Tras aplicar el protocolo de inmunización en conejo, utilizando este oligopéptido como inmunógeno, se obtuvo un suero con capacidad potencial para detectar la proteína WNT4 de topo, ratón y humano. El título de este suero, obtenido por ELISA, es 1/450.

4. Resultados

4.1.3. Análisis de la especificidad de los anticuerpos obtenidos

Existen varias evidencias indirectas que sugieren que los sueros obtenidos en este trabajo detectan específicamente las proteínas DAX1 y WNT4 de *Talpa*, tal como se discutirá más adelante. No obstante, para obtener pruebas adicionales de ello, se utilizaron estos sueros para realizar inmunofluorescencias sobre preparaciones de gónadas embrionarias de ratón de 12.5 dpc, como control positivo, puesto que el patrón de expresión en esta especie está establecido para ambos genes. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.10. *Dax1* muestra una alta expresión en la gónada XY y una expresión más débil en la gónada XX. A su vez, la proteína *Wnt4* apenas se detecta en el testículo mientras que aparece muy abundante en la gónada femenina.

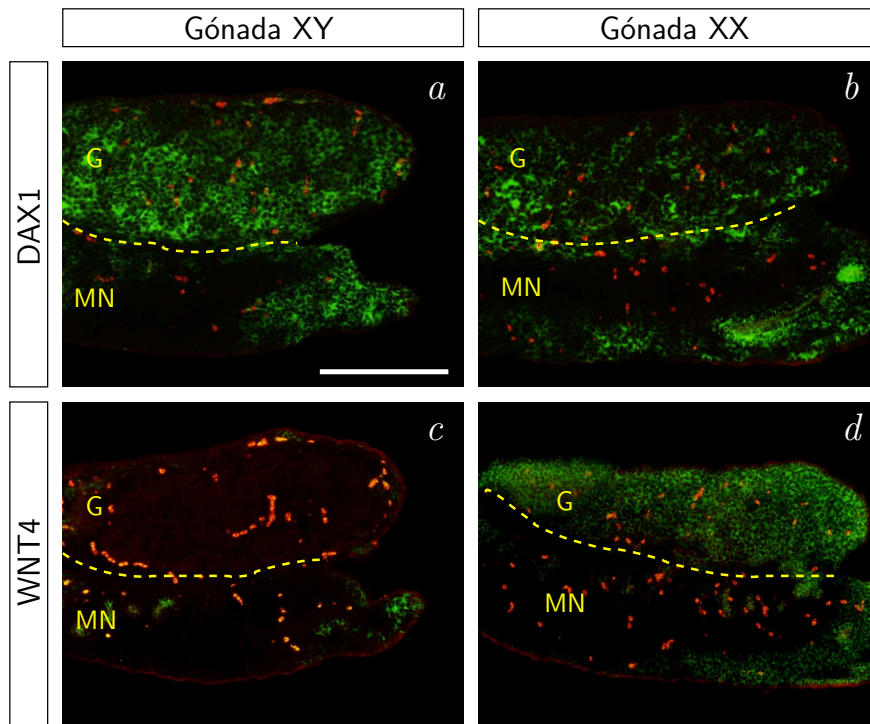


Figura 4.10: Detección de *Dax1* (a, b) y *Wnt4* (c, d) mediante inmunofluorescencia en secciones longitudinales de gónadas embrionarias de ratón de 12.5 dpc, utilizando los anticuerpos primarios producidos en este trabajo frente a las proteínas de *Talpa*. El anticuerpo secundario está marcado con FITC (verde). La línea discontinua delimita la frontera entre la gónada (G) y el mesonefros (MN). La barra representa $200\mu\text{m}$ en todas las imágenes.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual y caracterización molecular de las células de Sertoli

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el estudio del patrón de expresión de los genes *SF1*, *SOX9*, *DAX1*, *WNT4*, *AMH* y *DMRT1*, durante los primeros estadios de la gonadogénesis masculina y femenina de *T. occidentalis*. Se han elegido estos genes puesto que se sabe que están implicados en los procesos de determinación y diferenciación sexual de otras especies de mamíferos.

4.2.1. *SF1*

El gen *SF1* de *T. occidentalis* muestra un patrón espacial de expresión claramente diferenciado entre las regiones cortical y medular de las gónadas de ambos sexos, durante los primeros estadios de su desarrollo.

En la gónada masculina, la región cortical muestra una expresión débil de *SF1* al comienzo de la gonadogénesis (estadio s4, fig. 4.11a) y, además, dicha expresión va disminuyendo progresivamente durante los siguientes estadios, hasta desaparecer prácticamente en s5c (figs. 4.11c, e, g). Por el contrario, la mayoría, sino todas, las células de la región medular expresan intensamente este gen en el estadio s4 (fig. 4.11a). La región medular de la gónada XY en el estadio s5a presenta un aspecto similar al anterior (fig. 4.11c). No ocurre lo mismo con las células que componen la médula de la gónada masculina durante los dos estadios siguientes. En s5b (fig. 4.11e), las células de Sertoli que forman los cordones testiculares, ya diferenciados, expresan débilmente *SF1* (flecha blanca), mientras que las células intersticiales (pre-Leydig) aparecen mucho más inmuno-reactivas (flecha amarilla). El testículo s5c (fig. 4.11g) presenta unas características muy similares, aunque, en este caso, las células intersticiales (Leydig) son mucho más numerosas y muestran una expresión de *SF1* aún más intensa que en el estadio anterior.

Por su parte, la gónada XX presenta un patrón de expresión diferente al de la gónada XY. Todas las células del primordio gonadal (estadio s4) expresan *SF1*, incluidas tanto las de la médula como las de la corteza (fig. 4.11b). A partir de este punto, la expresión cortical de *SF1* disminuye paulatinamente en los siguientes estadios aunque no llega a desaparecer como ocurre en la gónada masculina, puesto que en s5c aún se observa un nivel de expresión medio en la mayoría de las células corticales (figs. 4.11d, f, h). Contrariamente, dicho nivel de expresión se mantiene alto en las células de la región medular a lo largo de todo el periodo analizado (figs. 4.11b, d, f, h). En este caso, conviene destacar que las células positivas para *SF1* de la región medular se reúnen en estructuras cordonales, que empiezan a observarse en s5a (fig.

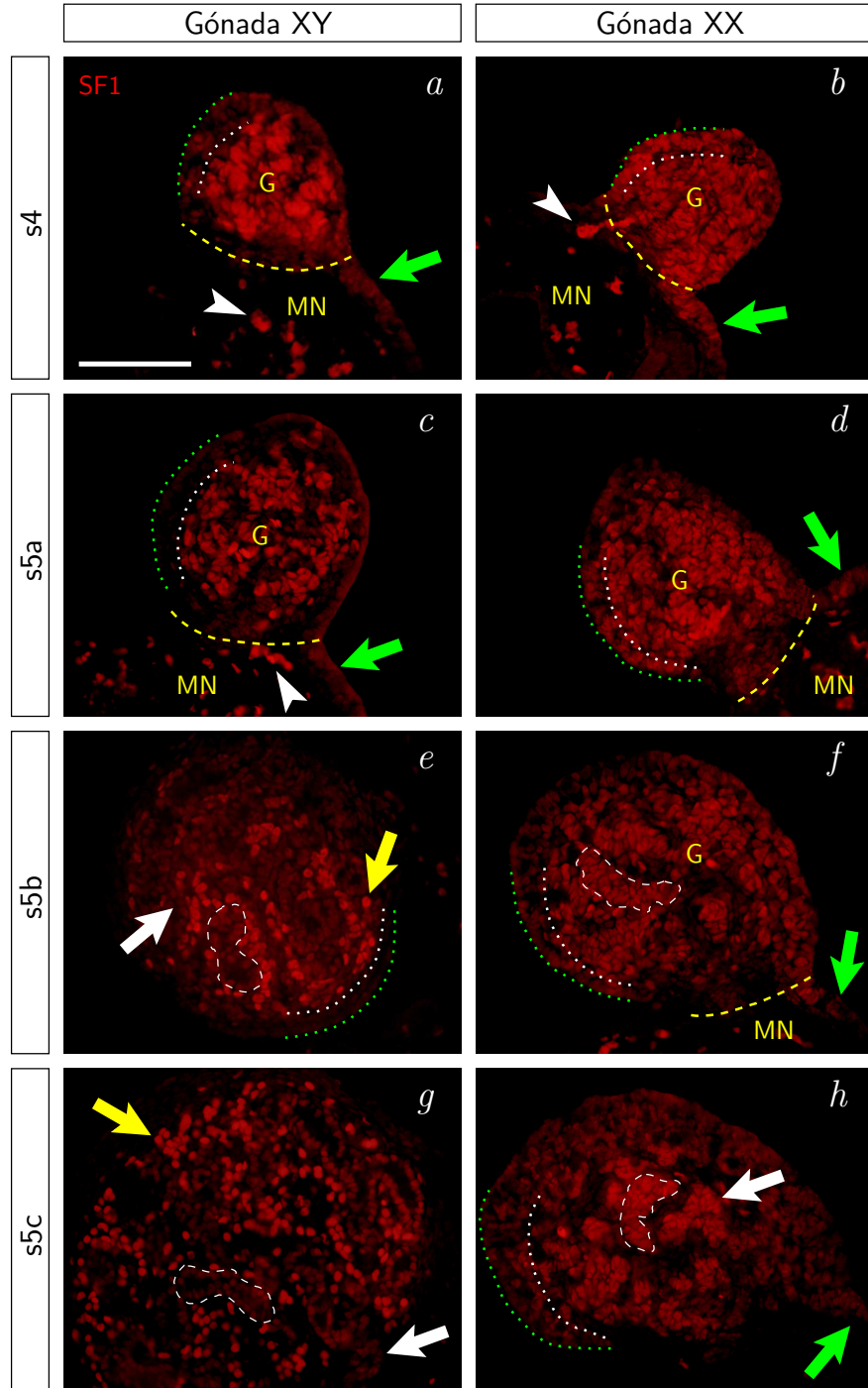
4. Resultados

4.11*d*), son más patentes en s5b (fig. 4.11*f*) y resultan evidentes en s5c (fig. 4.11*h*). Las células intersticiales medulares, a diferencia de lo que ocurre en la gónada XY, no expresan *SF1*.

En este estudio inmunohistoquímico, llama la atención la existencia de una pequeña región en el mesonefros situada en la frontera con la gónada, a nivel de la comisura de la cara ventral que forman ambos órganos (*comisura ventral*, en adelante), que expresa también *SF1*. Esta expresión se produce de forma continuada a lo largo de todo el periodo estudiado en el caso de los individuos XX (figs. 4.11*b, d, f, h*), y en los estadios s4 (fig. 4.11*a*) y s5a (fig.4.11*c*), en el caso de los XY. El nivel de expresión de las células de comisura ventral coincide aproximadamente con las de la corteza de la gónada en cada caso.

Figura 4.11: Detección de SF1 mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (*a, b*), s5a (*c, d*), s5b (*e, f*) y s5c (*g, h*), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). En la gónada XY, *SF1* se expresa débilmente en la región cortical y más intensamente en diversas células de la región medular en todos los estadios analizados (*a, c, e, g*). Contrariamente, la gónada XX mantiene una expresión intensa de este gen en la región medular, mientras que va declinando paulatinamente en la región cortical (*b, d, f, h*). Las flechas blancas señalan células que forman parte de los cordones (Sertoli en el caso de la gónada masculina). Las flechas amarillas señalan células intersticiales XY (Leydig). Las flechas verdes señalan células positivas para SF1 en la comisura ventral. Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua blanca indica el contorno de uno de los cordones. La línea discontinua amarilla delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos verde marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa $75\mu\text{m}$ en *a, b*, y $100\mu\text{m}$ en *c-h*. (G) Gónada; (MN) mesonefros.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



4. Resultados

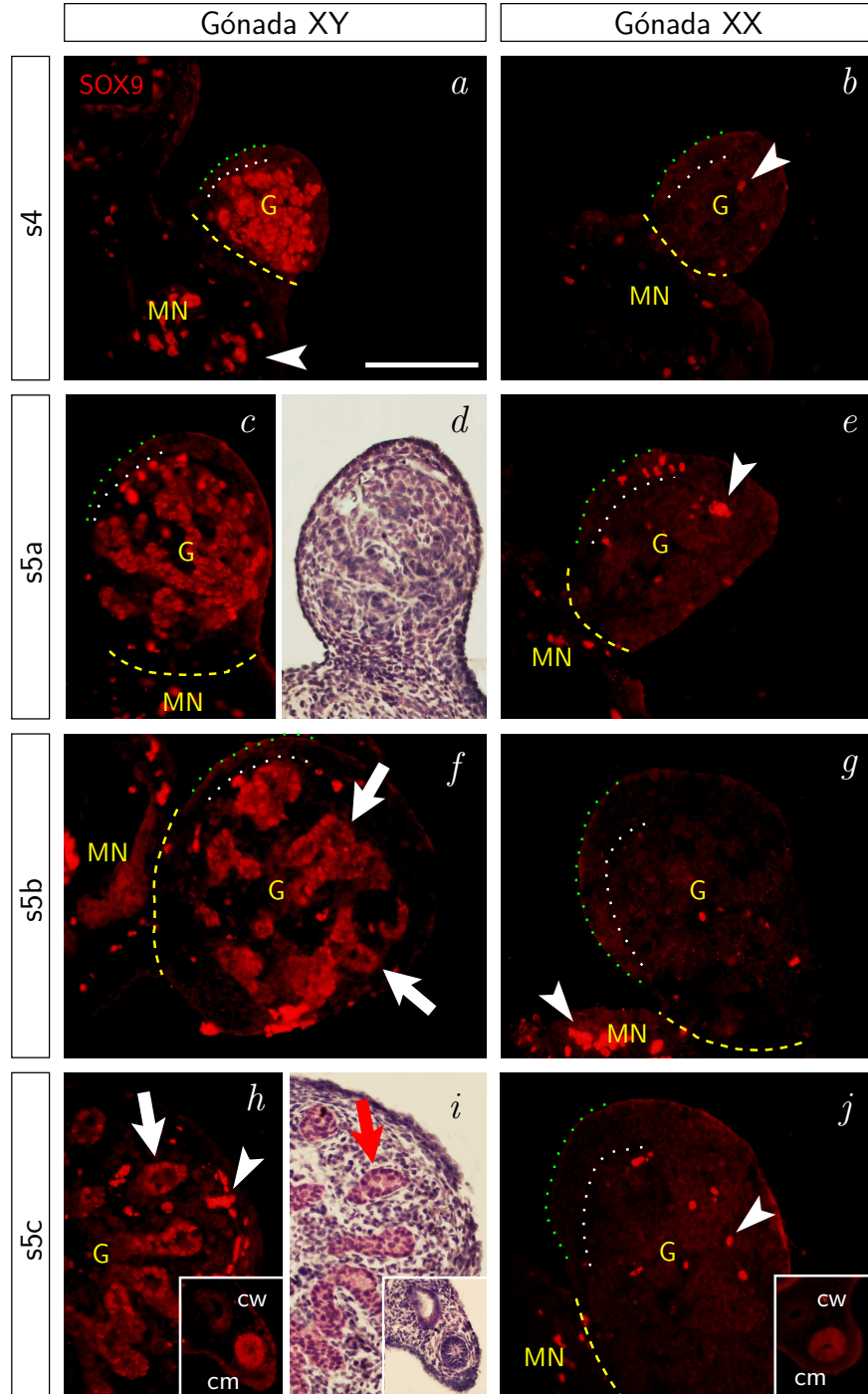
4.2.2. SOX9

El dato más destacado en cuanto a la expresión de *SOX9* en *T. occidentalis* es su total ausencia en la gónada XX, tanto en la región medular como en la cortical (figs. 4.12*b, e, g, j*). En la gónada XY, sin embargo, se expresa intensamente desde el comienzo de la formación del primordio gonadal (estadio s4), en donde se observa una localización nuclear de la proteína (fig. 4.12*a*). La mayoría, sino todas, las células medulares de la gónada XY en este estadio expresan *SOX9*, pero no muestran una organización espacial definida. Esta imagen se corresponde con la de un blastema gonadal indiferenciado. Por el contrario, en s5a, las células que expresan *SOX9* aparecen distribuidas en estructuras cordonales que sólo son patentes en la imagen de inmunofluorescencia (fig. 4.12*c*), no así a nivel morfológico cuando la misma sección es teñida posteriormente con hematoxilina-eosina (fig. 4.12*d*). En s5b y s5c, la distribución de las células positivas para *SOX9* es similar a la del estadio anterior, aunque ahora la organización en cordones es más evidente (figs. 4.12*f, h*). Además, estos cordones medulares si se manifiestan a nivel morfológico en las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina (fig. 4.12*i*).

En el mesonefros no se detecta *SOX9* hasta s5c. En los machos de este estadio, se observa una expresión elevada de *SOX9* en las células epiteliales del conducto de Müller y más débil en algunas capas celulares adyacentes a éste. En hembras s5c, también hay expresión de *SOX9* en dicho conducto, aunque es significativamente menos intensa.

Figura 4.12: Detección de *SOX9* mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (*a, b*), s5a (*c-e*), s5b (*f, g*) y s5c (*h-j*), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). *SOX9* se detecta en la región medular de la gónada XY (columna izquierda) y no se observa en la gónada XX (columna derecha). Las imágenes *d* e *i* muestran las mismas secciones que aparecen en las imágenes *c* y *h*, respectivamente, tras tinción con hematoxilina-eosina. Nótese que en la imagen *i*, pero no en la *d*, se observan cordones medulares morfológicamente definidos (flecha roja). El conducto de Müller es positivo para *SOX9* tanto en machos como en hembras s5c (detalles en *h, j*). Las flechas blancas en *f* y *h* señalan cordones testiculares positivos para *SOX9*. Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos verde marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 100 μ m en todas las imágenes. (G) Gónada; (MN) mesonefros; (cw) conducto de Wolff; (cm) conducto de Müller.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



4. Resultados

4.2.3. DAX1

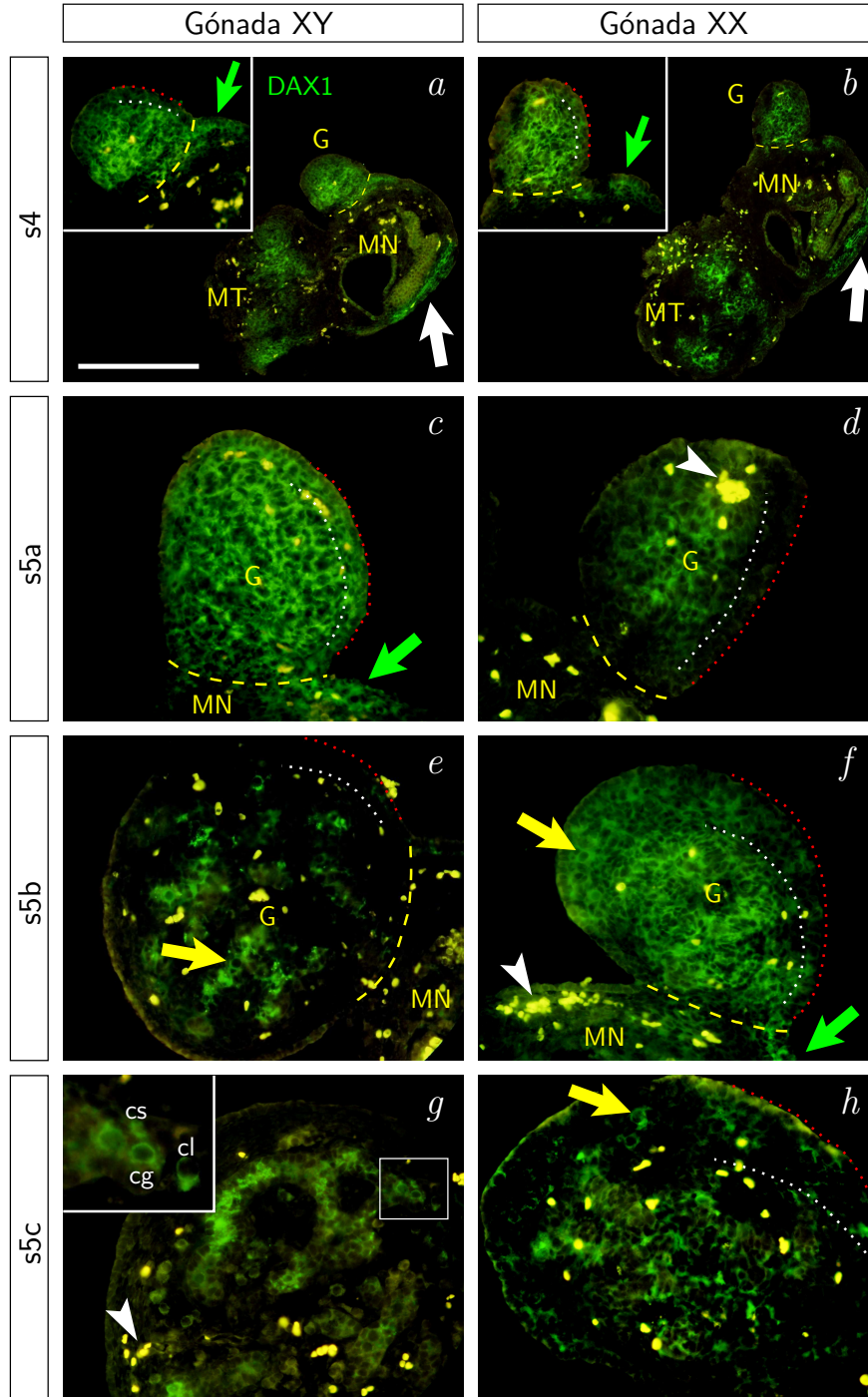
La proteína DAX1 muestra una localización citoplasmática en todos los estadios. En relación con su expresión en machos, en el primordio gonadal XY (estadio s4) *DAX1* se expresa tanto en la corteza como en la médula, aunque dicha expresión aparece un poco más intensa en la región medular (fig. 4.13a). En s5a, sin embargo, se detecta un alto nivel de expresión en toda la gónada (fig. 4.13c). En los estadios posteriores (s5b y s5c), esta expresión disminuye y se localiza en el interior de los cordones testiculares, tanto en las células de Sertoli como en las PGCs (figs. 4.13e, g). Asimismo, las células intersticiales del testículo s5c (Leydig) también son positivas para DAX1 (fig. 4.13g).

En la gonadogénesis femenina, la cresta genital XX (estadio s4) presenta un patrón espacial similar al del primordio XY (fig. 4.13b). En s5a, sin embargo, la proteína se detecta fundamentalmente en la médula (fig. 4.13d). Es en el estadio s5b cuando se observa un pico de expresión tanto en la médula como en la corteza, aunque los niveles de proteína son más altos en la región medular (fig. 4.13f). La expresión de *DAX1* disminuye en ambas regiones de la gónada XX s5c y se intuye con mayor claridad que las PGCs muestran inmuno-reactividad (fig. 4.13h).

DAX1 también se observa en la región en donde se desarrollará el conducto de Müller y en dos amplias zonas del metanefros durante el estadio s4 de ambos sexos. De la misma manera, esta proteína también está presente en las células de la comisura ventral tanto XX como XY (figs. 4.13a, b).

Figura 4.13: Detección de DAX1 mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (a, b), s5a (c, d), s5b (e, f) y s5c (g, h), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). (a, b) Sistema urogenital s4 de ambos sexos, mostrando inmuno-reactividad en el primordio gonadal (G), la comisura ventral (flechas verdes), la zona en donde se desarrollará el conducto de Müller (flechas blancas) y el metanefros (MT). En s5a (c, d), la expresión de *DAX1* es muy intensa y homogénea en toda la gónada XY (c) y la comisura ventral (flecha verde), mientras que en la gónada XX (d) es menor en la corteza. En el estadio s5b (e, f), DAX1 se localiza en las células somáticas que forman los cordones masculinos y femeninos, en las PGCs (flechas amarillas) y en la región cortical del ovoteste. El testículo s5c (g) muestra expresión de *DAX1* en varios tipos celulares, incluyendo las células de Sertoli (cs), las células de Leydig (cl) y las células germinales (cg). En el ovoteste del mismo estadio (h), la proteína se detecta en el interior de los cordones medulares y en las células de la región cortical, incluidas las PGCs (flecha amarilla). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua delimita la frontera entre la gónada (G) y el mesonefros (MN). La línea de puntos roja marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 225 μ m en a, b, y 100 μ m en c-h.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



4. Resultados

4.2.4. WNT4

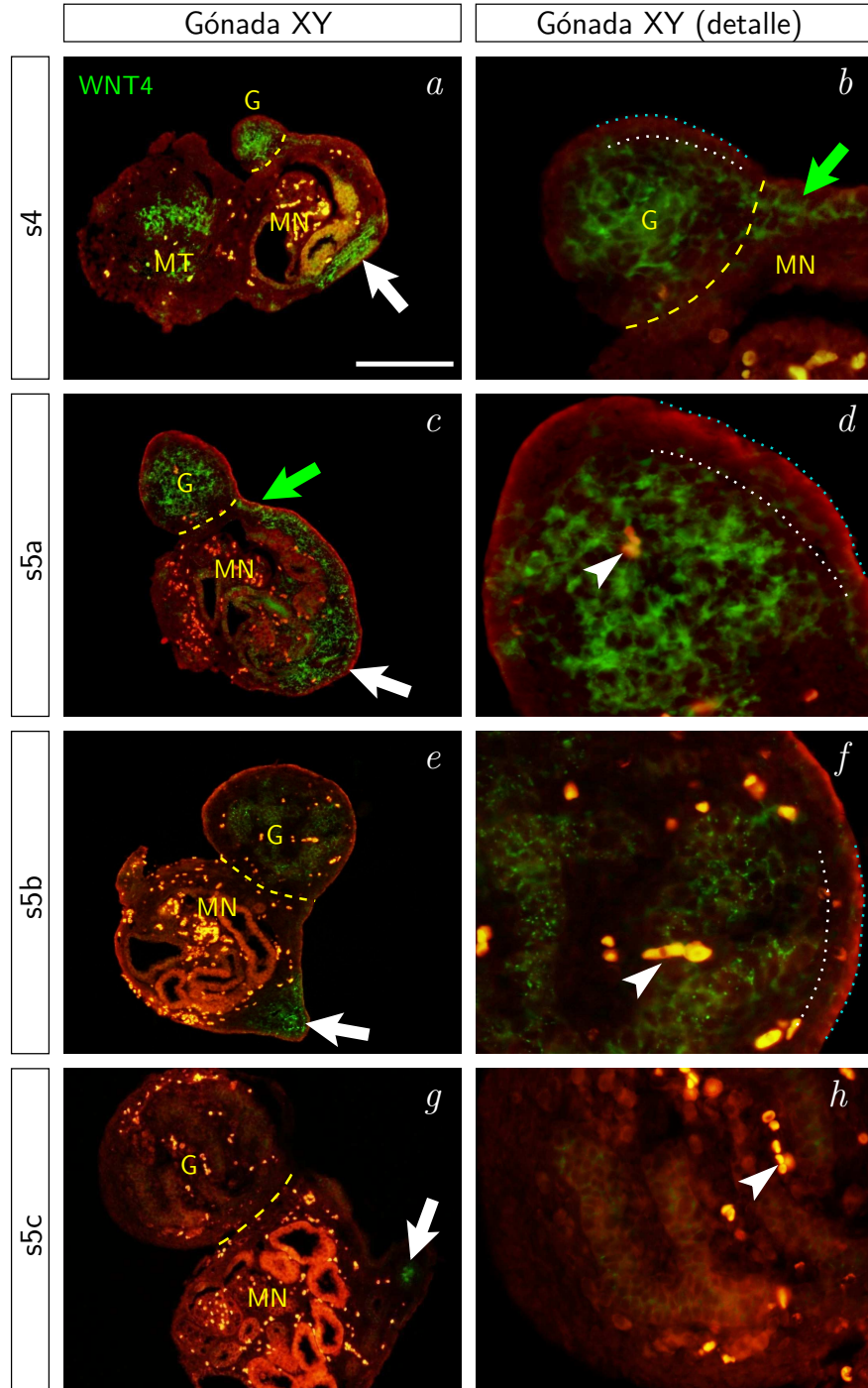
En todos los estadios analizados, WNT4 presenta una localización citoplasmática. Al igual que en el caso de DAX1, esta proteína es detectada en dos áreas del metanefros (figs. 4.14a y 4.15a), en la comisura ventral del mesonefros y en la zona en la que se desarrollará el conducto de Müller (figs. 4.14 y 4.15a, c, e, g). Cuando el conducto de Müller es evidente (estadio s5c), la expresión de *WNT4* en las células que lo forman disminuye en los machos (fig. 4.14g).

Gónada XY

El desarrollo gonadal temprano de los machos de *T. occidentalis* es normal en cuanto al perfil de expresión de *WNT4*. Este gen se expresa, fundamentalmente, en la médula tanto de la cresta genital XY (figs. 4.14a, b) como de la gónada masculina s5a (figs. 4.14c, d). Dicha expresión se localiza en los cordones del testículo s5b, aunque es bastante menos evidente que en los estadios anteriores (figs. 4.14e, f) y, prácticamente, desaparece en s5c (figs. 4.14g, h).

Figura 4.14: Detección de WNT4 mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XY embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (a, b), s5a (c, d), s5b (e, f) y s5c (g, h), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) y un filtro doble. Tanto en el estadio s4 (a, b) como en s5a (c, d), *WNT4* se expresa, fundamentalmente, en las células de la región medular de la gónada XY. En s5b (e, f), la expresión se localiza en los cordones testiculares y disminuye hasta casi desaparecer en s5c (g, h). Las flechas verdes señalan células positivas para WNT4 en la comisura ventral. Las flechas blancas indican la región en la que se formará el conducto de Müller. Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua amarilla delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos azul marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 200µm en a, c, e, g, y 50µm en b, d, f, h. (G) Gónada; (MN) mesonefros; (MT) metanefros.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



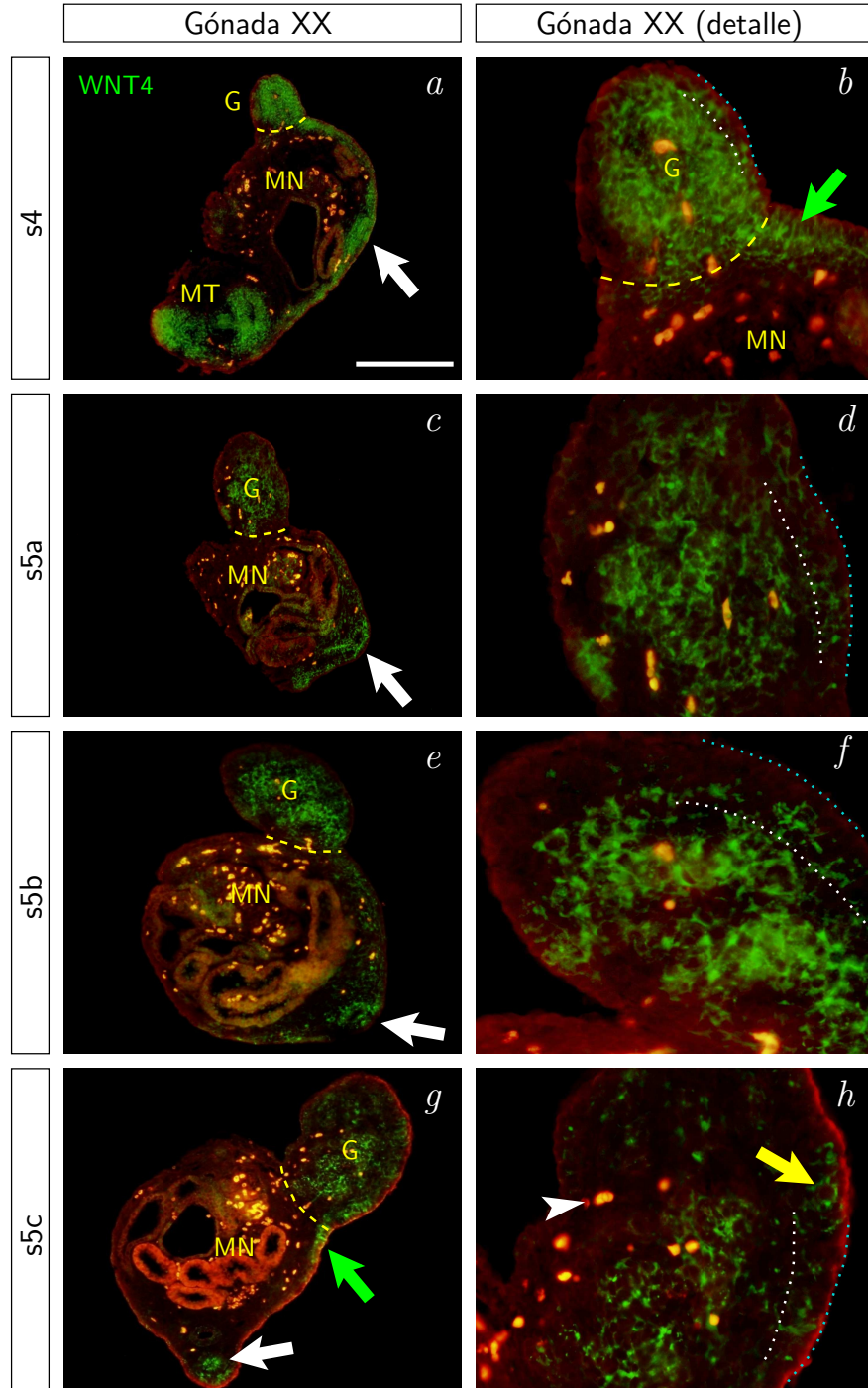
4. Resultados

Gónada XX

En la gonadogénesis femenina, la expresión de *WNT4* es similar a la observada en los individuos XY durante los estadios s4 y s5a, aunque en este último aparece una mayor fluorescencia en la corteza (figs. 4.15*a-d*). En el estadio s5b, los cordones medulares de la gónada XX aparecen fuertemente positivos para *WNT4*, mientras que la corteza presenta una expresión mucho menor (figs. 4.15*e, f*). En s5c, se observa con mayor claridad que algunas de las células positivas de la corteza son PGCs (flecha amarilla en fig. 4.15*h*), aunque los niveles de proteína siguen siendo mayores en las células medulares (figs. 4.15*g, h*).

Figura 4.15: Detección de *WNT4* mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XX embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (*a, b*), s5a (*c, d*), s5b (*e, f*) y s5c (*g, h*), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) y un filtro doble. *WNT4* es detectado en las células medulares de todos los estadios analizados (*a-h*). En s5a (*c, d*), s5b (*e, f*) y s5c (*g, h*), se observa fluorescencia en algunas células de la corteza gonadal XX, incluidas las PGCs (flecha amarilla). Las flechas verdes señalan células positivas para *WNT4* en la comisura ventral. Las flechas blancas indican la región en la que se formará el conducto de Müller. La punta de flecha señala autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua amarilla delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos azul marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa $200\mu\text{m}$ en *a, c, e, g*, y $50\mu\text{m}$ en *b, d, f, h*. (G) Gónada; (MN) mesonefros; (MT) metanefros.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



4. Resultados

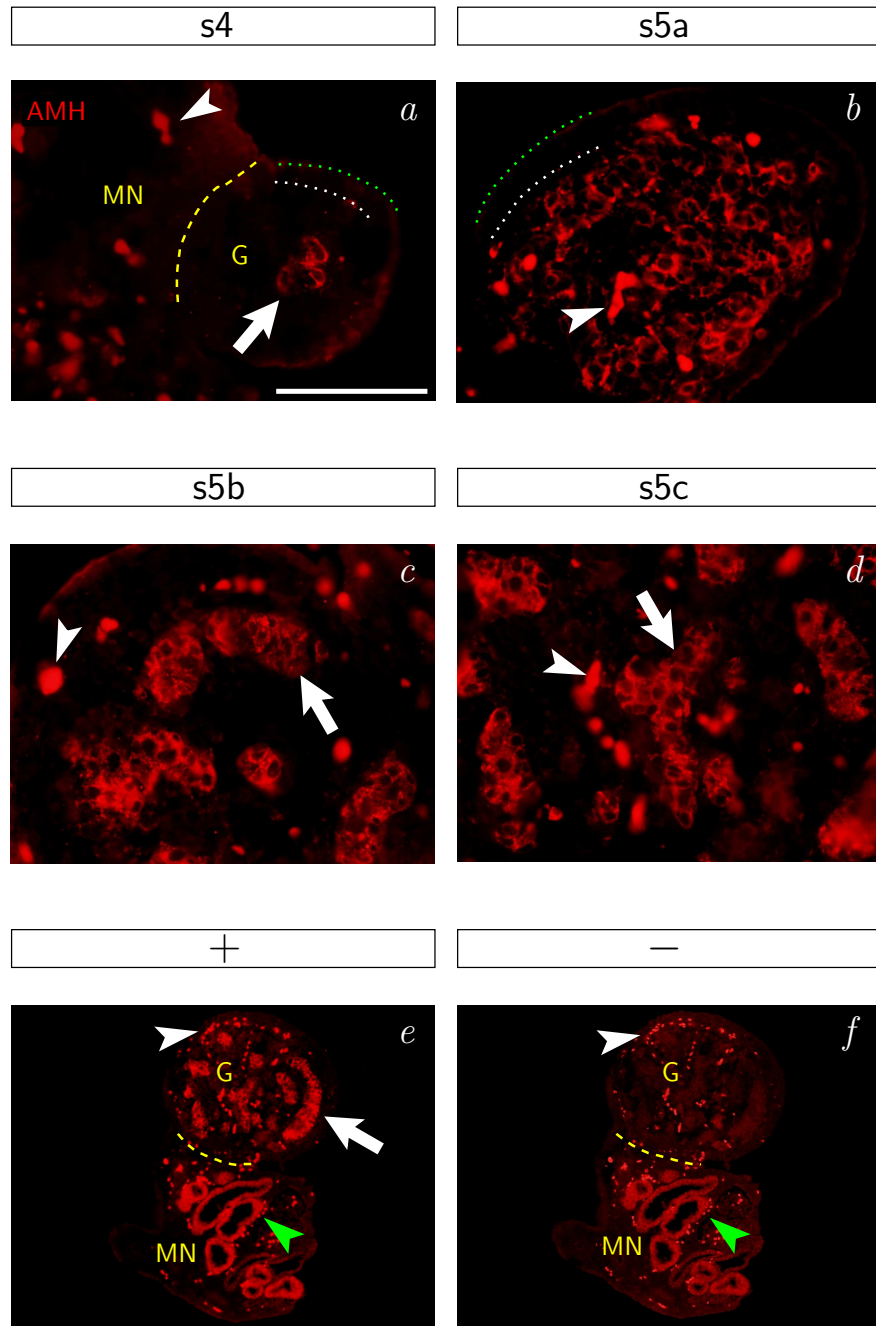
4.2.5. AMH

El hecho más significativo en relación con el gen *AMH* de *T. occidentalis* es que éste comienza a expresarse en etapas tan tempranas como s4. En este estadio, la proteína AMH se localiza en el citoplasma de un reducido grupo de células somáticas situadas en la médula del primordio gonadal (fig. 4.16a). El número de células positivas para AMH aumenta significativamente en el siguiente estadio, observándose una distribución de éstas en toda la médula de la gónada masculina s5a (fig. 4.16b). Una vez que los cordones testiculares ya se han formado (s5b en adelante), puede verse que la expresión de *AMH* ocurre en las células de Sertoli (figs. 4.16c, d, e).

Mediante el análisis de un control negativo en el que se suprimió el anticuerpo primario anti-AMH, se observa que la fluorescencia que emiten los eritrocitos y las células del epitelio de los conductos mesonéfricos es inespecífica (figs. 4.16e, f). Este dato es válido para todas las inmunofluorescencias realizadas en este trabajo.

Figura 4.16: Detección de AMH mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XY embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (a), s5a (b), s5b (c) y s5c (d, e), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). AMH se detecta en unas pocas células somáticas de la cresta genital XY (flecha en a). En s5a (b), las células positivas para AMH están distribuidas por toda la región medular. En s5b (c) y s5c (d) se observa que las células que expresan *AMH* son las células de Sertoli (flechas). (e) Imagen de inmunofluorescencia sobre un testículo s5c utilizando un anticuerpo primario anti-AMH (control positivo). (f) Imagen de inmunofluorescencia sobre un testículo s5c utilizando únicamente un anticuerpo secundario (control negativo). Por comparación entre las imágenes e y f, resulta evidente que los cordones testiculares emiten fluorescencia específica (se observan sólo en e), mientras que los canales mesonéfricos (punta de flecha verde) y los eritrocitos (punta de flecha blanca) lo hacen de forma inespecífica (se observan en ambas imágenes). Las puntas de flecha blancas en a-d señalan, igualmente, autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos verde marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 100 μ m en a-d, y 300 μ m en e, f. (G) Gónada; (MN) mesonefros.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



4. Resultados

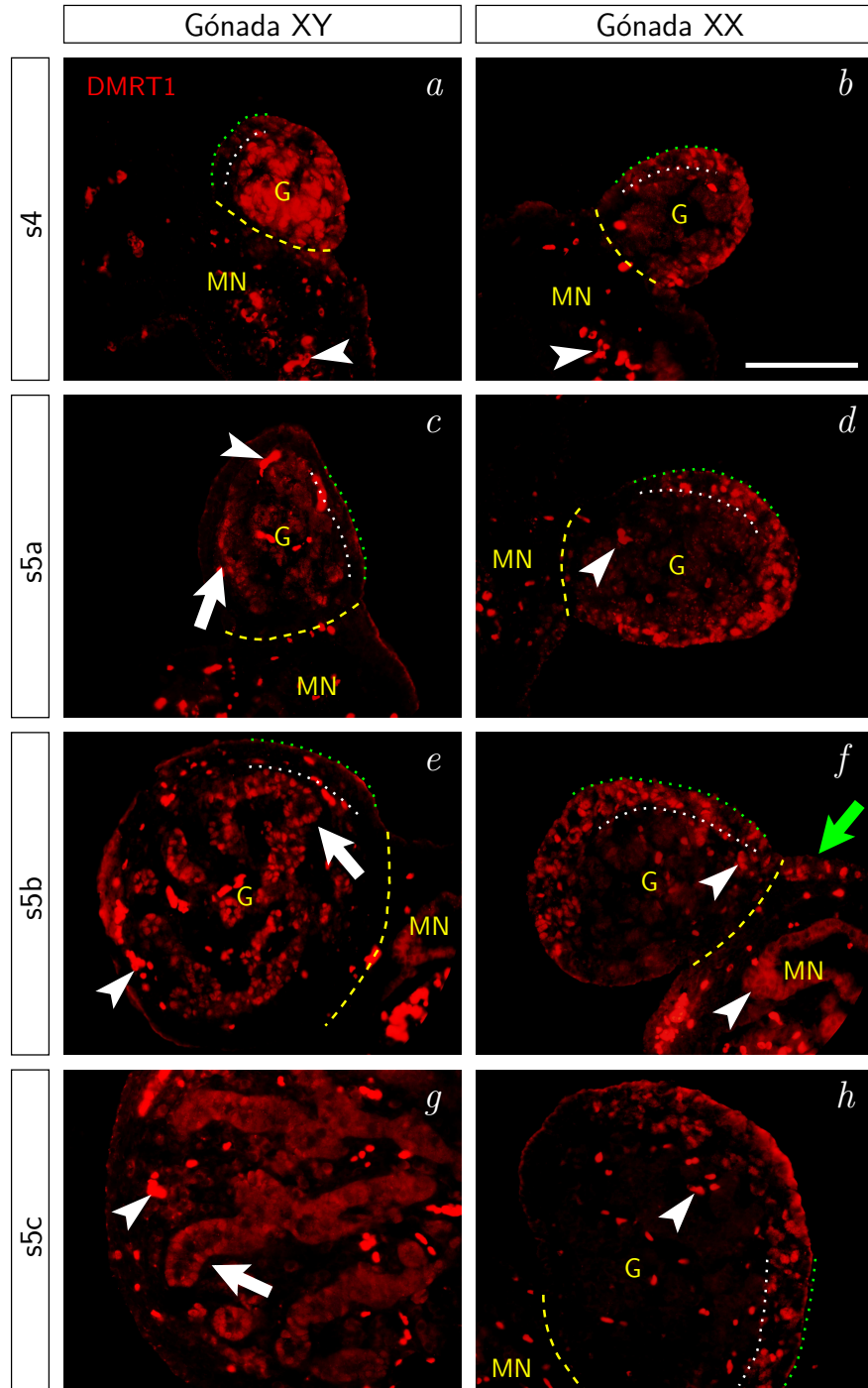
4.2.6. DMRT1

La expresión de *DMRT1* durante las primeras etapas del desarrollo testicular de *T. occidentalis* muestra un patrón similar al descrito en otras especies de mamíferos. DMRT1 se localiza en el núcleo de las células medulares del primordio gonadal (fig. 4.17a). En el estadio s5a, las células que expresan *DMRT1* exhiben una disposición cordonal, aunque aún no se observa una diferenciación morfológica de la gónada (fig. 4.17c). En los siguientes estadios, la proteína se localiza en el interior de los núcleos de las células de Sertoli que forman los cordones testiculares (figs. 4.17e, g).

Con respecto al desarrollo temprano del ovoteste, la expresión de *DMRT1* es muy llamativa. Desde el estadio s4 en adelante, DMRT1 se observa en los núcleos de distintos tipos celulares de la región cortical de la gónada femenina (figs. 4.17b, d, f, h). Esta expresión cortical va disminuyendo progresivamente en las células somáticas, mientras que se mantiene en las PGCs. Asimismo, la comisura ventral del mesonefros XX también se muestra inmuno-reactiva para DMRT1 a partir de s5b (flecha verde en fig. 4.17f). Las células somáticas medulares muestran una expresión débil de este gen hasta el estadio s5c, momento en el cual ya no se detecta (fig. 4.17h).

Figura 4.17: Detección de DMRT1 mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (a, b), s5a (c, d), s5b (e, f) y s5c (g, h), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). En todo el periodo analizado, DMRT1 se detecta en el núcleo de las células somáticas medulares de la gónada XY (columna izquierda). Estas células se organizan en estructuras cordonales en el estadio s5a (flecha en c) y corresponden con las células de Sertoli a partir de s5b (flechas en e, g). Por el contrario, durante la gonadogénesis femenina, las células positivas para DMRT1 se localizan fundamentalmente en la corteza gonadal (columna derecha), aunque se observa una expresión débil en la médula entre los estadios s4 y s5b (b, d, f). La flecha verde señala inmuno-reactividad para DMRT1 en la comisura ventral. Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos verde marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 100 μ m en todas las imágenes. (G) Gónada; (MN) mesonefros.

4.2. Expresión de genes implicados en la determinación sexual



4. Resultados

4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano

Como se ha indicado previamente, la migración de células mesenquimáticas desde el mesonefros a la gónada es un evento fundamental en la organogénesis testicular. Para estudiar este proceso en *T. occidentalis*, se analizó el patrón de expresión de los genes *MT1-MMP* (*membrane-type-1 matrix metalloproteinase*), que es un marcador de células migratorias, y *PDGFR α* , que es un gen implicado en la transmisión de la señal gonadal necesaria para que se induzca dicha migración.

4.3.1. MT1-MMP

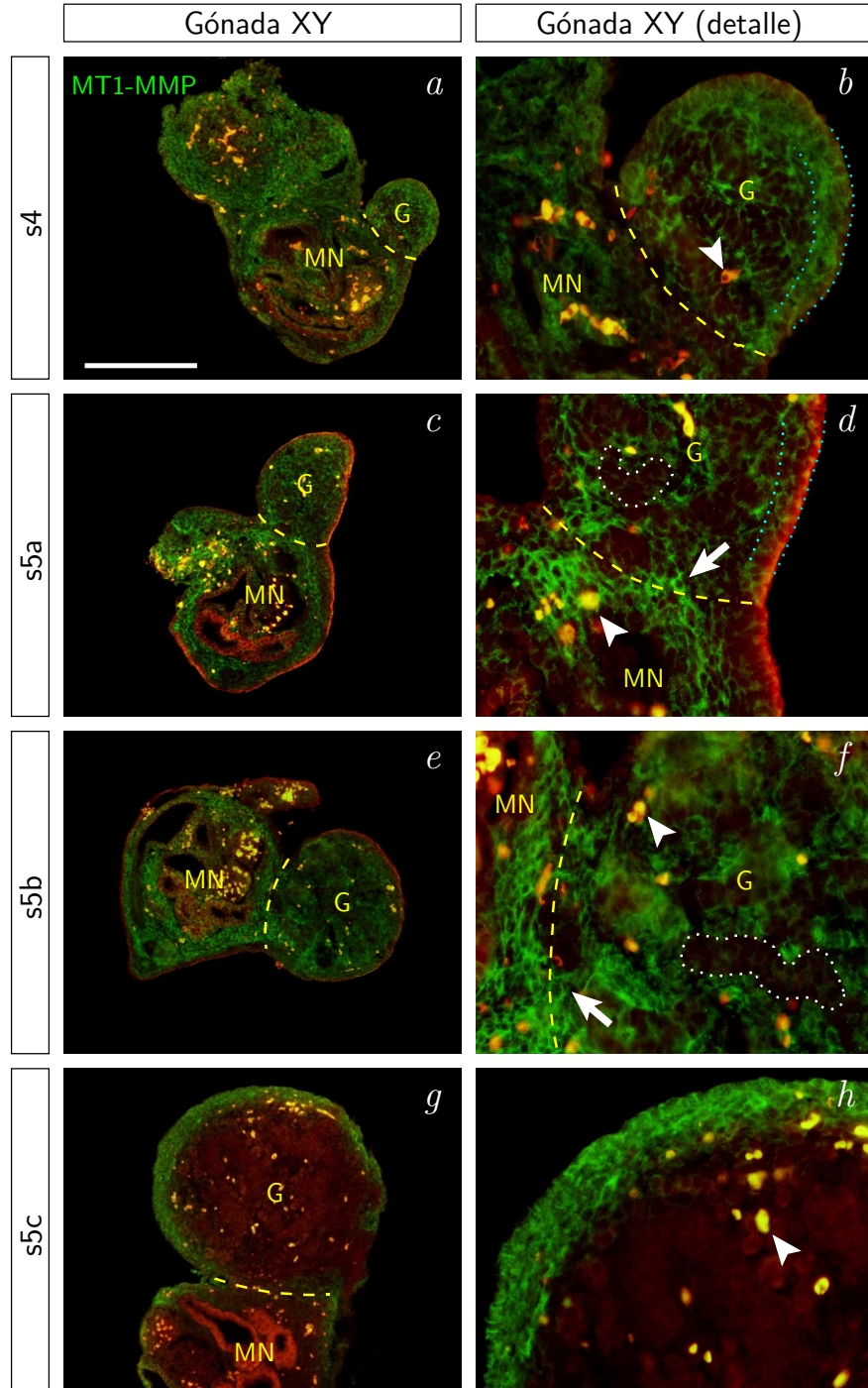
En machos, MT1-MMP aparece de forma dispersa por todo el mesonefros desde el estadio s4 hasta s5b (figs. 4.18*a, c, e*). En hembras, el patrón es similar, pero también se expresa en el mesonefros s5c (figs. 4.19*a, c, e, g*).

Gónada XY

En el primordio gonadal XY (estadio s4), gran parte de las células de la corteza expresan *MT1-MMP*, mientras que en la médula la densidad de células positivas es mucho menor (fig. 4.18*b*). En s5a y s5b, se observa que sólo las células corticales y las intersticiales de la médula expresan *MT1-MMP*, mientras que las células de los cordones medulares no lo hacen (figs. 4.18*d, f*). En estos estadios, la región fronteriza entre gónada y mesonefros muestra grupos de células migratorias que se extienden a ambos lados de la misma (flechas en 4.18*d, f*), indicando continuidad en el proceso de migración.

Figura 4.18: Detección de MT1-MMP mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias XY de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (*a, b*), s5a (*c, d*), s5b (*e, f*) y s5c (*g, h*), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) y un filtro doble. En todos los estadios, excepto en s5c, MT1-MMP se detecta tanto en la gónada como en el mesonefros (*a-f*). Entre s4 y s5b (*a-f*), aparecen células inmuno-reactivas por toda la gónada, exceptuando las que constituyen los cordones medulares (delimitados por la línea de puntos blanca), algo especialmente patente en s5b (*f*). En s5c (*g, h*) no hay células positivas para MT1-MMP en la región medular y son muy abundantes en la corteza. Las flechas en *d* y *f* señalan grupos de células positivas para MT1-MMP que atraviesan la frontera (línea discontinua) entre la gónada (G) y el mesonefros (MN). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. Las líneas de puntos azules delimitan la región cortical en *a* y *b*. La barra de escala representa 200 μ m en *a, c, e, g*, y 50 μ m en *b, d, f, h*.

4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano



4. Resultados

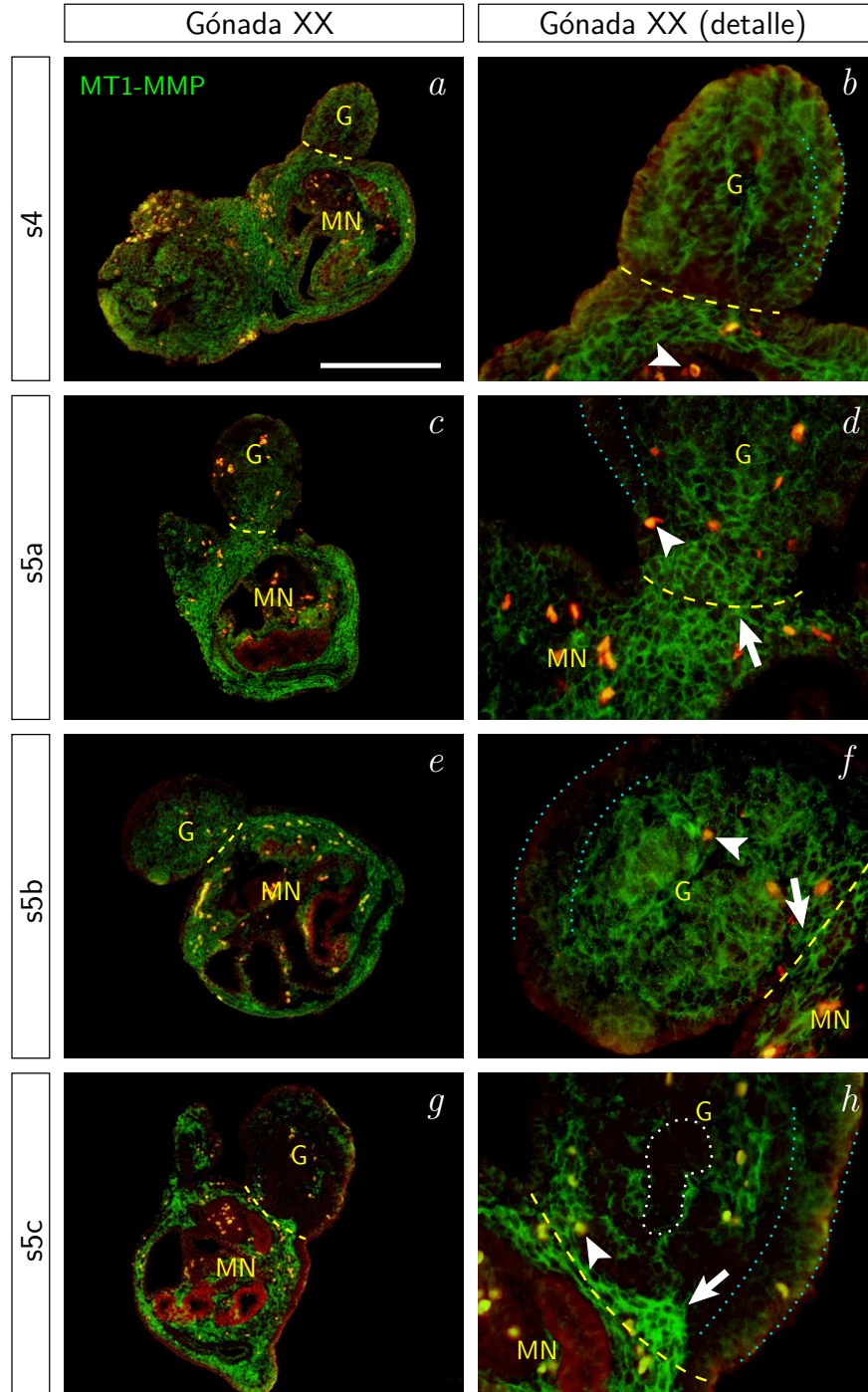
En el testículo s5c, no hay expresión de *MT1-MMP* en ningún tipo celular de la médula, pero la región cortical se muestra muy inmuno-reactiva frente a los anticuerpos anti-*MT1-MMP* (fig. 4.18h).

Gónada XX

La gónada indiferenciada femenina (estadio s4) también muestra expresión de *MT1-MMP* tanto en la médula como en la corteza, aunque, como ocurre en la masculina, en la región medular presenta zonas en las que dicho gen no se expresa (fig. 4.19a, b). A partir de s5a, la expresión disminuye en la corteza hasta casi desaparecer y pueden observarse grupos de células que atraviesan el límite entre el mesonefros y la gónada, algo que es especialmente evidente en s5c (flechas en 4.19d, f, h), lo que indica que en la hembra la migración celular también presenta una continuidad entre ambos órganos. Al igual que en los machos, los cordones medulares de la gónada XX s5c no son inmuno-reactivos para *MT1-MMP* (fig. 4.19h).

Figura 4.19: Detección de *MT1-MMP* mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias XX de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (a, b), s5a (c, d), s5b (e, f) y s5c (g, h), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) y un filtro doble. En todos los estadios analizados, *MT1-MMP* se observa en la gónada y en el mesonefros (a-h). En el primordio gonadal, se detecta expresión de *MT1-MMP* tanto en la médula como en la corteza, aunque ésta es menor en la región medular (a, b); sin embargo, la expresión es mayor en la médula de las gónadas femeninas s5a y s5b (c-f). En s5c, la expresión disminuye en la médula, no detectándose en el interior de los cordones (línea de puntos blanca en h), y se observa levemente en la corteza (g, h). Las flechas señalan grupos de células positivas para *MT1-MMP* que atraviesan la frontera entre la gónada y el mesonefros (línea discontinua). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. Las líneas de puntos azules delimitan la región cortical en b, d, f y h. La barra de escala representa 200 μ m en a, c, e, 250 μ m en g, y 50 μ m en b, d, f, h. (G) Gónada; (MN) mesonefros.

4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano



4. Resultados

4.3.2. PDGFR α

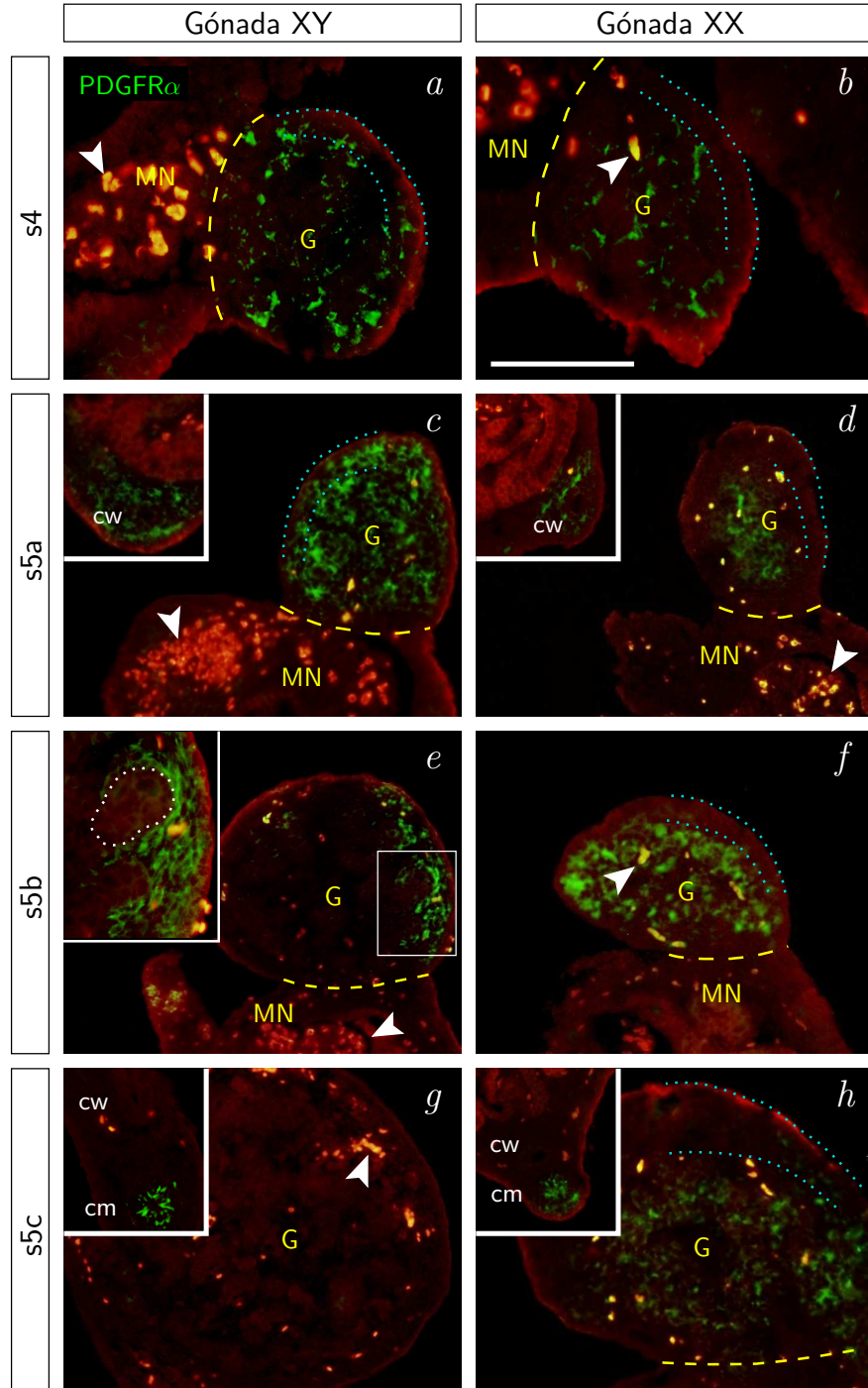
La proteína PDGFR α se detecta en ambos sexos en el citoplasma de determinadas células gonadales (figs. 4.20a-f, h). En machos, tanto en el estadio s4 como en s5a, las células positivas para PDGFR α están distribuidas por toda la gónada (figs. 4.20a, c), aunque en s5a pueden intuirse grupos celulares con disposición cordonal que no expresan PDGFR α (fig. 4.20c). En el testículo s5b, la expresión de este gen está restringida a la región cortical que queda próxima a la comisura ventral (fig. 4.20e). En este caso, puede observarse que los cordones testiculares son negativos para PDGFR α (detalle en fig. 4.20e). Finalmente, en s5c ya no se detecta esta proteína en ninguna célula (fig. 4.20g).

En hembras, PDGFR α se observa en todo el periodo estudiado y su distribución es, fundamentalmente, medular (figs. 4.20b, d, f, h). En s5c, no se puede identificar claramente si todos los cordones medulares son negativos para PDGFR α .

En el mesonefros, PDGFR α sólo se expresa en la región en donde se desarrollará el conducto de Müller (detalles en figs. 4.20c, d) y en el propio conducto (detalles en figs. 4.20g, h), que se encuentra en el extremo opuesto al de la gónada, por lo que no existe continuidad entre las células gonadales y mesonefricas que expresan este gen.

Figura 4.20: Detección de PDGFR α mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s4 (a, b), s5a (c, d), s5b (e, f) y s5c (g, h), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) y un filtro doble. En la gónada XY, PDGFR α se expresa tanto en la región medular como en la cortical durante los estadios s4 (a) y s5a (c). A partir de s5b, la expresión disminuye en la gónada masculina (e), en donde se detecta alrededor de los cordones testiculares adyacentes a la comisura ventral (detalle en e), y desaparece en s5c (g). En la gónada XX, PDGFR α se localiza principalmente en la médula durante todo el periodo analizado (b, d, f, h). También se observa inmuno-reactividad en la región del conducto de Müller de ambos sexos (detalles en c, d, g, h). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua marca la frontera entre la gónada y el mesonefros. Las líneas de puntos azules delimitan la región cortical de la gónada en a-d, f, h. La barra de escala representa 70 μ m en a, b, y 150 μ m en c-h. (G) Gónada; (MN) mesonefros; (cw) conducto de Wolff; (cm) conducto de Müller.

4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano



4. Resultados

A continuación, se muestra de forma esquemática el patrón de expresión de los genes analizados en este trabajo en relación con la determinación sexual (cuadros 4.1 y 4.2) y la migración celular (cuadros 4.3 y 4.4).

Cuadro 4.1: Patrón de expresión de los genes implicados en la determinación sexual durante las etapas tempranas de la gonadogénesis masculina.

	Gónada XY							
	s4		s5a		s5b		s5c	
	M	C	M	C	M	C	M	C
SF1	+++	+	+++	+	+++	+	+++	-
SOX9	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
DAX1	++	+	+++	+++	++	-	++	-
WNT4	+++	-	+++	-	+	-	-	-
AMH	+	-	++	-	+++	-	+++	-
DMRT1	+++	+	++	-	+++	-	++	-

(+++) Expresión intensa; (++) expresión media; (+) expresión débil.
(M) Médula; (C) corteza.

Cuadro 4.2: Patrón de expresión de los genes implicados en la determinación sexual durante las etapas tempranas de la gonadogénesis femenina.

	Gónada XX							
	s4		s5a		s5b		s5c	
	M	C	M	C	M	C	M	C
SF1	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+
SOX9	-	-	-	-	-	-	-	-
DAX1	++	+	++	+	+++	++	++	+
WNT4	+++	+	+++	+	+++	+	++	+
AMH	-	-	-	-	-	-	-	-
DMRT1	+	+++	+	+++	+	++	-	++

(+++) Expresión intensa; (++) expresión media; (+) expresión débil.
(M) Médula; (C) corteza.

4.3. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano

Cuadro 4.3: Patrón de expresión de los genes implicados en la migración de células mesonérficas al interior de la gónada masculina.

	Gónada XY							
	s4		s5a		s5b		s5c	
	M	C	M	C	M	C	M	C
MT1-MMP	++	++	+++	++	+++	++	-	+++
PDGFR α	+	+	+++	+++	+	+	-	-

(+++) Expresión intensa; (++) expresión media; (+) expresión débil.
(M) Médula; (C) corteza.

Cuadro 4.4: Patrón de expresión de los genes implicados en la migración de células mesonérficas al interior de la gónada femenina.

	Gónada XX							
	s4		s5a		s5b		s5c	
	M	C	M	C	M	C	M	C
MT1-MMP	++	++	+++	+	+++	+	++	+
PDGFR α	+	-	++	-	+++	-	+	-

(+++) Expresión intensa; (++) expresión media; (+) expresión débil.
(M) Médula; (C) corteza.

4. Resultados

4.4. Caracterización molecular de las células germinales

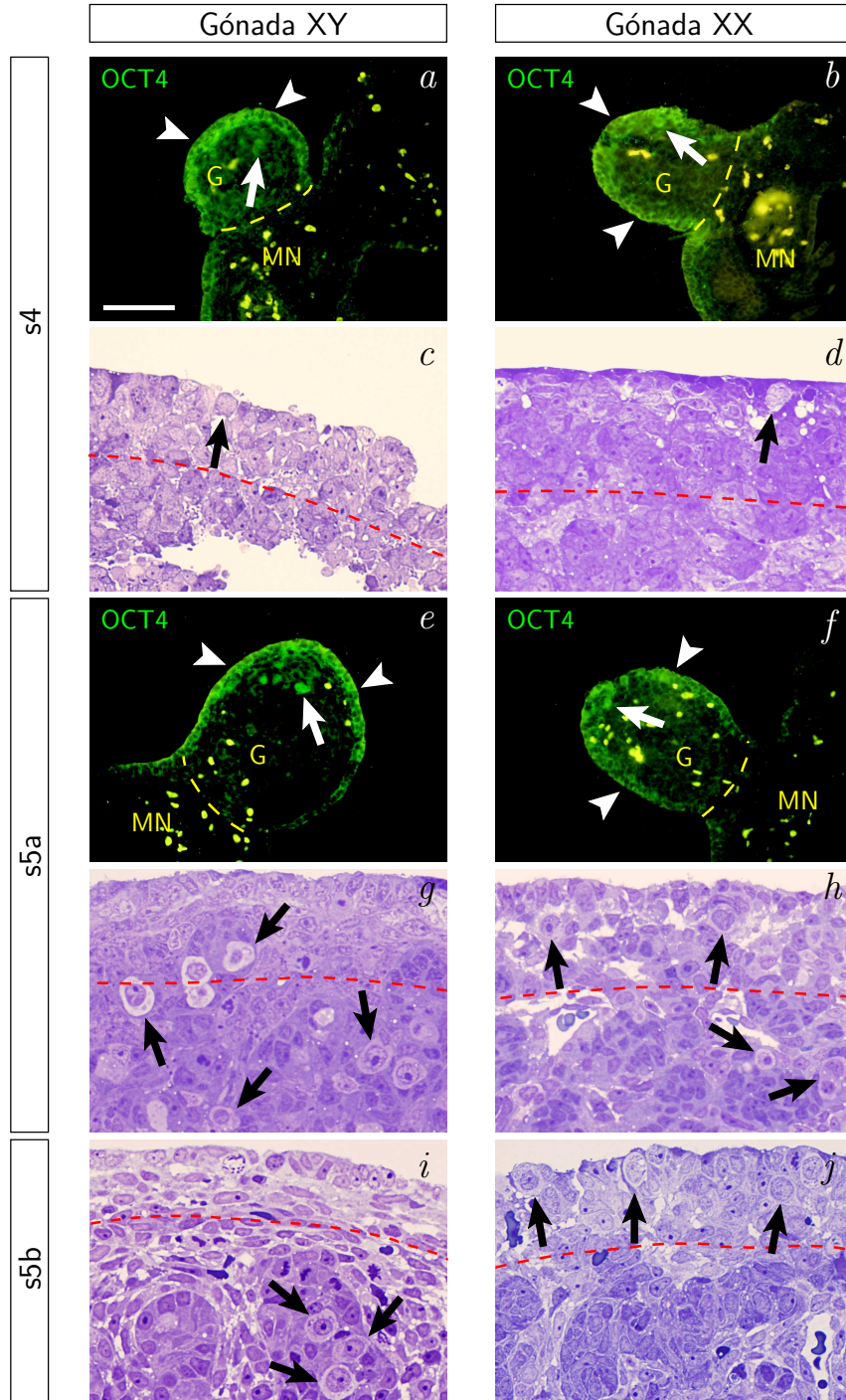
La caracterización de la línea germinal de *T. occidentalis* se llevó a cabo mediante el estudio del marcador molecular genérico de células germinales MVH (*mouse vasa homologue*), así como del marcador específico de células germinales no meióticas OCT4 (*octamer motif binding protein 4*) y de los marcadores de células germinales meióticas γ H2AX (*phosphorilated H2A histone family, member X*) y SYCP3 (*synaptonemal complex protein 3*). Además, se detectó expresión de *DMRT1* en las células germinales XX.

4.4.1. Distribución de las PGCs en el desarrollo gonadal temprano

Con objeto de estudiar las PGCs durante los primeros estadios de la gonadogénesis de *Talpa*, se realizaron inmunofluorescencias para detectar el marcador pre-meiótico OCT4. Aunque con esta técnica pueden observarse algunas PGCs (flechas en figs. 4.21*a, b, e, f*), los resultados obtenidos no proporcionan una información precisa, debido a que varias capas celulares de la corteza gonadal presentan inmuno-reactividad inespecífica y dificultan la localización de las células germinales (puntas de flecha en figs. 4.21*a, b, e, f*). En los cortes semifinos sí pueden identificarse claramente las PGCs, que se caracterizan por tener un gran tamaño y núcleos esféricos. En estos cortes, se observa que las PGCs son muy escasas en el estadio s4, no encontrándose más de una o dos por sección transversal (flechas en figs. 4.21*c, d*).

Figura 4.21: Distribución de las PGCs durante el desarrollo gonadal temprano de *T. occidentalis*. Mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-OCT4 (*a, b, e, f*) no se pueden identificar claramente las PGCs (flechas blancas), debido a que varias capas celulares adyacentes al epitelio celómico se muestran inmuno-reactivas (puntas de flecha) en todos los estadios tempranos, incluyendo s5b (no mostrado). Los cortes semifinos (*c, d, g-j*), sin embargo, si permiten localizar fácilmente las PGCs en estos estadios en función de sus características morfológicas (flechas). Las PGCs son muy escasas en el primordio gonadal (estadio s4) de ambos sexos (*c, d*). En s5a, están presentes en la corteza y la médula tanto de la gónada XY como XX (*g, h*), pero desaparecen de la médula en el estadio s5b sólo en la gónada XX (*j*) y no en la gónada XY (*i*), en donde se localizan en el interior de los cordones testiculares. Los eritrocitos presentan autofluorescencia inespecífica en *a, b, e, f*. La línea discontinua amarilla delimita la frontera entre la gónada (G) y el mesonefros (MN). La línea discontinua roja marca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa $60\mu\text{m}$ en *a, b, e, f*, y $25\mu\text{m}$ en *c, d, g-j*.

4.4. Caracterización molecular de las células germinales



4. Resultados

En el estadio s5a, las PGCs son más abundantes y se encuentran tanto en la corteza como en la médula de las gónadas de ambos sexos (figs. 4.21*g, h*).

A partir de s5b, la distribución de las PGCs muestra un claro dimorfismo entre machos y hembras. En la gónada femenina, las PGCs están localizadas exclusivamente en la corteza gonadal, no observándose en ningún caso en la región medular (fig. 4.21*j*). Por el contrario, en el testículo s5b, las PGCs se disponen en el interior de los cordones testiculares, junto a las células de Sertoli (fig. 4.21*i*).

4.4.2. Localización de las células germinales XX

Para determinar la localización de las células germinales femeninas durante el resto de la organogénesis gonadal, se estudió el patrón de expresión de *MVH*, un marcador molecular genérico de esta línea celular, en cuatro estadios representativos del desarrollo de *T. occidentalis*: el último estadio prenatal (s8; fig. 4.22*a*), y los estadios post-natales s10 (fig. 4.22*b*), s12 (fig. 4.22*c*) y s15a (fig. 4.22*d*). En todos los casos, las células germinales se localizan en la región cortical de la gónada, que corresponde con la porción ovárica del ovoteste en las figuras 4.22*c* y 4.22*d*. Ninguna célula germinal es detectada en la región medular, denominada porción testicular en las figuras 4.22*c* y 4.22*d*.

4.4.3. Localización de las células germinales XY

En el testículo s5c, el epitelio celómico todavía se muestra inmuno-reactivo para el anticuerpo anti-OCT4 (punta de flecha amarilla en fig. 4.23*a*), pero las PGCs pueden ser fácilmente identificadas en el interior de los cordones testiculares (flechas en fig. 4.23*a*), puesto que, aunque siguen siendo escasas, la gónada presenta un mayor tamaño y la fluorescencia del epitelio es menos intensa.

En los machos recién nacidos (estadio s9), las PGCs han proliferado, observándose un mayor número de éstas dentro de los cordones testiculares (fig. 4.23*b*), en donde se disponen a lo largo de todo su diámetro, desde las zonas más profundas a las más periféricas (flechas en fig. 4.23*b*). En el testículo s10, sin embargo, las PGCs comienzan a desplazarse a la periferia de los cordones (fig. 4.23*c*), lugar en el que permanecen a partir de s12 (fig. 4.23*d*). Las PGCs acaban en contacto directo con la lámina basal muy próximas a las células mioides peritubulares, tal como puede observarse en la figura 4.23*e* (estadio s13).

En los individuos adultos, la localización de las células germinales dependerá del periodo en el que se encuentre el ciclo reproductivo, de forma que en la época infértil las células germinales vuelven a ocupar posiciones profundas en los túbulos seminíferos (fig. 4.23*f*). En los machos que han comenzado la reactivación testicular, algunas células germinales empiezan

4.4. Caracterización molecular de las células germinales

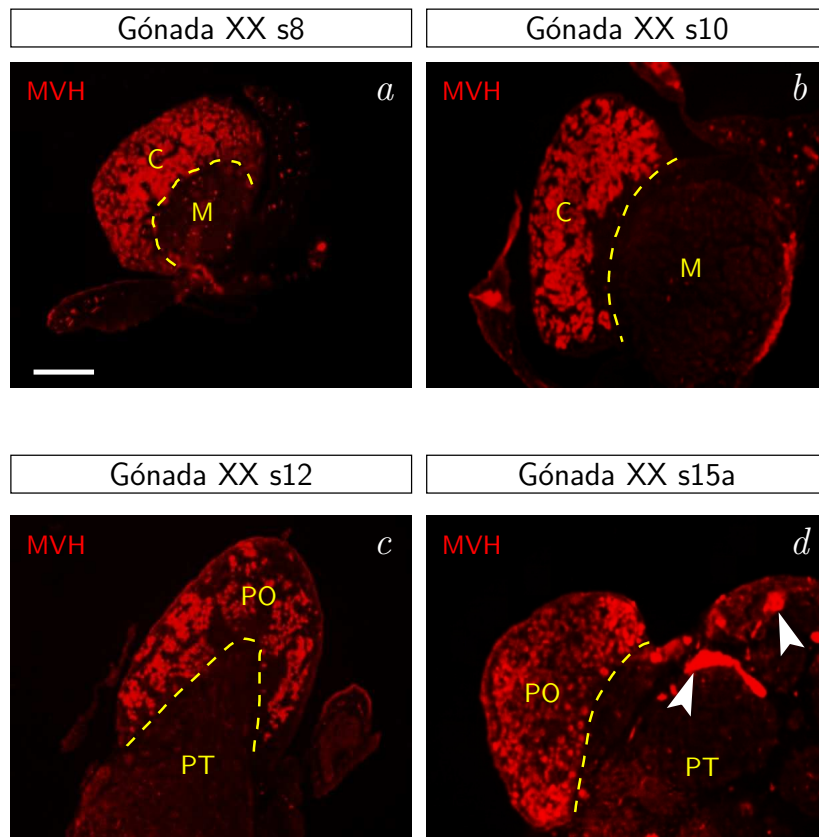


Figura 4.22: Detección del marcador molecular genérico de células germinales MVH mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XX de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s8 (a), s10 (b), s12 (c) y s15a (d), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). Las células germinales se localizan exclusivamente en la corteza gonadal de los individuos XX (a–d). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos de los vasos sanguíneos en d. La línea discontinua delimita la frontera entre la corteza (C) y la médula (M) de la gónada femenina en a y b, y entre la porción ovárica (PO) y la porción testicular (PT) del ovoteste en c y d. La barra de escala representa $300\mu\text{m}$ en todas las imágenes.

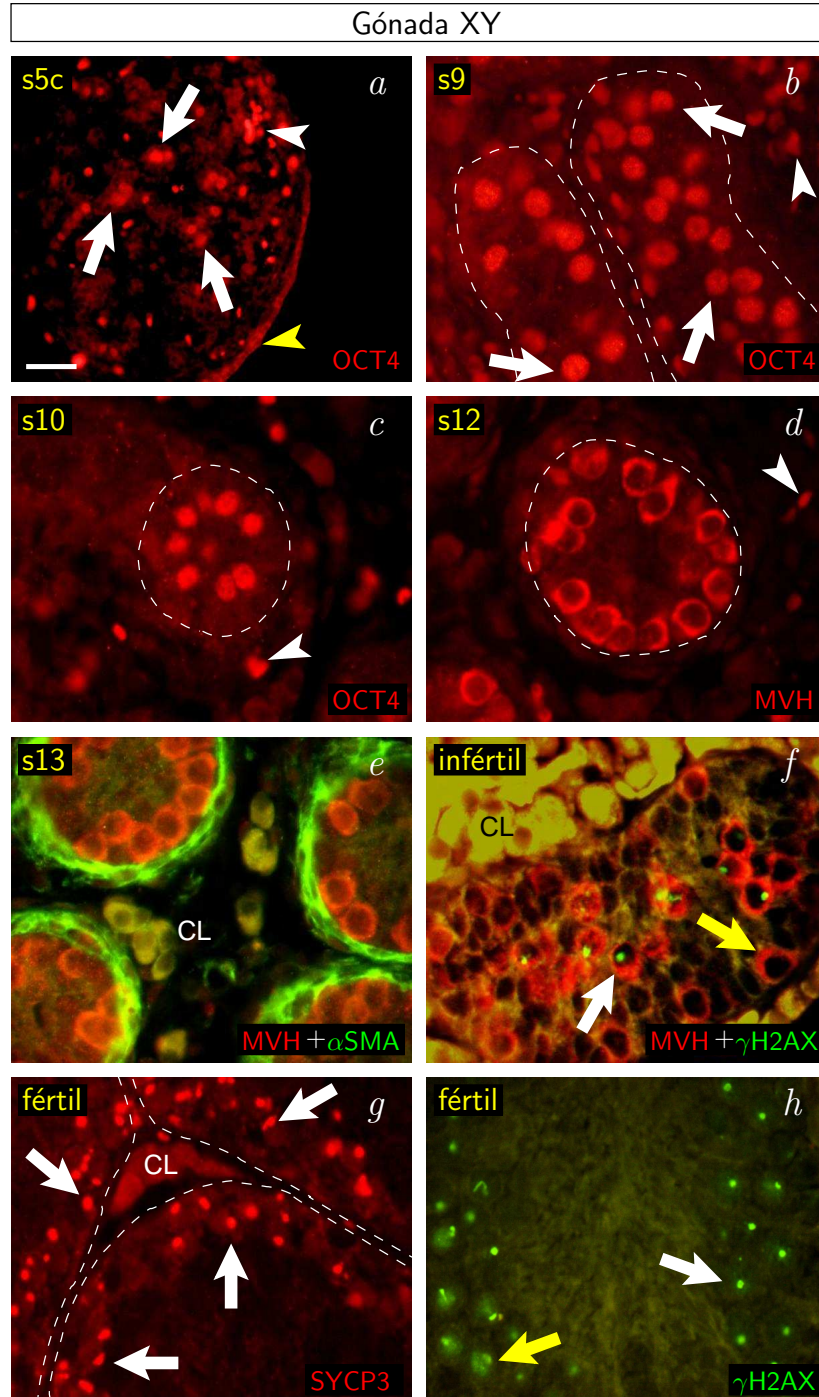
4. Resultados

a expresar el marcador meiótico γ H2AX, el cual codifica una histona que interviene en la reparación del ADN durante la meiosis (flecha blanca en fig. 4.23*f*), mientras que otras no lo hacen porque todavía no han entrado en meiosis (flecha amarilla en fig. 4.23*f*).

En la época fértil, por el contrario, las células germinales vuelven a situarse en la periferia de los túbulos seminíferos, que han aumentado bastante su tamaño (figs. 4.23*g*, *h*), y expresan los marcadores meióticos SYCP3 (fig. 4.23*g*) y γ H2AX (fig. 4.23*h*), indicando que han reiniciado la espermatogénesis. En la figura 4.23*h*, se distinguen dos patrones distintos de distribución de la histona γ H2AX en los espermatoцитos, núcleos con fluorescencia homogénea (flecha amarilla) y núcleos con focos bien definidos (flecha blanca), debido a que éstos se encuentran en distintas etapas de la primera profase meiótica.

Figura 4.23: Caracterización de células germinales pre- y post-meióticas en individuos XY de *T. occidentalis*. Las células germinales XY fueron caracterizadas mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos frente al marcador molecular pre-meiótico OCT4, el marcador de células germinales genérico MVH y los marcadores meióticos SYCP3 y γ H2AX, así como el marcador de células mioides peritubulares α SMA. (a) En el testículo s5c, OCT4 se observa en los núcleos de las células germinales (flechas) y en las células del epitelio celómico (punta de flecha). (b) En recién nacidos (estadio s9), OCT4 se expresa en células germinales con distintas localizaciones (flechas) en el interior de los cordones testiculares (delimitados por líneas discontinuas blancas). En s10 (c), las células germinales aún ocupan posiciones profundas dentro de los cordones, mientras que en s12 (d, inmunodetección citoplasmática de MVH) ya han migrado a la periferia de los mismos. (e) Mediante inmunofluorescencia doble secuencial de MVH (rojo) y α SMA (verde), se observa que las células germinales están próximas a las células mioides en la periferia de los cordones testiculares del estadio s13. (f) Inmunofluorescencia doble secuencial para MVH (rojo) y γ H2AX (verde) en un testículo de un macho adulto infértil de topo; algunas células germinales han reiniciado la meiosis (flecha blanca) mientras que otras aún no lo han hecho (flecha amarilla). (g) Detección de SYCP3 en un testículo de un macho adulto fértil con abundantes espermatoцитos (flechas); los túbulos seminíferos están contorneados por líneas discontinuas blancas. (h) Expresión de γ H2AX en un testículo de un macho fértil, observándose dos patrones de expresión diferentes: núcleos con focos de fluorescencia verde intensa (flecha blanca) y núcleos con fluorescencia homogénea y menos intensa (flecha amarilla). Las puntas de flecha blancas señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. El anticuerpo secundario utilizado en las inmunofluorescencias para OCT4 (a-c), MVH (d-f) y SYCP3 (g) está marcado con Cy3 (rojo) y el utilizado para α SMA (e) y γ H2AX (f, h) con FITC (verde). (CL) Células de Leydig autofluorescentes. La barra de escala representa 100 μ m en a, y 25 μ m en b-h.

4.4. Caracterización molecular de las células germinales



4. Resultados

4.4.4. Comienzo de la meiosis femenina

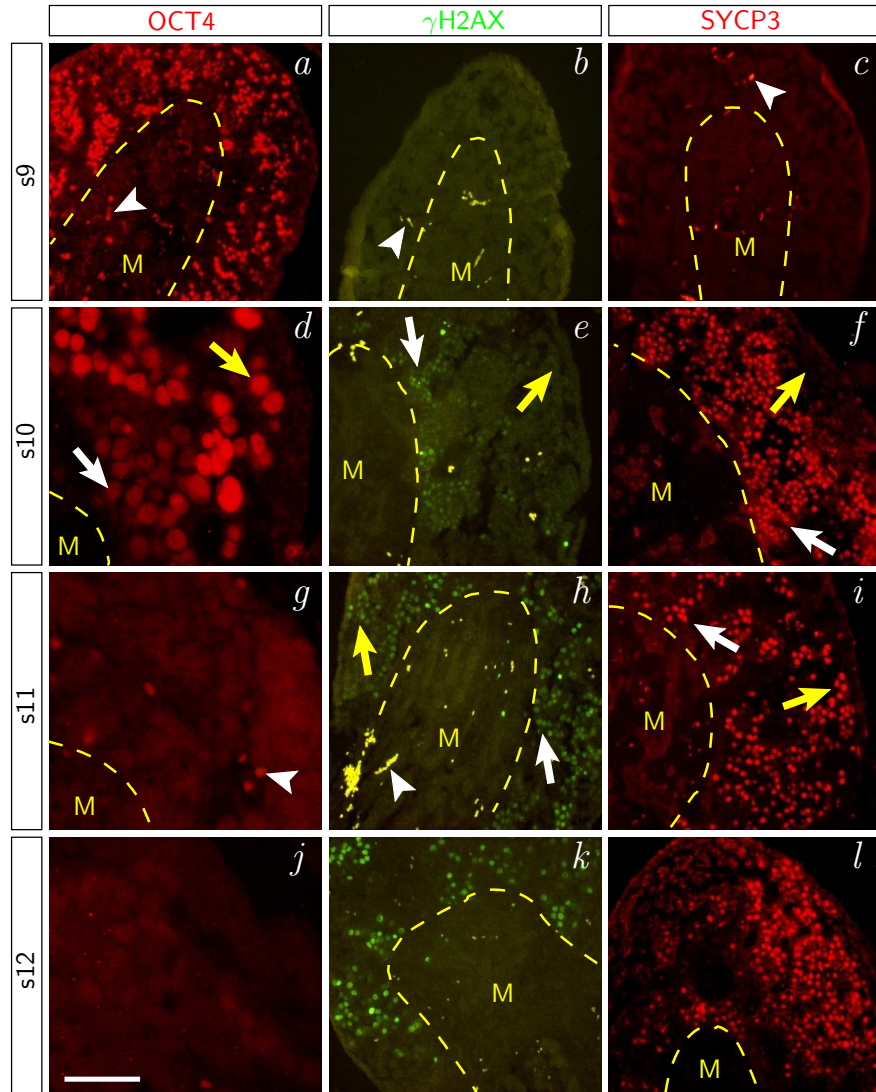
El establecimiento de momento exacto en el que se inicia la meiosis en las hembras de *T. occidentalis* se realizó mediante el estudio del marcador pre-meiótico OCT4 y de los marcadores meióticos γ H2AX y SYCP3 (fig. 4.24).

OCT4 es detectado en las células germinales de las hembras recién nacidas (estadio s9), mientras que no ocurre lo mismo con γ H2AX y SYCP3 (fig. 4.24a-c), lo que indica que aún no ha comenzado la meiosis en estos individuos. En s10, las células germinales de la corteza gonadal externa continúan expresando OCT4 (flecha amarilla en fig. 4.24d), pero las que se localizan en las zonas más profundas han disminuido el nivel de expresión o bien han dejado de expresar este gen (flecha blanca en fig. 4.24d). Precisamente en estas células de la corteza profunda de la gónada XX s10, comienza a detectarse expresión de γ H2AX y SYCP3 (flechas blancas en figs. 4.24e, f), mientras que las de la periferia aún no expresan estos marcadores (flechas amarillas en figs. 4.24e, f). En el estadio s11, todas las células germinales de la gónada femenina son negativas para OCT4 (fig. 4.24g) y muestran expresión de los marcadores meióticos γ H2AX y SYCP3 (figs. 4.24h, i). Esta misma situación se observa en el estadio s12 (figs. 4.24j-l).

Estos datos ponen de manifiesto que en *T. occidentalis* la oogénesis es un proceso post-natal, que se inicia en las células germinales de la corteza profunda en el estadio s10 y se extiende hacia el exterior de la gónada en una onda que concluye en s11.

Figura 4.24: Detección del marcador pre-meiótico OCT4 y los marcadores meióticos γ H2AX y SYCP3 mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XX de *T. occidentalis*, correspondientes a los estadios s9 (a-c), s10 (d-f), s11 (g-i) y s12 (j-l), utilizando anticuerpos secundarios marcados con Cy3 (rojo) y con FITC (verde). Todos los núcleos de las células germinales XX en el estadio s9 son positivos para OCT4 (a), mientras que no se observa expresión de γ H2AX (b) ni SYCP3 (c). En el estadio s10, la expresión de OCT4 disminuye gradualmente comenzando por las células más profundas (flecha blanca en d), aunque todavía se mantiene alta en las células más externas (flecha amarilla en d); contrariamente, la expresión de γ H2AX y la de SYCP3 comienza a detectarse en la corteza profunda (flechas blancas en e, f) pero no se observa en la corteza externa (flechas amarillas en e, f). En s11, todas las células germinales, incluidas las de la corteza externa (flechas amarillas), expresan los dos marcadores meióticos (h, i), pero no el marcador pre-meiótico (g). La misma situación se observa en s12 (j-l). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua delimita la frontera entre la médula (M) y la corteza gonadal. La barra de escala representa 40 μ m en d, g, j, y 100 μ m en el resto de figuras.

4.4. Caracterización molecular de las células germinales



4. Resultados

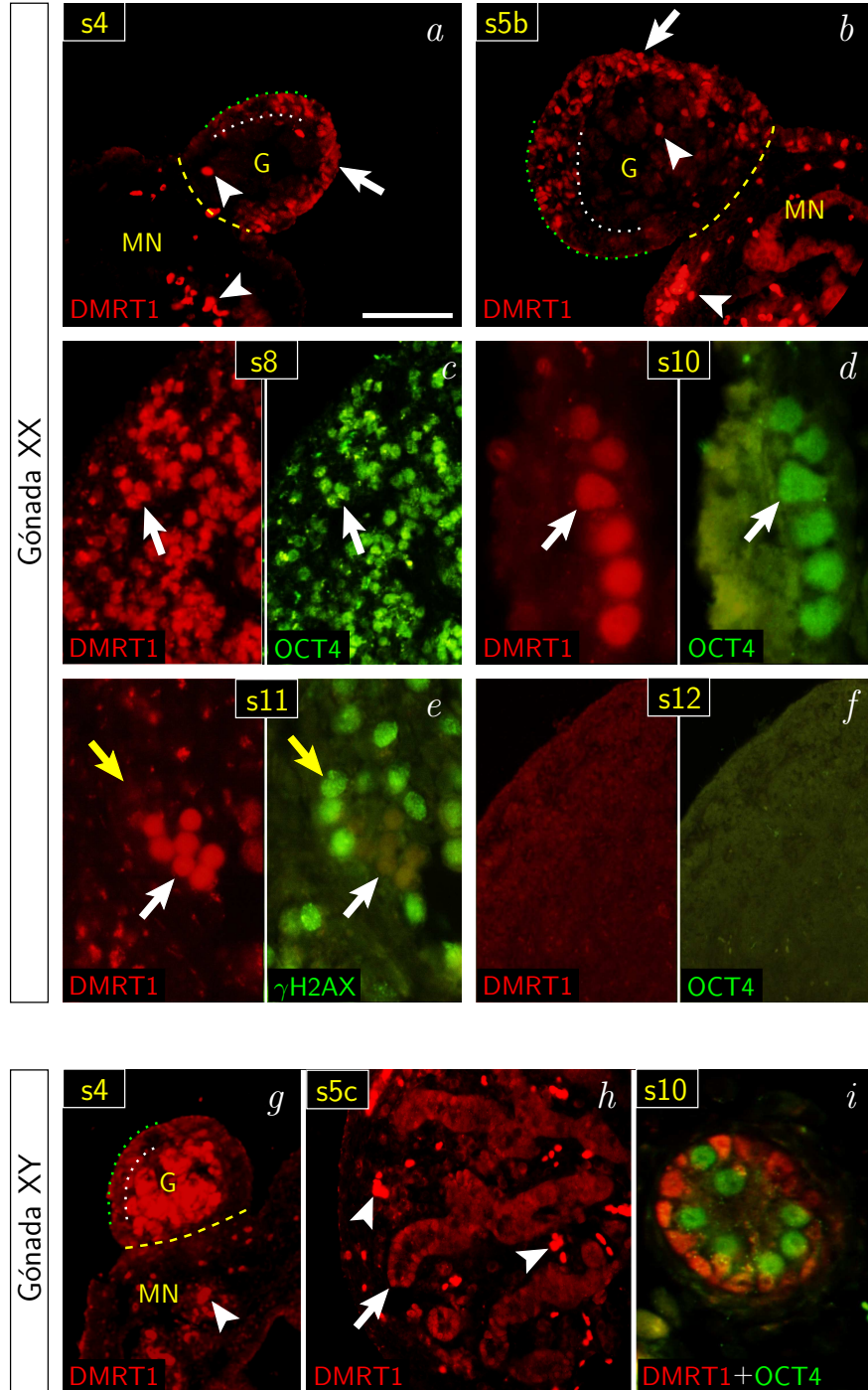
4.4.5. Expresión de *DMRT1* en células germinales XX

DMRT1 presenta un patrón de expresión muy singular en las hembras de *T. occidentalis*. Como ya se ha indicado con anterioridad, este gen se expresa en la región cortical del primordio gonadal femenino en varios tipos celulares (fig. 4.25a). A partir de s5b, puede intuirse que las células germinales XX pre-meióticas son positivas para *DMRT1* (flecha en fig. 4.25b), algo que queda comprobado al observarse co-localización de esta proteína con el marcador pre-meiótico *OCT4* en los estadios s8 (fig. 4.25c) y s10 (fig. 4.25d). En s11 (fig. 4.25e), se observa que las células germinales XX que han comenzado la meiosis, identificables porque expresan el marcador meiótico γ H2AX, han dejado de expresar *DMRT1* (flechas amarillas en fig. 4.25e), mientras que las que aún permanecen en un estado pre-meiótico continúan expresando *DMRT1* (flechas blancas en fig. 4.25e). En el estadio s12, ya no se detecta expresión de *DMRT1* ni de *OCT4* (fig. 4.25f), lo que indica que *DMRT1* sólo se expresa en las células germinales XX antes del inicio de la meiosis.

Por otro lado, los resultados en machos apoyan la idea de que *DMRT1* se expresa en el testículo exclusivamente en la línea Sertoli desde el estadio s4 (figs. 4.25g-i), no detectándose en ningún caso co-localización de *DMRT1* y *OCT4* en las células germinales XY (fig. 4.25i).

Figura 4.25: Detección de *DMRT1* mediante inmunofluorescencia en células germinales pre-meióticas XX de *T. occidentalis*, utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). En la gónada femenina, *DMRT1* se expresa en las células corticales durante el periodo s4-s5b (flechas en a, b). En el periodo s8-s10 (c, d), las células positivas para *DMRT1* expresan también el marcador pre-meiótico *OCT4* (flechas blancas), indicando que son células germinales. En las hembras s11 (e), sólo las células germinales no meióticas aún expresan *DMRT1* (flechas blancas), mientras que las que han comenzado la meiosis (positivas para el marcador meiótico γ H2AX; flechas amarillas), ya no expresan *DMRT1*. En s12 (f), todas las células germinales XX han iniciado la meiosis (evidenciado por la ausencia de *OCT4*) y no expresan *DMRT1*. En machos (g-i), *DMRT1* es detectado en las células medulares del primordio gonadal (estadio s4, imagen g), en la mayoría de las células de los cordones del testículo s5c (flecha blanca en h) y en las células de Sertoli de los testículos post-natales (estadio s10, imagen i); pero no se observa en las células germinales masculinas (*DMRT1* y *OCT4* no aparecen co-localizados en la figura i). Las puntas de flecha señalan autofluorescencia inespecífica de los eritrocitos. La línea discontinua delimita la frontera entre la gónada y el mesonefros. La línea de puntos verde marca la periferia de la gónada y la blanca el límite entre la corteza y la médula. La barra de escala representa 100 μ m en b, f, h, 80 μ m en a, g, 50 μ m en c, 40 μ m en e, i, y 30 μ m en d. (G) Gónada; (MN) mesonefros.

4.4. Caracterización molecular de las células germinales



4. Resultados

4.5. Caracterización molecular de las células de Leydig

La caracterización molecular de las células de Leydig adultas masculinas y femeninas de *T. occidentalis* se llevó a cabo utilizando anticuerpos específicos frente al factor esteroideogénico 1 (SF1), relacionado con la activación de las rutas esteroideogénicas, y el enzima P450scc (*cytochrome P450 side chain cleavage*), que interviene en la síntesis de testosterona.

SF1 se detecta en los núcleos de tres tipos celulares del testículo, aunque con diferente intensidad (fig. 4.26a). Las células de Sertoli muestran una expresión leve de este gen (flecha amarilla en fig. 4.26a), mientras que en las células intersticiales, entre las que se incluyen las células de Leydig con núcleos esféricos (flecha blanca en fig. 4.26a), y las células mioides peritubulares con núcleos alargados (punta de flecha en fig. 4.26a), es mucho mayor. En el ovoteste adulto, la expresión de *SF1* también es detectada en las células mioides peritubulares (punta de flecha en fig. 4.26b), en las células de Leydig (flecha blanca en fig. 4.26b) y en las células que componen las esférulas (flecha amarilla en fig. 4.26b), todas ellas con un nivel de expresión similar al observado en la gónada XY.

En relación con *P450scc*, este gen se expresa exclusivamente en las células de Leydig tanto masculinas como femeninas, en donde la proteína presenta una localización citoplasmática (flechas blancas en figs. 4.26c, d.)

4.5. Caracterización molecular de las células de Leydig

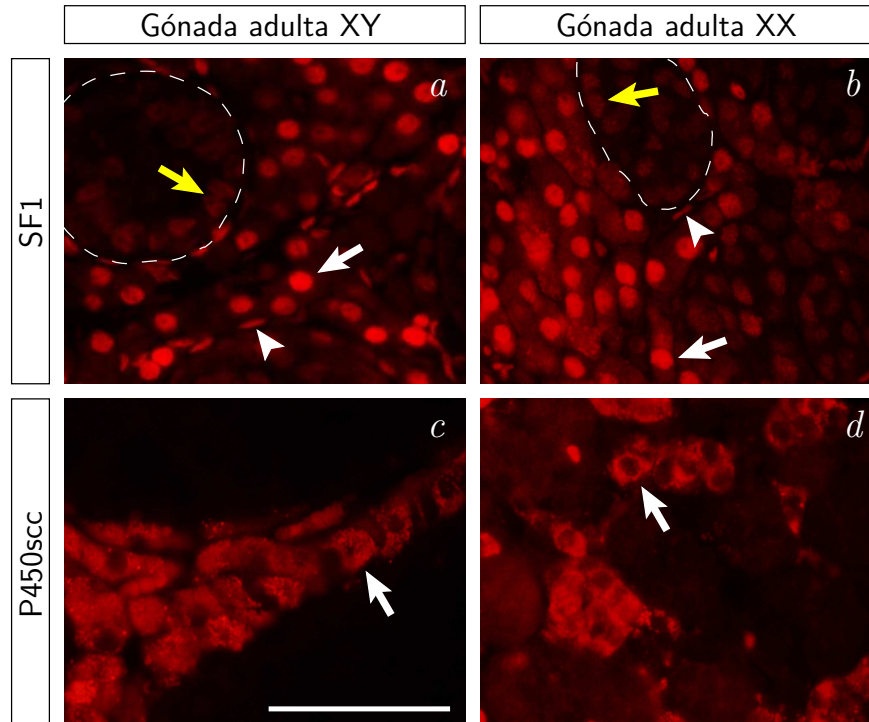


Figura 4.26: Detección de SF1 y P450scc mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas adultas de *T. occidentalis*, correspondientes a individuos capturados durante la época infértil (*a*, *b*, *d*) y durante la época fértil (*c*), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). (*a*, *b*) SF1 es detectado en los núcleos de las células intersticiales de ambos sexos, incluidas las células de Leydig (flechas blancas) y las mioides peritubulares (puntas de flecha), así como, aunque con menor intensidad, en los núcleos de las células de Sertoli del testículo y de las células de las esférulas de la porción testicular del ovoteste (flechas amarillas). P450scc se observa en el citoplasma de las células de Leydig tanto masculinas (*c*) como femeninas (*d*). La línea discontinua delimita la periferia de un cordón testicular en *a* y de una esférula en *b*. La barra representa $100\mu\text{m}$ en todas las imágenes.

5. Discusión

Contenidos

5.1. Especificidad de los anticuerpos utilizados . . .	136
5.2. Control genético del desarrollo testicular en machos	137
5.3. Caracterización y desarrollo del tejido ovárico .	144
5.3.1. Control genético del desarrollo de la corteza gonadal en hembras	144
5.3.2. Distribución de las PGCs en la gónada XX	147
5.3.3. Comienzo de la meiosis femenina	148
5.4. Desarrollo del tejido testicular XX	149
5.4.1. Ausencia de células germinales durante el desarrollo testicular del ovoteste	149
5.4.2. Expresión génica durante el desarrollo testicular en hembras	150
5.4.3. Migración celular en la gónada XX	152
5.4.4. Caracterización y origen de la población de células de Leydig XX	154
5.5. Formación del conducto de Müller	156
5.6. Origen de la reversión sexual de <i>Talpa</i>	157
5.7. El patrón de desarrollo gonadal en mamíferos .	160

5. Discusión

5.1. Especificidad de los anticuerpos utilizados

La mayor parte del estudio de expresión génica realizado en este trabajo se llevó a cabo utilizando anticuerpos comerciales (ver cuadro 3.4). Teniendo en cuenta que no hay anticuerpos específicos disponibles frente a proteínas de *Talpa*, el criterio en el que nos basamos para su elección fue el nivel de conservación del fragmento peptídico para el que fueron elaborados. De esta manera, se procuró que todos los anticuerpos elegidos hubiesen sido probados antes mediante «inmunoblot» en varias especies de mamíferos, como humano, rata y ratón. Este hecho nos ha permitido tener una alta confianza en los datos obtenidos en *T. occidentalis*. Además, el perfil de expresión observado en los machos de topo nos ha aportado una mayor seguridad en nuestros resultados, puesto que el desarrollo de la gónada XY en esta especie es similar al del resto de mamíferos y puede ser comparado con el de otras especies muy estudiadas, como el ratón.

A pesar de que existe una amplia variedad de anticuerpos comerciales, no nos fue posible encontrar alguno que reconociese fragmentos antigénicos de DAX1 y WNT4 conservados en *Talpa*. Por tanto, tal como se ha detallado con anterioridad, hubo que producir anticuerpos específicos frente a dichas proteínas de *T. occidentalis*. En este caso, fue necesario realizar un control más preciso de la especificidad de los sueros obtenidos, lo que nos ha aportado varios indicios que apoyan firmemente la idea de que los sueros producidos para este trabajo reconocen las proteínas DAX1 y WNT4 de topo y ratón.

La primera consideración que hay que tener en cuenta, es que los oligopéptidos utilizados para la inmunización de conejos están codificados por secuencias génicas muy conservadas entre distintos grupos de mamíferos, como topo, humano, cerdo, rata y ratón. Como consecuencia de ello, la propia secuencia de aminoácidos también presenta una alta homología entre dichas especies. Además, estas secuencias aminoacídicas se determinaron con el método descrito por Kolaskar y Tongaonkar (1990), que selecciona un fragmento con una antigenicidad potencial muy alta.

Asimismo, se demostró mediante ELISA que el suero anti-WNT4 presenta inmuno-reactividad específica frente al péptido de WNT4 utilizado. Esta técnica no se le aplicó al suero anti-DAX1 porque, tanto el proceso de inmunización del conejo como el control del suero obtenido, fueron realizados por *SIGMA-GENOSYS*.

Otro dato que apoya la idea de que las proteínas detectadas en las muestras de *Talpa* son efectivamente DAX1 y WNT4, es que el perfil de expresión génica temporal y espacial obtenido en el testículo de topo es coherente con el de ratón. En este trabajo, DAX1 se detecta en el primordio gonadal y el mesonefros de *T. occidentalis* durante el estadio s4, así como en las células que forman los cordones testiculares y en las células de Leydig a partir de s5b, de forma similar a lo que se ha descrito para *M. musculus* (Ikeda *y col.*,

5.2. Control genético del desarrollo testicular en machos

2001). Asimismo, en topo, *WNT4* se expresa durante las etapas tempranas de la testiculogénesis hasta la aparición de los cordones testiculares en s5b, momento en el cual es inhibido. También se observa expresión de *WNT4* en el metanefros y el conducto de Müller, igual que ocurre en ratón (Vainio *y col.*, 1999).

Aunque todos estos argumentos inducen a pensar que no hay motivo para dudar de la especificidad de los anticuerpos, decidimos realizar una prueba en secciones de gónadas de ratón de 12.5 dpc. Los resultados que se obtuvieron en estas muestras corresponden con el patrón esperado, por lo que se puede afirmar que los sueros de conejo utilizados para el estudio de DAX1 y WNT4 reconocen regiones de sendas proteínas conservadas, al menos, en topo y ratón.

5.2. Control genético del desarrollo testicular temprano en machos de *T. occidentalis*

Los topos del género *Talpa* presentan varias características excepcionales que les convierten en un grupo único en relación con desarrollo gonadal femenino (Barrionuevo *y col.*, 2004b; Jiménez *y col.*, 1993). En este trabajo, hemos investigado también el control genético del desarrollo testicular en individuos XY de *T. occidentalis*. Para determinar el alcance de los resultados obtenidos y comprobar si existen datos significativos en la testiculogénesis de esta especie, es necesario comparar su perfil de expresión génica con el de otros grupos de mamíferos. En este sentido, se ha elegido al ratón como modelo por ser la especie mejor caracterizada.

Los testículos de topo se desarrollan de acuerdo con un programa temporal similar al de otros mamíferos.

El desarrollo testicular es un proceso muy conservado entre distintos grupos de vertebrados. Para comparar el programa temporal de la gonadogénesis masculina de *T. occidentalis* con la de otros mamíferos, como humano, cerdo, rata y ratón, Barrionuevo *y col.* (2004b) establecieron el concepto de «progreso del desarrollo» para dicho proceso en estas especies. Este parámetro está determinado por el porcentaje de días de gestación en el que ocurre un evento morfológico concreto, tomando como 100 % el valor correspondiente al estadio de desarrollo *Carnegie no. 23*, que es fácilmente identificable en todos los casos. Según este estudio, la aparición del primordio gonadal indiferenciado y el comienzo de la diferenciación testicular tendrían un valor aproximado de 60 % y 80 %, respectivamente, en las cinco especies analizadas (ver figura 5.1). Este dato indica que, en principio, las etapas tempranas de la testiculogénesis de *Talpa* ocurren en momentos similares a las del resto de mamíferos.

A pesar de que el periodo de gestación de *T. occidentalis* dura una semana

5. Discusión

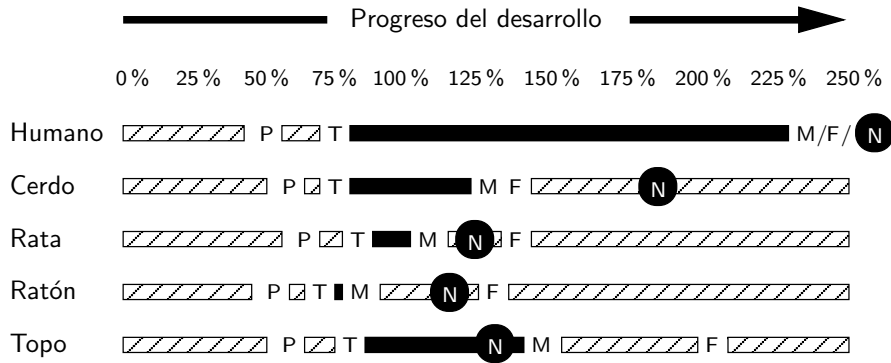


Figura 5.1: Progreso del desarrollo gonadal en distintas especies de mamíferos con diferente tamaño corporal. El valor de cada proceso se obtiene calculando el porcentaje de días de gestación en relación al estadio *Carnegie no. 23* (21 dpc en *T. occidentalis*), que corresponde con el 100%. Las letras indican el momento relativo en el que ocurren las etapas más significativas de la gonadogénesis, como la formación del primordio gonadal (P), el comienzo de la diferenciación testicular en machos (T) y el comienzo de la meiosis (M) y la foliculogénesis (F) en hembras, así como el momento del nacimiento (N). Las barras negras representan el periodo que transcurre entre el comienzo de la diferenciación testicular en machos y la diferenciación ovárica en hembras. Fuente: Barrionuevo *y col.* (2004b).

más que el de ratón (28 y 21 días, respectivamente), existe un paralelismo morfológico y cronológico en el progreso del desarrollo de ambas especies (Barrionuevo *y col.*, 2004a,b). Esta semana de diferencia permite que, en *T. occidentalis*, se produzca un mayor crecimiento intrauterino, de ahí que las crías de topo sean bastante más grandes que las de ratón en el nacimiento.

¿Es también similar el control genético del desarrollo testicular?

Según lo anterior, podría considerarse la hipótesis de que los perfiles de expresión de los genes que intervienen en la gonadogénesis de *M. musculus* y *T. occidentalis* son también similares. Por lo que respecta a *SF1*, *DAX1* y *WNT4*, los datos obtenidos en este trabajo apoyan esta idea.

El gen *SF1* se expresa en el primordio gonadal murino, así como en las células de Sertoli y en las de Leydig a partir de los 12.5 dpc (Ikeda *y col.*, 1994). En el presente estudio también se detecta *SF1* en la gónada indiferenciada XY del estadio s4 de *Talpa*, así como en las células de Sertoli y de Leydig de los estadios s5b y s5c. La expresión de *SF1* en las células de la línea Sertoli es muy intensa en s5a y un poco menor en s5b y s5c, coincidiendo con una mayor expresión en las células de Leydig, que han comenzado a diferenciarse en s5b. Estos resultados son coherentes con el papel descrito para *Sf1* tanto

5.2. Control genético del desarrollo testicular en machos

en el establecimiento de la cresta genital como en la activación del gen *Amh* en las células de Sertoli y de los genes de la esteroidogénesis en las células de Leydig (Ikeda *y col.*, 1994; Shen *y col.*, 1994).

El gen *DAX1* de *T. occidentalis* muestra un patrón de expresión similar al de *M. musculus*, excepto por el hecho de que en topo parece expresarse también en las células germinales. Este dato aún no se ha comprobado con marcadores moleculares de células germinales, pero el tamaño y la morfología de algunas células positivas para *DAX1* apuntan a ello. Al igual que en ratón (Ikeda *y col.*, 2001), la proteína *DAX1* de topo está presente en el primordio gonadal masculino y en las células de Sertoli y de Leydig cuando éstas ya se han diferenciado. El hecho de que *DAX1* presente una localización citoplasmática podría estar relacionado con la función que se le ha asignado a esta proteína en la regulación post-transcripcional, para la cual se une directamente al ARNm y a los polirribosomas (Lalli *y col.*, 2000).

WNT4 es una proteína involucrada en el desarrollo ovárico. En ratón, *Wnt4* se expresa en la cresta genital de ambos sexos, pero dicha expresión es inhibida en la gónada XY a los 11.5 dpc, durante el periodo en el que ocurre la determinación del sexo (Vainio *y col.*, 1999). Además, esta proteína es necesaria para la nefrogénesis del riñón metanéfrico y está específicamente involucrada en la formación del conducto de Müller (Stark *y col.*, 1994; Vainio *y col.*, 1999). Los resultados de *WNT4* en los machos de topo coinciden con este patrón. Este gen se expresa en la gónada indiferenciada y en las células de la línea Sertoli, aunque dicha expresión disminuye significativamente en el estadio s5b y desaparece en s5c. Asimismo, también se detecta *WNT4* tanto en el metanefros como en la región del conducto de Müller, algo que también ocurre con *DAX1*. Esta coincidencia entre los resultados de *DAX1* y *WNT4* podría ser explicada por el hecho de que *WNT4* se ha propuesto como un activador directo o indirecto de *DAX1* (Jordan *y col.*, 2001; Mizusaki *y col.*, 2003).

Las células de Sertoli de topo se diferencian, al menos, dos días antes de la formación de los cordones testiculares.

En ratón, la cresta genital aparece como un engrosamiento de la cara ventrolateral del mesonefros a los 9.5 dpc. Aunque *Sry* comienza a expresarse a los 10.5 dpc, el primer signo morfológico de diferenciación en la gónada XY, que corresponde con la formación de los cordones testiculares, no se observa hasta los 12.5 dpc. Entre ambos eventos, se produce la expresión de *Sox9* en las células pre-Sertoli a los 11.5 dpc, lo que supondrá que este tipo celular adquiera el fenotipo Sertoli un día después e inicie la secreción de *Amh* (Brennan y Capel, 2004).

En *T. occidentalis*, los cordones testiculares se aprecian por primera vez a los 18 dpc, en el estadio s5b (Barrionuevo *y col.*, 2004b). Por tanto, de acuerdo con la hipótesis planteada según la cual los perfiles de expresión génica durante

5. Discusión

el desarrollo testicular deberían ser similares en topo y ratón, sería de esperar que *SRY* comenzara a expresarse sobre los 16 dpc en el primordio gonadal XY (estadio s4) y un día después, a los 17 dpc (estadio s5a), lo haría *SOX9*. Una vez formados los cordones testiculares, tendría que iniciarse la expresión de *AMH* en las células de Sertoli, tal como se ha descrito por Zurita *y col.* (2003). Sorprendentemente, los datos obtenidos en este trabajo muestran una expresión intensa de *SOX9* en la mayoría de las células medulares de la cresta genital, uno o dos días antes de lo que cabría esperar. Además, unas pocas células de la médula profunda también expresan *AMH*, dos o tres días antes de que aparezcan los cordones testiculares. El hecho de que existan células productoras de hormona anti-Mülleriana en el estadio s4, amplía el perfil de expresión temporal de *AMH* establecido por Zurita *y col.* (2003) y pone de manifiesto que la diferenciación de las células de Sertoli en *T. occidentalis* se inicia en una etapa tan temprana como el blastema gonadal indiferenciado. Esta circunstancia es de gran relevancia, puesto que los estudios realizados en ratón indican que la diferenciación de las células de Sertoli es paralela a la formación de los cordones testiculares (Tilman y Capel, 1999). La aparición del fenotipo Sertoli dos o tres días antes de este evento es un hecho inédito no descrito hasta ahora.

En relación con el gen *DMRT1*, ya se detecta un nivel de expresión muy alto en la gónada XY del estadio s4. En ratón, este gen se expresa levemente en el primordio gonadal, no observándose un aumento en los niveles de proteína hasta los 12.5 dpc, coincidiendo con la diferenciación de las células de Sertoli (De Grandi *y col.*, 2000; Raymond *y col.*, 1999a, 2000). En *T. occidentalis*, el patrón de expresión de este marcador sertoliano es similar al de *SOX9*, lo que evidencia aún más el hecho de que las células de Sertoli se diferencian muy tempranamente en la gonadogénesis masculina de esta especie.

Estos resultados demuestran que la formación de los cordones testiculares y la diferenciación de las células de Sertoli son dos procesos independientes que no deben ocurrir necesariamente al mismo tiempo y que, por tanto, podrían estar causados por factores diferentes.

La diferenciación de las células de Sertoli ocurre siguiendo una oleada desde el centro a la periferia de la gónada.

El estudio de los animales de ganado bovino Freemartin determinó que AMH producía masculinización de animales hembra cuando recibían esta hormona de un hermano macho a través de la placenta (Jost *y col.*, 1975). Esta masculinización también se observó en cultivos de gónadas XX a los que se les adicionaba AMH exógena (Charpentier y Magre, 1990; Vigier *y col.*, 1987) y en ratones transgénicos hembra que expresaban ectópicamente AMH (Behringer *y col.*, 1990). En los tres casos, las células foliculares de los ovarios se «transdiferenciaban» en células de Sertoli y formaban estructuras similares a cordones testiculares, por lo que se sugirió que AMH podría estar

5.2. Control genético del desarrollo testicular en machos

involucrada en el desarrollo testicular. No obstante, esta idea se desestimó y se propuso que la masculinización de los ovarios se debía a que AMH resultaba citotóxica para los oocitos, de forma que la muerte de éstos hacía que no hubiese un ambiente celular adecuado para que se produjese la diferenciación ovárica, siendo realmente la responsable de la aparición del fenotipo Sertoli en hembras (McLaren, 1990).

Aunque estaba muy aceptado que una de las principales funciones de SOX9 era activar el promotor de *AMH*, últimamente este hecho se ha puesto en duda debido a que se ha comprobado que en aves y caimanes *AMH* se expresa antes de que lo haga *SOX9* (Oreal *y col.*, 1998; Western *y col.*, 1999). En estas especies la expresión de *AMH* es muy temprana, incluso anterior a la de uno de los primeros genes de la ruta masculina como es *SOX9*, lo que podría hacer pensar que, quizás, la hormona anti-Mülleriana si desempeñe algún papel en la determinación sexual. Nosotros también hemos detectado AMH en las primeras etapas de la gonadogénesis masculina de *T. occidentalis*, en un reducido número de células de la cresta genital. No obstante, el hecho de que, prácticamente, todas las células somáticas medulares en el estadio s4 sean positivas para SOX9 y que tan sólo unas pocas lo sean para AMH, demuestra que *SOX9* se expresa antes que *AMH* y, por tanto, apoya la idea de que el primero activa al segundo. Si se acepta esto, los resultados de AMH sugieren de manera indirecta que, en *T. occidentalis*, el proceso de activación de *SOX9* podría ocurrir en una oleada que se iniciaría en el centro de la cresta genital y se extendería hacia la periferia. Este modelo de diferenciación de las células de Sertoli es coherente con las observaciones de Bullejos y Koopman (2001) sobre la activación de *Sry* en ratón.

En la gónada XY se observa una compartimentación funcional previa a la organización morfológica.

En el estadio s5a de *T. occidentalis* (17 dpc), todas las células positivas para SOX9 lo son también para AMH, indicando que ya se han diferenciado como células de Sertoli. Curiosamente, en este estadio aún no se observa una diferenciación morfológica del testículo (Barrionuevo *y col.*, 2004b). Por tanto, nuestros resultados ponen de manifiesto la existencia de una diferenciación funcional de la gónada masculina previa a la diferenciación desde el punto de vista morfológico. El hecho de que las imágenes de inmunofluorescencia para AMH, SOX9, SF1 y DMRT1, muestren estructuras cordonaes que no son identificables a nivel morfológico, es coherente con esta idea y demuestra, además, la existencia de una compartimentación funcional anterior al desarrollo de los cordones testiculares. Como ya se comentado, este hecho difiere con lo que ocurre en ratón, en donde el fenotipo Sertoli no se establece hasta los 12.5 dpc, cuando los cordones testiculares ya se han formado (Tilmann y Capel, 1999).

5. Discusión

La migración de células mesonéfricas a la gónada XY de topo parece iniciarse entre los estadios s5a y s5b.

Los procesos de migración celular desempeñan un papel muy importante en la organogénesis del testículo. En particular, resulta fundamental la migración de células mesenquimáticas desde el mesonefros a la gónada en el inicio del desarrollo testicular (Buehr *y col.*, 1993; Merchant-Larios *y col.*, 1993). Se ha propuesto que dicha migración es necesaria para la diferenciación de las células de Sertoli, la formación de los cordones testiculares y el desarrollo del sistema vascular específico de la gónada XY (Brennan *y col.*, 2002; Tilmann y Capel, 1999).

Para que el desarrollo testicular se produzca de forma adecuada, es necesario que la migración ocurra desde el mesonefros hacia la gónada y, por tanto, que las células mesonéfricas atraviesen la frontera entre ambos órganos (Buehr *y col.*, 1993; Merchant-Larios *y col.*, 1993). A pesar de que los estudios de inmunofluorescencia con marcadores de células migratorias proporcionan imágenes estáticas que no evidencian el sentido del movimiento, hay varios indicios que sugieren firmemente que la gónada XY de *T. occidentalis* es colonizada por células procedentes del mesonefros. El primero de ellos es la presencia de grupos de células migratorias que se extienden a ambos lados de la frontera entre la gónada y el mesonefros, algo que se observa claramente en el estudio de MT1–MMP. Aunque este dato indica únicamente que hay migración a través de la frontera, existen argumentos adicionales que ponen de manifiesto que dicha migración ocurre en el sentido mesonefros–gónada. Tal como se ha comentado anteriormente, eventos como la formación de los cordones testiculares y el desarrollo de la vasculatura, requieren que la migración se produzca precisamente en este sentido. El hecho de que todos estos procesos ocurran en los testículos de topo, sugiere que el sentido de la migración debe ser el mismo en esta especie. Además, la migración de células mesonéfricas se produce como consecuencia de una cascada de señales quimiotácticas procedentes de la gónada (Ross y Capel, 2005). Un componente importante de dicha cascada es el receptor α del factor PDGF (PDGFR α), que se expresa en las células intersticiales de la gónada masculina (Brennan *y col.*, 2003; Ricci *y col.*, 2004). En el presente trabajo se detecta expresión de PDGFR α en las células intersticiales de la gónada XY de *T. occidentalis*, no observándose células positivas para este receptor en la región mesonéfrica adyacente a la gónada. Este hecho demuestra que la señal quimiotáctica parte de la gónada y, por tanto, es a este órgano hacia donde se dirigirán las células migratorias.

El momento exacto en el que la gónada de topo comienza a ser colonizada por células mesonéfricas no es fácil de establecer. Estudios morfológicos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran una ausencia casi total de células mesenquimáticas en el interior de la gónada s4 (Barrionuevo *y col.*, 2004b), indicando que en ese estadio aún no ha ocurrido migración celular

5.2. Control genético del desarrollo testicular en machos

desde el mesonefros. Los resultados de inmunofluorescencia obtenidos en este trabajo para MT1–MMP apoyan este hecho y sugieren que el comienzo de la migración desde el mesonefros a la gónada debe estar comprendido entre s5a y s5b, puesto que es en esos estadios cuando se observan proyecciones celulares que atraviesan la frontera entre ambos órganos. Además, en s5a se produce un pico de expresión de *PDGFR α* , algo coherente con la implicación de este receptor en la inducción de la migración por parte de la gónada. Este aumento en los niveles de *PDGFR α* se observa en ratón en el periodo equivalente, es decir, un día antes de la formación de los cordones testiculares (Brennan *y col.*, 2003; Ricci *y col.*, 2004).

Si la colonización de la gónada XY de topo por parte de células mesenquimáticas realmente no se inicia hasta s5a–s5b, como así parecen apuntar todos los indicios, la diferenciación de las células de Sertoli sería independiente de la migración desde el mesonefros a la gónada en esta especie, puesto que se produciría con dos días de antelación. Este hecho contrasta radicalmente con los estudios de Tilmann y Capel (1999), en los que se establece una relación de causa–efecto entre esta migración y la aparición del fenotipo Sertoli.

La formación de la túnica albugínea implica migración de células corticales en el testículo.

En el estadio s5c se detecta un cese brusco de la migración celular en la región medular del testículo de topo, aunque el movimiento celular persiste en la corteza. Este hecho probablemente esté asociado con el proceso de diferenciación celular que conduce a la formación de la túnica albugínea a partir de las células corticales, que se inicia precisamente en este estadio (Barrionuevo *y col.*, 2004b).

Las células germinales XY de topo se comportan de forma similar a las del resto de mamíferos estudiados.

El desarrollo de las células germinales de los machos de topo no presenta diferencias significativas con el de otras especies de mamíferos. Nuestros resultados muestran que las PGCs masculinas de *T. occidentalis* son rápidamente dispuestas en el interior de los cordones testiculares (estadio s5b), proliferan intensamente alrededor del nacimiento y migran a la periferia de dichos cordones durante los primeros estadios post–natales (s9 y s10).

No obstante, el hecho de que los topos tengan reproducción estacional (Mathews, 1935; Jiménez *y col.*, 1990a), les confiere ciertas peculiaridades. En la península ibérica, la época fértil de estos animales corresponde con el invierno, mientras que en el verano son infértiles. En primavera y otoño, sus gónadas se inactivan y activan, respectivamente, mediante complejos procesos que conllevan importantes cambios en el sistema reproductivo de ambos sexos

5. Discusión

(Jiménez *y col.*, 1996a). Los testículos de los machos fértiles están formados por túbulos seminíferos muy gruesos en los que los espermatoцитos quedan dispuestos en la periferia de los mismos, tal como revelan los resultados de los marcadores moleculares meióticos SYCP3 y γ H2AX. El estudio de este último marcador nos ha permitido, además, identificar diferentes etapas de la meiosis en estos machos. Las células que muestran núcleos positivos para γ H2AX con una distribución homogénea de esta proteína, corresponden a espermatogonias intermedias y de tipo B, o bien a espermatoцитos en pre-leptotene; sin embargo, aquellas en las que se observan focos intensos de proteína son células en paquitene, en donde sólo la vesícula sexual (formada por los cromosomas sexuales X e Y condensados) aparece inmuno-reactiva. Durante la época no reproductiva, los túbulos seminíferos reducen su tamaño considerablemente y las células germinales, que han detenido la espermatogénesis, vuelven a situarse en las zonas profundas de dichos túbulos.

5.3. Caracterización y desarrollo del tejido ovárico de *T. occidentalis*

El ovoteste de las hembras adultas de topo es un órgano bilateral compuesto por una amplia región de tejido testicular disgenésico y otra, de menor tamaño, de tejido ovárico (Jiménez *y col.*, 1988, 1993). El hecho de que la porción ovárica del ovoteste sea completamente funcional y se origine a partir de la corteza gonadal (Barrionuevo *y col.*, 2004b), hace suponer que el desarrollo de la región cortical de la gónada XX de *Talpa* debe seguir un patrón de desarrollo similar al del ovario del resto de mamíferos. Aunque este razonamiento no es del todo incorrecto, la diferenciación del tejido ovárico de *T. occidentalis* muestra ciertas singularidades que se detallarán más adelante.

Para realizar un análisis preciso de este tejido gonadal, es necesario considerar tres aspectos fundamentales: el control genético de su desarrollo inicial, la distribución de las PGCs y el momento exacto en el que comienza la meiosis femenina.

5.3.1. Control genético del desarrollo de la corteza gonadal en hembras

En ratón, la primera evidencia morfológica del desarrollo ovárico es la entrada en meiosis de las PGCs a los 13.5 dpc. No obstante, aunque la gónada femenina permanece en un estado indiferenciado hasta ese momento, se sabe que durante el periodo en el que ocurre la determinación sexual existe un estrecho control genético, en el que se favorece la expresión de genes de la ruta femenina y se inhiben los genes de la ruta masculina, entre los que se incluyen los marcadores sertolianos *SOX9* y *AMH* (Brennan y Capel, 2004).

5.3. Caracterización y desarrollo del tejido ovárico

Como era de esperar, la región cortical de la gónada XX de topo no muestra expresión de dichos marcadores.

Las células somáticas corticales de la gónada XX de topo expresan SF1, DAX1 y DMRT1 con un perfil similar al del ovario de ratón.

Puesto que el tejido ovárico de *Talpa* es estructuralmente similar al de ratón (Barrionuevo *y col.*, 2004b), cabe esperar que los perfiles de expresión génica durante el desarrollo ovárico sean también similares en ambas especies. Esto es lo que ocurre con respecto a *SF1*. En ratón, este gen interviene tanto en la formación de la cresta genital como en la diferenciación del testículo, siendo inhibido en la gónada femenina a los 12.5 dpc (Hatano *y col.*, 1994; Ikeda *y col.*, 1994; Shen *y col.*, 1994). En las hembras de *T. occidentalis*, se detecta una expresión intensa de *SF1* en la corteza del primordio gonadal (estadio s4) y, en concordancia con lo que ocurre en ratón, esta expresión cortical va disminuyendo paulatinamente en los siguientes estadios.

Se ha demostrado que la expresión de *Sf1* está ligada a la de *Dax1* en varios órganos de ratón (Ikeda *y col.*, 1996), lo que sugiere que la función de ambos genes podría estar relacionada. Algunos estudios indican que las proteínas Dax1 y Sf1 actúan conjuntamente en la diferenciación de las células somáticas de la gónada masculina (Park *y col.*, 2005). Aunque el papel de DAX1 en el desarrollo testicular está muy aceptado actualmente (Bouma *y col.*, 2005; Meeks *y col.*, 2003a,b; Park *y col.*, 2005; Yu *y col.*, 1998), durante mucho tiempo se pensó que DAX1 era un gen anti-testículo necesario para evitar la determinación sexual masculina en hembras, debido a que las duplicaciones de este locus provocan reversión sexual en pacientes XY (Bardoni *y col.*, 1994; Jiménez *y col.*, 1996b; Swain *y col.*, 1998). Todas estas observaciones hacen pensar que DAX1 puede actuar inhibiendo o activando la diferenciación gonadal masculina, en función del nivel de expresión que presente (Ludbrook y Harley, 2004). Durante el desarrollo ovárico de ratón, *Dax1* se expresa en el primordio gonadal poco después de que lo haga *Sf1*, pero esta expresión muestra un aumento considerable entre 12.5 y 14.5 dpc, después de lo cual disminuye (Ikeda *y col.*, 2001). Nuestros resultados en la región cortical de las gónadas XX de *T. occidentalis* son coherentes con estos datos de ratón. En los estadios s4 y s5a, se detecta una expresión baja de DAX1 en la corteza del primordio gonadal, mientras que en s5b esta expresión aumenta significativamente. En s5c, los niveles vuelven a descender en la corteza gonadal de las hembras de topo.

La expresión de *DMRT1* en las células somáticas corticales durante las primeras etapas del desarrollo gonadal femenino de *T. occidentalis* también es similar a la observada en hembras de ratón. En ambos casos, este gen se expresa en las células somáticas del primordio gonadal XX y, durante el periodo de determinación sexual, su expresión disminuye hasta desaparecer (Raymond *y col.*, 1999a, 2000).

5. Discusión

Excepcionalmente, las PGCs muestran una expresión sostenida de DMRT1, DAX1 y WNT4 en las hembras de topo.

Las PGCs femeninas de *T. occidentalis* presentan ciertas diferencias con respecto a las de ratón en cuanto a su perfil de expresión génica. Según los resultados de este trabajo, y otros obtenidos en nuestro laboratorio (no mostrados en esta memoria), las células germinales pre-meióticas de las hembras de topo expresan *DAX1* y *WNT4*, hecho que no se ha descrito en ratón. Esta expresión conjunta en la línea germinal se detecta desde el inicio de la gonadogénesis hasta la aparición de los oocitos. Teniendo en cuenta que tanto *WNT4* como *DAX1* son necesarios para el desarrollo ovárico y que la expresión de ambos genes parece estar relacionada (Jordan *y col.*, 2001; Mizusaki *y col.*, 2003), podría sugerirse que las señales que inducen el comienzo de la oogénesis provienen de las propias PGCs en *T. occidentalis*.

Otro de los genes que expresan las células germinales pre-meióticas XX de topo es *DMRT1*. Esta circunstancia es aún más peculiar porque dicho gen está específicamente involucrado en el desarrollo testicular. Aunque se ha comprobado que las PGCs masculinas de ratón expresan *Dmrt1*, no existen datos sobre su expresión en las PGCs femeninas y su posible actuación en el desarrollo ovárico (De Grandi *y col.*, 2000; Raymond *y col.*, 1999a, 2000). Por tanto, los conocimientos actuales sobre el papel de *DMRT1* en mamíferos no explican el significado de su patrón de expresión en las hembras de *T. occidentalis*. No obstante, estudios recientes en testículos de humano han puesto de manifiesto la existencia de tres isoformas diferentes de *DMRT1* generadas por maduración alternativa (Cheng *y col.*, 2006), lo que indica que esta proteína podría desempeñar diversas funciones en la gonadogénesis que aún se desconozcan. Alguna de estas isoformas podría estar implicada en la función de las PGCs durante el desarrollo ovárico de topo.

La expresión de WNT4 en la corteza gonadal de las hembras de topo no coincide con lo observado en ratón.

Los estudios llevados a cabo en ratón indican que *WNT4* tiene un papel central en el desarrollo ovárico (Vainio *y col.*, 1999). En concreto, se ha demostrado que es necesario para inhibir la migración de células mesonéfricas y la diferenciación de las células de Leydig en la gónada XX (Jeays-Ward *y col.*, 2003; Jordan *y col.*, 2003; Yao *y col.*, 2004).

Considerando la gónada XX de *T. occidentalis* en su conjunto, el patrón de expresión de *WNT4* no resultaría llamativo, puesto que es similar al que se ha descrito en ratón (Vainio *y col.*, 1999). Este gen se expresa, fundamentalmente, en la región medular del primordio gonadal indiferenciado de los topos de ambos sexos. Como en el ratón, *WNT4* aumenta su expresión en la gónada XX, mientras que se inhibe en la gónada XY, en el momento de la diferenciación sexual (estadio s5b). Este perfil de expresión es contradictorio

5.3. Caracterización y desarrollo del tejido ovárico

con el desarrollo gonadal ulterior observado en las hembras de topo, dado que en dicho desarrollo se producen eventos típicos de la organogénesis testicular (migración celular y diferenciación de células de Leydig) que deberían ser inhibidos por este gen, tal como se discutirá más adelante. No obstante, por algún motivo, estos eventos afectan exclusivamente a la región medular.

Por lo que se refiere a la corteza gonadal, que da lugar a tejido ovárico funcional en las hembras de topo, la escasa expresión de *WNT4* en esta región durante los primeros estadios de la gonadogénesis también resulta llamativa, dada su función en el desarrollo ovárico. Pero si tenemos en cuenta que la oogénesis, que es el evento más importante de la diferenciación ovárica, ocurre muy tardíamente en estos animales, concretamente en el estadio post-natal s10 (Barrionuevo *y col.*, 2004b y resultados del presente trabajo), y que en los estadios previos a ese momento sí existe una alta expresión cortical de *WNT4* (datos no mostrados), la baja expresión detectada entre s4 y s5c tiene menos relevancia. No obstante, sí resulta significativo el hecho de que son precisamente las PGCs las que expresan *WNT4* en la corteza de la gónada XX de topo, puesto que se sabe que este gen es necesario para preservar la viabilidad de las células germinales premeióticas femeninas de ratón (Yao *y col.*, 2004).

5.3.2. Distribución de las PGCs en la gónada XX

Las PGCs presentan una distribución asimétrica en las hembras de *T. occidentalis*, circunstancia que podría estar relacionada con la regionalización de la gónada XX. Barrionuevo *y col.* (2004b) ya describieron mediante análisis morfológicos que, en las hembras de topo, las células germinales se localizan en la corteza gonadal, aunque no estudiaron si este hecho es una causa o una consecuencia de la regionalización.

Los resultados del presente trabajo, obtenidos mediante la utilización de marcadores moleculares, confirman claramente las observaciones de Barrionuevo *y col.* (2004b) sobre la distribución asimétrica de la línea germinal en las hembras de *Talpa* y evidencian que ninguna PGC está presente en la región medular a partir del estadio s5b. En los estadios anteriores (s4 y s5a), se detectan PGCs en la médula de la gónada XX, pero en s5b éstas desaparecen completamente. El hecho de que se detecten PGCs medulares en los estadios más tempranos, no apoya la idea de una hipotética colonización selectiva del primordio gonadal por parte de las células germinales. Aunque nuestros resultados no nos permiten dilucidar el motivo por el cual las PGCs desaparecen de la médula, una posible explicación podría ser la apoptosis. En este sentido, se sabe que este proceso de muerte celular es una causa común de pérdida sustancial de PGCs medulares en el ovario de mamíferos (Reynaud y Driancourt, 2000). Además, la existencia de una regionalización funcional de la gónada XX, anterior a la distribución asimétrica de las células germinales, sugiere

5. Discusión

que la asimetría es una consecuencia y no la causa de la regionalización que muestran los ovotestes de *Talpa*.

5.3.3. Comienzo de la meiosis femenina

Una de las características más significativas del desarrollo ovárico de *T. occidentalis* es que la meiosis femenina se inicia después del nacimiento (Barrionuevo *y col.*, 2004b). Esta circunstancia es bastante infrecuente entre los mamíferos euterios puesto que, salvo en el conejo (Peters *y col.*, 1965), en todas las especies estudiadas hasta ahora la oogénesis se inicia en estadios prenatales (Mossman y Duke, 1973). En este trabajo se pone de manifiesto que las células germinales localizadas en la región más cercana a la médula entran en meiosis antes que las que están situadas en las zonas más externas de la corteza, algo que ocurre sobre el estadio s10 (crías de unos 5 dpp).

Las células somáticas de la médula gonadal de las hembras de topo podrían expresar CYP26B1.

Los mecanismos que controlan el inicio de la meiosis tanto en machos como en hembras han sido motivo de estudio desde hace mucho tiempo. Algunos autores han propuesto que las células germinales XX entran en meiosis de forma autónoma, de acuerdo con un reloj biológico (McLaren, 1984; McLaren y Southee, 1997; Zamboni y Upadhyay, 1983). No obstante, estudios más recientes apoyan la hipótesis de Byskov y Saxen (1976) sobre una «sustancia inductora de la meiosis» que está presente en el ovario y es la responsable de inducir la oogénesis. Actualmente, se sabe que el ácido retinoico (RA), producido por el mesonefros y otros tejidos embrionarios, activa al gen *STRA8* en las células germinales, un evento que conlleva el comienzo de la meiosis femenina. En los embriones XY, la meiosis está retardada por la acción del enzima CYP26B1, que degrada el RA y está ausente en los ovarios (Bowles *y col.*, 2006; Koubova *y col.*, 2006). Si suponemos que éste es también el sistema que opera en topos, el hecho de que la meiosis esté retardada igualmente en las hembras de esta especie podría tener dos posibles causas: un retraso en la producción de RA por parte del mesonefros XX, o bien una expresión ectópica del gen *CYP26B1* en la gónada femenina. Esta última hipótesis está en concordancia con el desarrollo tan peculiar que presenta la médula gonadal de las hembras de topo. Según esta idea, las células somáticas medulares podrían ser las responsables de producir CYP26B1, como sucede en el testículo de los machos. Si este fuera el caso, sería interesante comprobar si los niveles de este enzima declinan sobre el estadio s10, momento en el cual comienza la meiosis en *T. occidentalis*. Esta posibilidad está siendo investigada actualmente en nuestro laboratorio.

5.4. Desarrollo del tejido testicular XX

La meiosis femenina se inicia siguiendo una oleada que comienza en las zonas más profundas de la corteza y se extiende hacia la periferia gonadal.

El hecho de que las células germinales localizadas en la corteza profunda de la gónada de *Talpa* inicien la meiosis antes que las que se encuentran en las zonas más superficiales, podría estar relacionado con las consideraciones anteriores. Desde hace bastante tiempo se sabe que los oocitos situados en la corteza interna comienzan antes el crecimiento (Peters, 1969). A este patrón de crecimiento se le denominó «corteza–médula» (Byskov *y col.*, 1997). La demostración de que, como en el topo, las células germinales profundas eran también las primeras en comenzar la meiosis, hizo que Henderson y Edwards (1968) propusiesen la «hipótesis de la línea de producción», según la cual las células germinales que primero entran en meiosis son también las que crecen primero. Esta hipótesis ha sido motivo de extensas investigaciones durante muchos años (Tease y Fisher, 1989).

El patrón de inicio de la meiosis desde el interior hacia el exterior de la gónada podría ser una consecuencia de la difusión del «factor inductor de la meiosis» (RA), el cual avanzaría desde el mesonefros hacia la periferia gonadal, pasando primero por la médula, después por la corteza interna y, finalmente, por la corteza externa del ovario. En el ratón, esta oleada no se produce a través del eje interior–exterior de la gónada, sino a través del eje anterior–posterior, que es perpendicular al primero (Menke *y col.*, 2003; Yao *y col.*, 2003). Sería interesante comprobar si en esta especie el RA difunde también en esta dirección en el momento en el que comienza la meiosis.

5.4. Desarrollo del tejido testicular XX

No cabe duda de que el aspecto más llamativo de la gonadogénesis de *T. occidentalis* es la formación de una porción de tejido testicular en las gónadas de las hembras. En este trabajo hemos estudiado algunos de los aspectos más relevantes de este tejido, como la ausencia de las PGCs, la expresión de genes implicados en la determinación y diferenciación sexual, la migración celular y la caracterización de las células de Leydig XX, sobre los que se discute a continuación.

5.4.1. Ausencia de células germinales durante el desarrollo testicular del ovoteste

Estudios morfológicos previos sugerían que el tejido testicular XX de topo se desarrolla en ausencia de células germinales (Barrionuevo *y col.*, 2004b; Jiménez *y col.*, 1993). En este trabajo, aportamos datos adicionales que prueban este hecho, basados en el estudio de marcadores moleculares de las células germinales tanto pre–meióticas como meióticas.

5. Discusión

*El retraso de la meiosis femenina podría favorecer el desarrollo testicular XX en *T. occidentalis*.*

Mediante el cultivo de agregados de células germinales XX y células somáticas XY de gónadas de ratón en diferentes estadios de desarrollo, Yao *y col.* (2003) han demostrado que los oocitos son capaces de inhibir la migración celular desde el mesonefros y la formación de los cordones testiculares durante el periodo de la determinación sexual, algo que no ocurre en el caso de las células germinales pre-meióticas. Esto implica que las gónadas XX son capaces de seguir un patrón de desarrollo masculino durante una ventana temporal que termina cuando las células germinales inician la meiosis. Estos y otros autores (Burgoyne y Palmer, 1993) han sugerido que los oocitos producen señales que antagonizan las primeras etapas de la organogénesis testicular, de forma que, una vez que la meiosis ya ha comenzado, la ruta de diferenciación ovárica es firmemente encauzada. Según esto, el retraso de la meiosis femenina en el topo podría permitir el desarrollo testicular XX, en el que se producen eventos típicos de la testiculogénesis como la migración de células mesoneféricas y la formación de cordones medulares (Barrionuevo *y col.*, 2004b), debido a que no están presentes los factores inhibitorios producidos por los oocitos durante las primeras etapas del desarrollo gonadal.

La ausencia de células germinales en la región medular es un hecho común en el ovario de los mamíferos.

Mossman y Duke (1973) realizaron una amplia revisión sobre el ovario de un gran número de taxones de mamíferos. Este estudio puso de manifiesto que las células germinales XX se concentran en la región cortical del ovario, que generalmente alcanza un mayor desarrollo, mientras que la región medular, que tiende a involucionar, carece de PGCs. Por tanto, nuestros resultados en *T. occidentalis* muestran que el patrón de distribución de las PGCs femeninas no se aparta significativamente del observado en otras especies de mamíferos.

5.4.2. Expresión génica durante el desarrollo testicular en hembras

Hasta hace poco tiempo se pensaba que la organogénesis testicular era necesariamente un proceso inducido que requería la presencia de determinados factores para que fuese posible. En este sentido, se aceptó que las células de la línea Sertoli eran las responsables de poner en marcha toda la maquinaria de diferenciación masculina mediante la expresión de genes implicados en la testiculogénesis como *SRY*, *SOX9* y *AMH* (Swain y Lovell-Badge, 1999). El desarrollo ovárico sería, por tanto, el camino que seguiría el primordio gonadal «por defecto», cuando no fuesen activados los genes de la ruta masculina.

5.4. Desarrollo del tejido testicular XX

El desarrollo testicular de las hembras de topo se produce en ausencia de células de Sertoli.

Analizando preparaciones de complejos sinaptinémicos de espermatozoides, Jiménez *y col.* (1990b,c) no encontraron evidencias de translocaciones de fragmentos del cromosoma Y al cromosoma X de *T. occidentalis*. Posteriormente, se demostró que las hembras de esta especie carecen del gen *SRY* (Jiménez *y col.*, 1993). Por tanto, si se tiene en cuenta la hipótesis de un desarrollo testicular inducido en su totalidad, la formación del tejido testicular de las hembras de topo debería estar causada por la expresión ectópica de alguno de los genes de la ruta masculina, situado al principio de la cascada génica y «aguas abajo» de *SRY*. Supuestamente, dicha expresión tendría que producirse en las células somáticas medulares de la gónada XX, las cuales se diferenciarían como células de Sertoli y serían las responsables de orquestar la organización del tejido testicular del ovoteste. Pero, sorprendentemente, nuestros resultados muestran que el comportamiento de estas células somáticas es radicalmente opuesto a lo que cabría esperar según el razonamiento anterior. En estas células se detecta una expresión débil de *DMRT1* que es inhibida cuando se forman los cordones testiculares y, lo que es más llamativo, no se expresan los marcadores sertolianos típicos *SOX9* y *AMH*. Paradójicamente, este patrón de expresión génica es similar al que muestran las células somáticas de la gónada XX de ratón (Ross y Capel, 2005), salvo por el hecho de que en las hembras de topo los niveles de SF1 no descienden durante el periodo de la determinación sexual. Estos resultados nos llevan a la inesperada conclusión de que la porción de tejido testicular del ovoteste de *T. occidentalis* se desarrolla en ausencia total de células de Sertoli.

Estudios recientes están poniendo en duda la idea de que el desarrollo ovárico es un proceso pasivo que ocurre cuando no se activa la diferenciación testicular. Actualmente, se sabe que existen genes necesarios para inhibir el desarrollo testicular en hembras, como *WNT4* y *FST* (Jeays-Ward *y col.*, 2004; Jordan *y col.*, 2003; Yao *y col.*, 2004). La eliminación de estos genes del genoma de ratones XX provoca que se produzcan eventos clave del desarrollo testicular como la migración celular desde el mesonefros, la formación de una vasculatura típica de testículo y la diferenciación de células de Leydig. Además, Parma *y col.* (2006) han identificado un gen, *RSPO1* (*R-spondin 1*), que produce reversión sexual XX completa en ausencia de *SRY* cuando está delecionado en humanos, es decir, individuos XX con fenotipo masculino. Nuestros resultados son coherentes con estos trabajos e indican que algunos de los procesos fundamentales que ocurren en las primeras etapas de la organogénesis testicular se inician de forma constitutiva.

La expresión de WNT4 y DAX1 apoya el carácter no sertoliano de las células somáticas medulares de la gónada XX.

Otro hecho que refuerza la idea de que las células epiteliales de la médula

5. Discusión

gonadal XX de topo no son células de Sertoli, es que en ellas no se produce una inhibición de *WNT4* durante los estadios en los que ocurre la determinación del sexo en esta especie (s4–s5b). Los niveles de *WNT4* son elevados en todo el periodo analizado tal como ocurre en el ratón, en donde la expresión de este gen aumenta en la gónada femenina a partir de los 11.5 dpc y se mantiene alta durante todo el desarrollo ovárico (Vainio *y col.*, 1999). Este dato no es sorprendente si tenemos en cuenta que *Sox9* y *Wnt4* actúan como señales antagonicas (Barrionuevo *y col.*, 2006; Kim *y col.*, 2006) y no se ha detectado presencia de *SOX9* durante la gonadogénesis de las hembras de *T. occidentalis*.

De igual forma, estas mismas células medulares de las hembras de topo también expresan *DAX1*. Este gen presenta un pico de actividad en el estadio s5b, coincidiendo con la aparición de los cordones, después de lo cual comienza a disminuir. En los ratones hembra se observa el mismo patrón. En este caso, *Dax1* también aumenta su expresión en el mismo momento (12.5 dpc) y disminuye dos días después (14.5 dpc) (Ikeda *y col.*, 2001). La co-localización de *WNT4* y *DAX1* observada en la gónada XX de topo es también coherente con el supuesto papel del primero como activador del segundo (Jordan *y col.*, 2001; Mizusaki *y col.*, 2003).

En su conjunto, los resultados del estudio de expresión génica llevado a cabo en este trabajo sugieren, por tanto, que las células somáticas de tipo epitelial presentes en la región medular XX, no adoptan un perfil sertoliano durante la determinación sexual del topo, sino que, en líneas generales, mantienen el esperado para este tipo celular en una gónada femenina.

5.4.3. Migración celular en la gónada XX

El estudio de la migración celular en las hembras de *T. occidentalis* ha aportado datos fundamentales que nos han ayudado a comprender mejor el desarrollo gonadal tan particular de esta especie, así como el proceso de la gonadogénesis de mamíferos en general.

¿Es posible un desarrollo testicular en ausencia de SRY?

Una premisa importante para aceptar que las hembras de topo desarrollan una porción de tejido testicular, es que determinados eventos típicos de la organogénesis testicular observados en la gónada XX (migración desde el mesonefros, formación del sistema vascular y diferenciación de células de Leydig) deben poder ser inducidos en ausencia de *SRY*, puesto que estas hembras carecen de dicho gen (Jiménez *y col.*, 1993). En este sentido, los estudios de Yao *y col.* (2004) indican que la migración de las células endoteliales y la consecuente formación del sistema vascular es inhibida por genes de la ruta femenina como *WNT4* y *FST* en el ovario de ratón. Estos procesos ocurren en gónadas de ratones hembra (carentes de *SRY*) si en ellos se elimina cualquiera de ambos genes. Además, ratones XY con sobreexpresión

5.4. Desarrollo del tejido testicular XX

de *Wnt4*, presentan deficiencias en la línea esteroideogénica (Jeays-Ward *y col.*, 2004; Jordan *y col.*, 2003). Asimismo, se ha comprobado que la migración de células mesonéfricas induce la formación de cordones testiculares en gónadas XX cultivadas entre una gónada XY y un mesonefros XY ó XX (Tilmann y Capel, 1999). Por tanto, la activación de los genes de la ruta masculina no es necesaria para que se produzcan los procesos testiculares observados en las hembras de topo.

En las hembras de topo falla la inhibición de la migración de células mesonéfricas a la gónada.

El hecho de que se produzcan eventos característicos del desarrollo testicular en hembras que carecen de determinados genes de la ruta femenina, sugiere que tanto la migración de células mesonéfricas como los procesos ulteriores que ésta conlleva ocurren de manera constitutiva. Esta hipótesis entra en conflicto directo con las ideas que se han venido aceptando hasta ahora, que contemplaban la organogénesis testicular como un proceso inducible, puesto que la tendencia primaria de la cresta genital parecía ser la de originar un ovario.

Los datos obtenidos en el presente trabajo sobre la migración celular en *T. occidentalis* apoyan claramente las consideraciones anteriores. Los resultados sobre MT1–MMP muestran que existe migración celular en el interior de la gónada XX. El estudio de este marcador de células migratorias no nos permite saber si hay colonización de la gónada por parte de células mesonéfricas, pero sí indica que el movimiento celular es mucho mayor en la médula que en la corteza a partir del momento en el que la regionalización de la gónada XX es evidente (estadio s5a).

El perfil de expresión de *PDGFR α* , sin embargo, sí aporta datos mucho más esclarecedores. Este gen codifica un receptor al que se unen diferentes factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF). Los ligandos PDGF son producidos por células de naturaleza epitelial (las células de Sertoli en el testículo) y el receptor que reconocen está localizado en células mesenquimáticas del intersticio (Hoch y Soriano, 2003). Se ha comprobado que *PDGFR α* es fundamental en la transmisión de la señal que induce la migración desde el mesonefros hacia la gónada XY. En ratón, *PDGFR α* es inhibido en las hembras durante el periodo de la determinación sexual, de forma que tanto el ligando como el receptor sólo están presentes en la gónada masculina cuando ocurre la migración de células mesonéfricas (Brennan *y col.*, 2003). En la gónada XX de topo, se detecta una expresión leve de *PDGFR α* en el primordio gonadal (estadio s4), tal como se ha descrito en ratón, pero dicha expresión, lejos de ser inhibida, aumenta progresivamente en la región medular hasta s5b. Curiosamente, en s5c este gen aún continúa expresándose en la gónada XX, aunque con menor intensidad, mientras que en la gónada XY su expresión ya ha cesado. Estos datos, junto con el hecho de que, como en

5. Discusión

machos, se observen grupos de células migratorias positivas para MT1–MMP atravesando la frontera entre la gónada y el mesonefros, indican claramente que en las hembras de topo también ocurre migración de células mesonéfricas al interior de la gónada. Esta migración finaliza un día después de lo que lo hace en machos.

Todas estas observaciones nos llevan a pensar que en los individuos XX de *T. occidentalis* debe ocurrir un fallo en la inhibición de la migración celular específica de testículo, causado, probablemente, por una pérdida de función de alguno de los genes de la ruta femenina que controlan este proceso en las hembras. Como ya se ha comentado en varias ocasiones, uno de estos genes es *WNT4*, el cual parece ser fundamental en la activación de *FST*, localizado «aguas abajo», que sería el responsable directo de inhibir la migración (Yao y col., 2004). Si se tiene en cuenta que las células medulares de la gónada XX de topo muestran una alta expresión de *WNT4* durante la ventana temporal en la que se determina el sexo, en principio caben dos posibles explicaciones sobre este hecho. Una de ellas sería que *WNT4* ha perdido su capacidad de inhibir la migración celular, bien de forma directa o bien porque no consiga activar a *FST*. La otra posibilidad sería que la propia proteína *FST* es la que, por algún motivo, no puede llevar a cabo su función inhibitoria de la migración de células mesonéfricas. En este sentido, es indispensable un estudio del patrón de expresión de *FST* en el topo, que está siendo llevado a cabo actualmente en nuestro laboratorio.

Considerando que, como así parece ser, la migración desde el mesonefros hacia la gónada está inducida de manera constitutiva, el fallo en la inhibición de este evento podría ser la causa del proceso de masculinización que sufren las hembras de *T. occidentalis*.

5.4.4. Caracterización y origen de la población de células de Leydig XX

Hasta hace poco se pensaba que las células de Sertoli eran imprescindibles para la diferenciación de las células intersticiales del testículo (Merchant-Larios y Taketo, 1991). Estudios más recientes sugieren que es más bien la ausencia de determinados factores, como *WNT4* y *FST*, lo que favorece esta situación (Jeays-Ward y col., 2003; Jordan y col., 2003; Yao y col., 2004).

Las células de Leydig son las encargadas de llevar a cabo la síntesis de hormonas esteroideas masculinizantes durante el desarrollo de los individuos XY. Existen dos poblaciones diferentes de este tipo celular en el testículo. Una de ellas es la línea fetal, cuya función es la producción de testosterona durante la embriogénesis. En el ratón, las células de Leydig fetales están presentes desde los 12.5 dpc hasta poco después del nacimiento. La otra población, conocida como línea adulta, reemplaza a la anterior durante la pubertad y es la responsable del comienzo de la espermatogénesis y la aparición de

5.4. Desarrollo del tejido testicular XX

los caracteres sexuales secundarios en los machos (Habert *y col.*, 2001). Se ha propuesto que las células de Leydig fetales del testículo y las células esteroidogénicas del riñón provienen de una misma población precursora, que está presente en el mesonefros antes de la formación de la cresta genital (Hatano *y col.*, 1996). El origen de las células de Leydig adultas sigue siendo una incógnita.

La porción testicular del ovoteste contiene una extensa población de células de Leydig XX

Estudios morfológicos y hormonales previos han sugerido la existencia de una amplia población de células de Leydig en los ovotestes de las hembras de *T. occidentalis*, responsable del gran tamaño que presenta la porción testicular (Barrionuevo *y col.*, 2004b; Jiménez *y col.*, 1993; Zurita *y col.*, 2003). En el presente trabajo, se ha llevado a cabo una caracterización molecular de dicha población mediante la detección del factor esteroidogénico 1 (SF1) y el citocromo P450scc, que interviene en la síntesis de testosterona (Chen *y col.*, 1995; Lala *y col.*, 1992; Rice *y col.*, 1991). Nuestros resultados confirman que las células intersticiales del tejido testicular de las hembras de topo son, efectivamente, células de Leydig, puesto que expresan estos dos marcadores.

La ausencia de células germinales meióticas en la médula del ovoteste podría ser la causa de la diferenciación de las células de Leydig XX.

En *T. occidentalis*, la diferenciación de las células de Leydig XX no se produce hasta después del nacimiento. Esto hace que las hembras de topo sufran un proceso de masculinización parcial, llegando incluso a formar epidídimos rudimentarios, debido a una considerable producción de testosterona a partir del estadio s9 (Barrionuevo *y col.*, 2004b; Zurita *y col.*, 2003). El hecho de que estas células no se diferencien durante el desarrollo embrionario es fundamental para la supervivencia de las especies de *Talpa* y, como se comentará más adelante, podría estar controlado por la proteína WNT4. Estudios con ratones han mostrado que *Wnt4* es necesario para inhibir la diferenciación de las células de Leydig fetales (Jeays-Ward *y col.*, 2003; Jordan *y col.*, 2003). Al parecer, las células germinales podrían tomar el relevo de las células somáticas en el bloqueo del desarrollo testicular cuando entran en meiosis (Yao *y col.*, 2003). En este sentido, la ausencia de células germinales en la médula gonadal de las hembras de *Talpa*, podría ser la causa de que las células de Leydig XX se diferencien una vez que ha cesado la expresión de *WNT4*. No obstante, es necesario un estudio más profundo para determinar el origen de esta población esteroidogénica.

5. Discusión

5.5. Formación del conducto de Müller en embriones de *T. occidentalis*

Los conductos embrionarios de Wolff y de Müller, localizados en el mesonefros, son los precursores de los componentes del tracto reproductivo en machos y hembras, respectivamente. Su desarrollo dependerá del sexo gonadal, de forma que si éste es masculino, la síntesis de testosterona por parte de las células de Leydig hará que se desarrollen los conductos de Wolff, dando lugar a los epidídimos, los conductos deferentes y las vesículas seminales (Haqq y Donahoe, 1998). A su vez, la hormona anti-Mülleriana, producida por las células de Sertoli, será la responsable de inhibir el desarrollo de los conductos de Müller (Munsterberg y Lovell-Badge, 1991). Por el contrario, la ausencia de ambas hormonas en las hembras desembocará en la degeneración de los conductos de Wolff y el desarrollo de los de Müller, que formarán el útero, los oviductos y la vagina superior (Mossman y Duke, 1973). Tanto el desarrollo de los conductos de Müller como la inhibición de los de Wolff ocurren de forma normal en individuos castrados, lo que indica que los ovarios no están implicados en dichos eventos (Austin y Edwards, 1981; Jost, 1947).

En *T. occidentalis*, los conductos de Wolff ya se observan en el estadio s4, mientras que los de Müller no aparecen hasta s5c. En los machos, éstos últimos desaparecen rápidamente, sugiriendo una acción muy intensa de AMH en esta especie. En hembras, el desarrollo de los conductos de Müller es similar al resto de mamíferos (Zurita *y col.*, 2003).

Las proteínas WNT4, DAX1 y PDGFR α parecen tener alguna función en la formación del conducto de Müller en el topo.

Aunque la regulación hormonal de estos procesos está ampliamente estudiada, no son muchos los conocimientos actuales sobre su control genético. En este sentido, se ha comprobado que WNT4 está involucrado directamente en la formación de los conductos de Müller, aunque se desconoce su actuación concreta (Vainio *y col.*, 1999). El estudio de expresión génica realizado en este trabajo ha puesto de manifiesto que algunos de los genes implicados en el desarrollo gonadal deben tener algún papel en la formación y/o degeneración del conducto de Müller. Desde el estadio s4, se detecta expresión en ambos sexos de WNT4, DAX1 y PDGFR α en la región del mesonefros en donde se originará el conducto de Müller. Además, en esta zona se observa una intensa actividad migratoria, según los resultados de MT1-MMP. Probablemente, el receptor PDGFR α esté relacionado con este hecho.

SOX9 podría intervenir en la degeneración del conducto de Müller.

En el estadio s5c, *SOX9* comienza a expresarse en el conducto de Müller recién formado de ambos sexos, aunque en los machos los niveles de proteína

5.6. Origen de la reversión sexual de *Talpa*

son significativamente mayores y se detecta no sólo en las células epiteliales del conducto, sino también en varias capas celulares concéntricas a él. Este claro dimorfismo sexual nos induce a pensar que la proteína SOX9 debe tener alguna función en la transducción de señales que conlleva la degeneración de los conductos de Müller en los individuos XY. En este sentido, *SOX9* podría activarse de forma constitutiva tanto en machos como en hembras y la acción de AMH sobre esta región mesonéfrica sería la responsable de que los niveles de SOX9 aumentasen en machos.

Este trabajo aporta, por primera vez, evidencias que sugieren que DAX1 y PDGFR α podrían estar implicados en la formación del conducto de Müller en ambos sexos, y que SOX9 tendría un papel en el proceso de regresión de dicho conducto en los machos.

5.6. Origen de la reversión sexual de *Talpa*

La existencia de tejido testicular XX permite utilizar el término de reversión sexual en *T. occidentalis*, a pesar de que los individuos afectados son hembras funcionales. Por el mismo motivo, es apropiado denominar «ovoteste» a la gónada XX de estos animales. No obstante, dado el carácter disgenésico de este tejido testicular, la reversión sexual que presentan las hembras de topo no es completa, sino sólo parcial.

En la gónada XX, las células homólogas de las células de Sertoli XY mantienen cierto grado de indiferenciación durante la determinación del sexo.

En el primordio gonadal indiferenciado, existen células somáticas de tipo epitelial con un mismo origen ontogenético en ambos sexos, que darán lugar a las células de Sertoli en machos y a las células foliculares en hembras (Albrecht y Eicher, 2001). Se ha demostrado que estos precursores proceden, a su vez, del epitelio celómico (Karl y Capel, 1998). Es precisamente en este tipo celular en donde ocurre el evento clave del desarrollo testicular: la expresión del gen *SRY*. Esto provoca que, en la gónada XY, se inicie una cascada génica en la que se activan genes de la ruta masculina como *SOX9*, *SF1*, *DMRT1* y *AMH*, y se inhiben otros de la ruta femenina como *WNT4* y *FST*. En la gónada XX, al no haber ninguna copia activa de *SRY*, ocurre justo lo contrario, es decir, se favorece la expresión de los genes de la ruta femenina y se reprimen los genes de la ruta masculina (Capel, 2000).

En los machos de *T. occidentalis*, estas células bipotenciales se diferencian de forma similar a las de otros mamíferos, salvo por el hecho de que lo hacen mucho antes de que se formen los cordones testiculares. En las hembras de topo, sin embargo, es necesario distinguir entre aquellas células epiteliales que permanecen en la corteza y las que pasan a formar parte de la médula. Las primeras presentan unas características genéticas similares a las de las

5. Discusión

células pre-foliculares del tejido ovárico de otras especies, no observándose diferencias dignas de resaltar. Por el contrario, las células localizadas en la región medular tienen un perfil de expresión génica bastante peculiar. Como ya se ha comentado, estas células no pueden ser consideradas células de la línea Sertoli a pesar de que se encuentran en un ambiente testicular, puesto que en ellas no se detecta expresión de los marcadores sertolianos *SOX9* y *AMH*. Por otra parte, si tenemos en cuenta que durante el periodo en el que ocurre la determinación sexual estas células expresan *WNT4* e inhiben genes de la ruta masculina como *DMRT1*, podría pensarse que su naturaleza es de tipo pre-folicular. No obstante, existen algunos indicios indirectos que sugieren que su patrón de expresión tampoco es el típico de la línea folicular. Uno de estos indicios es que no reprimen la expresión de *SF1* sobre el estadio s5b, algo que si se observa en las células homólogas de la región cortical. Este gen está involucrado en la formación de la cresta genital y en el desarrollo testicular, de forma que su expresión aumenta en machos y disminuye en hembras de ratón a los 12.5 dpc (Hatano *y col.*, 1994; Ikeda *y col.*, 1994; Shen *y col.*, 1994). En la región medular de la gónada XX de topo, los niveles de SF1 no descienden en el estadio equivalente, aunque tampoco parecen aumentar. En este sentido, podría pensarse que estas células medulares mantienen un estatus indiferenciado en relación con la expresión de *SF1*. Además, el hecho de que se detecte el receptor PDGFR α en las células intersticiales de la gónada XX y que, consecuentemente, se produzca migración de células mesonéfricas en la hembra, da pie a especular sobre la posibilidad de que estas células epiteliales también expresen el ligando PDGF. La demostración de este hecho, sobre el cual se está investigando actualmente en nuestro laboratorio, apoyaría la idea de que las células epiteliales de la médula del ovoteste nunca llegan a adquirir un perfil característico de células pre-foliculares. El desajuste génico responsable de esta situación les llevaría incluso a mostrar algunas características propias de las células pre-Sertoli, como la expresión del ligando de PDGFR α .

Una pérdida de función de WNT4 o de otro gen bajo su control explicaría la existencia de migración en las hembras

El hecho de que las células epiteliales medulares de la gónada XX de *T. occidentalis* no se comporten como células pre-foliculares, podría ser debido a que alguno de los genes de la ruta femenina no ejerce su papel adecuadamente. Actualmente, se sabe que WNT4 está implicado en la inhibición de la migración desde el mesonefros a la gónada, bien de forma directa (Jeays-Ward *y col.*, 2003) o bien como activador de otros genes como *FST* (Yao *y col.*, 2004). En las hembras de topo, dichas células medulares muestran un patrón de expresión normal de *WNT4*, pero es indudable que la migración de células mesonéfricas no está inhibida. Esta circunstancia nos ha llevado a pensar en la posibilidad de que este gen, o algún otro situado «aguas abajo», haya perdido esta función en *Talpa*. La consecuencia de esta situación anómala sería, por

5.6. Origen de la reversión sexual de *Talpa*

tanto, la colonización del primordio gonadal XX por parte de precursores celulares del tejido testicular con la consecuente masculinización del mismo, tal como ocurre en los ratones XX homocigotos para un alelo nulo de *WNT4* (Yao y col., 2004).

WNT4 parece mantener sus funciones de inhibir la diferenciación de las células de Leydig y favorecer la supervivencia de las PGCs corticales.

Otra de las funciones conocidas de WNT4 es la de impedir la diferenciación de las células de Leydig (Jeays-Ward y col., 2003; Jordan y col., 2003). En los machos de topo, este tipo celular se diferencia en el estadio s5c, mientras que en las hembras lo hace sobre el s9 (Barrionuevo y col., 2004b; Zurita y col., 2003). Los resultados de este trabajo y otros no publicados obtenidos en nuestro laboratorio, indican que *WNT4* no ha perdido esta capacidad en *T. occidentalis*, puesto que este gen se inhibe en ambos sexos justo en el momento en el que comienzan a diferenciarse las células de Leydig. El hecho de que *WNT4* conserve este papel inhibitorio y se mantenga activo en hembras hasta después del nacimiento, es fundamental desde un punto de vista evolutivo. En caso contrario, las células de Leydig XX comenzarían a producir testosterona en las etapas tempranas de la gonadogénesis, produciéndose un proceso de masculinización de los embriones XX que no sería viable. Por tanto, la capacidad de WNT4 para inhibir la línea esteroidogénica masculina debe haber sido conservada en *Talpa*. Asimismo, el hecho de que las células germinales premeióticas XX de las hembras de topo expresen *WNT4* hasta el comienzo de la meiosis (datos no mostrados), también nos hace pensar que este gen mantiene el papel que se le ha asignado en el mantenimiento de las PGCs femeninas en ratón (Yao y col., 2004).

En resumen, de los tres papeles propuestos para el gen *WNT4* durante la determinación sexual, es decir, favorecer la supervivencia de las PGCs femeninas, inhibir la diferenciación de las células de Leydig y bloquear la migración de células mesonéfricas al interior de la gónada, sólo los dos primeros parecen ser mantenidos en *T. occidentalis*. WNT4 podría ejercer estas funciones disponiendo de dominios funcionales diferentes o bien interviniendo en varias rutas reguladoras alternativas, o incluso mediante una combinación de ambas posibilidades. En el primer caso, la situación observada en *Talpa* podría deberse a una mutación en el dominio de WNT4 implicado en la inhibición de la migración. En el segundo, podría estar afectado alguno de los genes bajo el control de WNT4 en la correspondiente ruta reguladora.

5. Discusión

5.7. El patrón de desarrollo gonadal en mamíferos: un enfoque evolutivo

La embriología de la gónada ha sido motivo de estudio desde mediados del siglo XIX, cuando Waldeyer (1870) estableció la «teoría clásica» del desarrollo gonadal. Desde entonces, se han publicado cientos de trabajos embriológicos en los que se describen diferentes tipos de gonadogénesis en muchos taxones de vertebrados, incluyendo especies de mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces. Witschi (1951) propuso que la gónada indiferenciada es un órgano regionalizado, en el que el tejido ovárico se desarrolla a partir de la corteza y el tejido testicular a partir de la médula. Alternativamente, Gillman (1948) sugirió que, por el contrario, el primordio gonadal está formado por células bipotenciales que pueden seguir dos vías diferentes de diferenciación, dando lugar a un ovario o a un testículo en función de la ruta elegida. La demostración de que las células de Sertoli y las foliculares tienen un origen común (Albrecht y Eicher, 2001) apoyó esta última hipótesis.

Actualmente, el modelo de Gillman está ampliamente aceptado, no considerándose generalmente las ideas de Witschi. Esta circunstancia se debe a que la mayoría de los estudios realizados en los últimos años utilizan al ratón como modelo experimental y, probablemente, los roedores murinos no son representativos de los mamíferos en general. En este sentido, las hembras de muchas especies de mamíferos tienen una «glándula intersticial» en sus gónadas, que se considera presente cuando el tejido intersticial del ovario (carente de folículos) alcanza un crecimiento considerable. En ciertas ocasiones, esta glándula tiene un origen medular y puede mostrar ciertas características similares a las de un tejido testicular, tal como indicaron los estudios realizados a principios del siglo XX (Popoff, 1911). Fraenkel (1905) describió que 21 especies de mamíferos de 45 analizadas presentaban glándula intersticial (entre ellas el gato y el murciélago), mientras que las otras 24 carecían de ella (como ratón, cerdo y humano). Estudios más recientes han puesto de manifiesto que dicha glándula presenta una gran variabilidad en cuanto a su origen. En concreto, se han definido siete tipos diferentes, tres de los cuales se desarrollan a partir de la región medular (Mossman y Duke, 1973).

En el presente trabajo, así como en otros anteriores (Barrionuevo *y col.*, 2004b; Jiménez *y col.*, 1993), se aportan pruebas irrefutables sobre la existencia de una porción de tejido testicular en las hembras de *T. occidentalis*. Esta región se desarrolla a partir de la médula de la gónada indiferenciada XX, algo que apoya el modelo de Witschi. No obstante, la regionalización podría no ser incompatible con el modelo de Gillman, puesto que la corteza y la médula podrían tener el mismo origen ontogenético y, por tanto, desarrollarse a partir de precursores bipotenciales.

Todas estas observaciones indican que la organogénesis del ovario es un

5.7. El patrón de desarrollo gonadal en mamíferos

proceso mucho más heterogéneo que la del testículo. Un claro ejemplo de ello es la propia familia Talpidae. En este grupo se han descrito ovotestes en varias especies del género *Talpa* (Jiménez y col., 1988; Sanchez y col., 1996b), mientras que las hembras adultas de otras especies de topos norteamericanos, como *Scapanus latimanus* y *Scapanus orarius*, presentan ovarios similares a los de ratón (Rubenstein y col., 2003).

Las ratillas topo del género *Ellobius* son, quizás, el caso más representativo de la variabilidad existente en los procesos que controlan la gonadogénesis. El gen *SRY* es el factor determinante del sexo exclusivamente en mamíferos (Gubbay y col., 1990; Sinclair y col., 1990). Este hecho ya resulta llamativo por sí solo, puesto que el testículo de este grupo de animales es similar al de otros taxones como aves, reptiles o anfibios, que carecen de *SRY*. No obstante, la particularidad que presentan algunas especies de *Ellobius* es de una singularidad excepcional. Estos roedores excavadores han sido estudiados ampliamente desde un punto de vista citogenético, habiéndose descrito especies con la típica dotación de cromosomas sexuales de los mamíferos XX/XY (*E. fuscocapillus*), pero también con dotaciones sorprendentes como X0/X0 (*E. lutescens*, $2n=17$). En este último caso, se plantea un problema de viabilidad importante, puesto que tanto los cigotos $2n=16,00$ como $2n=18,XX$ resultan letales. Otras especies de ratillas topo (*E. tancrei*, *E. talpinus* y *E. alaicus*) presentan dos cromosomas X en ambos sexos, oscilando entre $2n=32,XX$ y $2n=54,XX$, debido al efecto de translocaciones robertsonianas. El cariotipo de estos animales plantea muchos interrogantes sobre el mecanismo de determinación sexual que opera en ellos, puesto que se ha demostrado mediante técnicas moleculares que el gen *SRY* no está presente en las especies que carecen de cromosoma Y (Vogel y col., 1998).

Todos estos datos indican que los procesos que intervienen en el desarrollo gonadal presentan una gran plasticidad, pudiendo haber divergido y convergido varias veces a lo largo de la evolución de los mamíferos. Además, el hecho de que excepciones tan llamativas como las de *Ellobius* o *Talpa* puedan afectar a especies concretas de un género pero no a otras, demuestra que cambios muy drásticos en el control genético de procesos del desarrollo tan complejos como la diferenciación sexual, pueden producirse de forma muy rápida y conservando, al menos suficientemente, la viabilidad y eficacia biológica de los organismos implicados.

Finalmente, cabría preguntarse cual es el motivo de que se haya mantenido un órgano tan peculiar como el ovoteste a lo largo de la evolución de determinadas especies de Tálpidos. En principio, tal como ha sido ampliamente detallado en esta memoria, el desarrollo del tejido testicular XX no impide la correcta diferenciación de una porción ovárica con oocitos maduros, por lo que los individuos XX de topo pueden actuar como hembras funcionales, no representando un obstáculo para la supervivencia de las poblaciones afectadas. No cabe duda de que durante la evolución de este fenómeno han debido

5. Discusión

ser necesarios numerosos reajustes en el patrón de desarrollo y en los mecanismos genéticos que lo controlan. Este proceso de co-adaptación genética ha evitado situaciones insostenibles como la presencia de testosterona durante el desarrollo embrionario femenino, que habría originado una masculinización somática incompatible con la fertilidad. Así, el hecho de que las células de Leydig XX no se diferencien hasta después del nacimiento, ha permitido que la testosterona no aparezca en las hembras antes de que el tracto reproductor femenino esté casi totalmente desarrollado. No obstante, los altos niveles de testosterona sérica de las hembras adultas provocan en ellas cierto grado de virilización que se manifiesta en rasgos peculiares, tales como la presencia de un clítoris peniforme, lo que recuerda en cierta medida la situación descrita en las hienas (Glickman *y col.*, 1987), y la desaparición del orificio vaginal durante la estación no reproductiva (Barrionuevo *y col.*, 2004b; Mathews, 1935). Zurita *y col.* (2003) analizaron los niveles séricos de testosterona en *T. occidentalis*, constatando que, durante la época infértil, algunas hembras llegaban a mostrar valores mayores que los machos. Por el contrario, en la estación reproductiva, la situación se invierte y en las hembras disminuyen drásticamente los niveles de testosterona sérica, mientras que aumentan considerablemente en los machos.

Aunque la relación causa-efecto no está claramente establecida, existen multitud de estudios que relacionan la testosterona con la agresividad y la territorialidad (Wingfield, 2005). En este sentido, podría especularse sobre la posibilidad de que la presencia de dicha hormona en las hembras de topo haya favorecido su comportamiento territorial. El ciclo anual de variación de los niveles de testosterona sérica descrito en las hembras de topo, es coherente con el contexto social con el se enfrentan éstas en las distintas estaciones del año, si se admite que esta hormona tiene una relación directa con el comportamiento territorial. De esta manera, durante la época fértil, las hembras deberían disminuir su agresividad permitiendo así la intrusión de los machos en su territorio y la consiguiente cópula; sin embargo, en la época infértil, la única necesidad de las hembras sería la de defender su territorio para garantizarse unos recursos vitales. La territorialidad es un hecho fuera de lo común en las hembras de los mamíferos, por lo que esta característica de los topos incrementa la larga lista de curiosidades que muestran estos fascinantes animales subterráneos.

6. Conclusiones

1. Los perfiles de expresión génica observados en el desarrollo testicular temprano de los machos de *T. occidentalis*, evidencian que los eventos morfológicos que tienen lugar durante este proceso están más conservados que sus mecanismos de control genético, incluso dentro del grupo de los mamíferos.
2. La diferenciación de las células de Sertoli dos días antes de la formación de los cordones en los testículos de *Talpa*, sugiere que ambos eventos no tienen una causa común, a diferencia de lo actualmente aceptado según los estudios realizados en ratón.
3. Durante los primeros estadios del desarrollo gonadal del topo se produce una compartimentación funcional previa a la aparición de signos morfológicos de diferenciación.
4. La expresión de *WNT4* durante el largo el periodo premeiótico en las células germinales femeninas de *Talpa*, es coherente con la función que se le ha asignado a este gen en el mantenimiento de la viabilidad de dichas células germinales.
5. La distribución asimétrica de las células germinales en la gónada XX, que implica su ausencia en la región medular, junto con el retraso en el inicio de la meiosis hasta estadios post-natales, podría favorecer que en la médula ocurran procesos propios del desarrollo testicular.
6. El hecho de que no se detecten marcadores sertolianos típicos, como SOX9 y AMH, en las células medulares de tipo epitelial de la gónada XX de *T. occidentalis*, demuestra que, en contra de la teoría convencional al respecto, es posible un desarrollo testicular en ausencia de células de Sertoli.
7. El desarrollo testicular XX de *Talpa* se inicia por un fallo en la inhibición de la migración de células mesonéfricas a la gónada. Esta situación podría deberse a una pérdida de función de *WNT4* o de algún gen bajo su control.

6. Conclusiones

8. El gen *WNT4* de *T. occidentalis*, no obstante, parece haber conservado su papel inhibitor en la diferenciación de las células de Leydig, puesto que éstas no se diferencian en ambos sexos hasta que dicho gen cesa su expresión.
9. El presente trabajo proporciona las primeras evidencias que implican a *DAX1* y *PDGFR α* en la formación del conducto de Müller de los mamíferos, y a *SOX9* en su posterior regresión en los machos.
10. La existencia de tejido testicular en las hembras de topo podría haber favorecido el comportamiento territorial observado en éstas, un hecho bastante excepcional entre los mamíferos.

Conclusions

1. The gene expression patterns observed at the early testicular development of males in *T. occidentalis*, show that the morphological events taking place during this process are more evolutionarily conserved than their mechanisms of genetic control inside the mammalian taxa.
2. The fact that Sertoli cells differentiate two days before testicular cords formation in *Talpa*, suggests that these two events do not share a common origin, contrarily to what it is currently accepted from data obtained in mice.
3. During the first stages of the mole gonad development a functional regionalization occurs before any morphological sign of differentiation appear.
4. The expression of *WNT4* during the long pre-meiotic period of the female germ cells in the mole, is consistent with the role in the maintenance of germ cells viability proposed for this gene.
5. The asymmetric distribution of the female germ cells, which leads to its absence in the medullary region, together with the delay of meiosis onset to postnatal stages, might favour that some testicular features appear in the medulla of the XX gonad.
6. The lack of typical Sertoli cell molecular markers, such as SOX9 and AMH, in the epithelial cells of the medulla in *T. occidentalis* XX gonad, evidences that, contrary to the current opinion in this respect, a testicular development is possible in the absence of Sertoli cells.
7. Testicular tissue development in female moles is due to a failure in the inhibition of mesonephric cell migration into the gonad. This could be the consequence of a loss-of-function mutation in either *WNT4* or any other gene under its control.
8. The *WNT4* gene of *T. occidentalis*, however, seems to have conserved its inhibitory action on Leydig cell differentiation, since these cells do differentiate in both sexes just after this gene is down-regulated.

6. Conclusiones

9. This work provides the first evidence suggesting that *DAX1* and *PDGFR α* are involved in the formation of the mullerian duct in mammals, and that *SOX9* may participate in its later regression in males.
10. The existence of testicular tissue in the gonads of female moles might have favoured the territorial behaviour observed in these animals, which is a very exceptional feature among mammalian females.

Bibliografía

- Achermann J, Ito M, Ito M, Hindmarsh P, Jameson J (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22(2): 125–6.
- Achermann J, Ito M, Silverman B, Habiby R, Pang S, Rosler A, Jameson J (2001) Missense mutations cluster within the carboxyl-terminal region of DAX-1 and impair transcriptional repression. *J Clin Endocrinol Metab* 86(7): 3171–5.
- Achermann J, Ozisik G, Ito M, Orun U, Harmanci K, Gurakan B, Jameson J (2002) Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 87(4): 1829–33.
- Ackerman K, Herron B, Vargas S, Huang H, Tevosian S, Kochilas L, Rao C, Pober B, Babiuk R, Epstein J, Greer J, Beier D (2005) Fog2 is required for normal diaphragm and lung development in mice and humans. *PLoS Genet* 1(1): 58–65.
- Adams I, McLaren A (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development* 129(5): 1155–64.
- Akiyama H, Chaboissier M, Martin J, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16(21): 2813–28.
- Akiyama H, Chaboissier M, Behringer R, Rowitch D, Schedl A, Epstein J, de Crombrughe B (2004) Essential role of Sox9 in the pathway that controls formation of cardiac valves and septa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6502–7.
- Al-Attar L, Noel K, Dutertre M, Belville C, Forest M, Burgoyne P, Josso N, Rey R (1997) Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Mullerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest* 100(6): 1335–43.
- Albrecht K, Eicher E (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol* 240(1): 92–107.
- Alonso C, Maxton-Kuechenmeister J, Akam M (2001) Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr Biol* 11(18): 1473–8.
- Altincicek B, Tenbaum S, Dressel U, Thormeyer D, Renkawitz R, Baniahmad A (2000) Interaction of the corepressor Alien with DAX-1 is abrogated by mutations of DAX-1 involved in adrenal hypoplasia congenita. *J Biol Chem* 275(11): 7662–7.

Bibliografia

- Anttonen M, Ketola I, Parviainen H, Pusa A, Heikinheimo M (2003) FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol Reprod* 68(4): 1333–40.
- Aoyama S, Shibata K, Tokunaga S, Takase M, Matsui K, Nakamura M (2003) Expression of Dmrt1 protein in developing and in sex-reversed gonads of amphibians. *Cytogenet Genome Res* 101(3-4): 295–301.
- Ara T, Nakamura Y, Egawa T, Sugiyama T, Abe K, Kishimoto T, Matsui Y, Nagasawa T (2003) Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(9): 5319–23.
- Arango N, Lovell-Badge R, Behringer R (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell* 99(4): 409–19.
- Argentaro A, Sim H, Kelly S, Preiss S, Clayton A, Jans D, Harley V (2003) A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem* 278(36): 33839–47.
- Armstrong J, Pritchard-Jones K, Bickmore W, Hastie N, Bard J (1993) The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 40(1-2): 85–97.
- Austin C, Edwards R, *Mechanism of sex differentiation in animals and man*. (Academic Press Inc, London, 1981).
- Bae D, Schaefer M, Partan B, Muglia L (1996) Characterization of the mouse DAX-1 gene reveals evolutionary conservation of a unique amino-terminal motif and widespread expression in mouse tissue. *Endocrinology* 137(9): 3921–7.
- Baird P, Groves N, Haber D, Housman D, Cowell J (1992) Identification of mutations in the WT1 gene in tumours from patients with the WAGR syndrome. *Oncogene* 7(11): 2141–9.
- Barboux S, Niaudet P, Gubler M, Grunfeld J, Jaubert F, Kuttann F, Fekete C, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M, McElreavey K (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet* 17(4): 467–70.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley K, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe E, Fraccaro M, et al (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 7(4): 497–501.
- Barnhart K, Mellon P (1994) The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol* 8(7): 878–85.
- Barrionuevo F, Zurita F, Burgos M, Jimenez R (2004a) Developmental stages and growth rate of the mole *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia). *J Mammal* 85(1): 120–25.
- Barrionuevo F, Zurita F, Burgos M, Jimenez R (2004b) Testis-like development of gonads in female moles. New insights on mammalian gonad organogenesis. *Dev Biol* 268(1): 39–52.
- Barrionuevo F, Bagheri-Fam S, Klattig J, Kist R, Taketo M, Englert C, Scherer G (2006) Homozygous inactivation of *Sox9* causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod* 74(1): 195–201.

- Barrionuevo F J (2001) *Expresión génica durante el desarrollo gonadal de Talpa occidentalis*. tesis doctoral, Universidad de Granada.
- Behringer R, Cate R, Froelick G, Palmiter R, Brinster R (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature* 345(6271): 167–70.
- Bell D, Leung K, Wheatley S, Ng L, Zhou S, Ling K, Sham M, Koopman P, Tam P, Cheah K (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16(2): 174–8.
- Bennett C, Docherty Z, Robb S, Ramani P, Hawkins J, Grant D (1993) Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet* 30(6): 518–20.
- Bernard P, Tang P, Liu S, Dewing P, Harley V, Vilain E (2003) Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet* 12(14): 1755–65.
- Berta P, Hawkins J, Sinclair A, Taylor A, Griffiths B, Goodfellow P, Fellous M (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348(6300): 448–50.
- 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. *Hum Mol Genet* 15(3): 417–31.
- Bewley C, Gronenborn A, Clore G (1998) Minor groove-binding architectural proteins: structure, function, and DNA recognition. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27: 105–31.
- Bi W, Huang W, Whitworth D, Deng J, Zhang Z, Behringer R, de Crombrughe B (2001) Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(12): 6698–703.
- Bialer M, Penchaszadeh V, Kahn E, Libes R, Krigsman G, Lesser M (1987) Female external genitalia and mullerian duct derivatives in a 46,XY infant with the smith-lemli-Opitiz syndrome. *Am J Med Genet* 28(3): 723–31.
- Biason-Lauber A, Schoenle E (2000) Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet* 67(6): 1563–8.
- Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle E (2004) A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 351(8): 792–8.
- Bickmore W, Oghene K, Little M, Seawright A, van Heyningen V, Hastie N (1992) Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor wt1 gene transcript. *Science* 257(5067): 235–7.
- Birk O, Casiano D, Wassif C, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg J, Parker K, Porter F, Westphal H (2000) The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature* 403(6772): 909–13.
- Bishop C, Whitworth D, Qin Y, Agoulnik A, Agoulnik I, Harrison W, Behringer R, Overbeek P (2000) A transgenic insertion upstream of sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 26(4): 490–4.
- Bitgood M, McMahon A (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172(1): 126–38.

Bibliografia

- Bitgood M, Shen L, McMahon A (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6(3): 298–304.
- Bouma G, Albrecht K, Washburn L, Recknagel A, Churchill G, Eicher E (2005) Gonadal sex reversal in mutant Dax1 XY mice: a failure to upregulate Sox9 in pre-Sertoli cells. *Development* 132(13): 3045–54.
- Bowles J, Bullejos M, Koopman P (2000a) A subtractive gene expression screen suggests a role for vanin-1 in testis development in mice. *Genesis* 27(3): 124–35.
- Bowles J, Schepers G, Koopman P (2000b) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol* 227(2): 239–55.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson M, Rossant J, Hamada H, Koopman P (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312(5773): 596–600.
- Brennan J, Capel B (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5(7): 509–21.
- Brennan J, Karl J, Capel B (2002) Divergent vascular mechanisms downstream of Sry establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol* 244(2): 418–28.
- Brennan J, Tilmann C, Capel B (2003) Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev* 17(6): 800–10.
- Bridges C (1925) Sex in relation to chromosomes. *Am Nat* 59: 127–37.
- Brunner B, Hornung U, Shan Z, Nanda I, Kondo M, Zend-Ajusich E, Haaf T, Ropers H, Shima A, Schmid M, Kalscheuer V, Schartl M (2001) Genomic organization and expression of the doublesex-related gene cluster in vertebrates and detection of putative regulatory regions for DMRT1. *Genomics* 77(1-2): 8–17.
- Buehr M, Gu S, McLaren A (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development* 117(1): 273–81.
- Bullejos M, Koopman P (2001) Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. *Dev Dyn* 221(2): 201–5.
- Burgoyne P (1992) Y chromosome function in mammalian development. *Adv Dev Biol* 1: 1–29.
- Burgoyne P, Palmer S (1993) Cellular basis the sex determination and sex reversal. *Hillier SG (ed), Gonadal Development and Function. Raven Press Ltd, New York.* 17–29.
- Burgoyne P, Mahadevaiah S, Sutcliffe M, Palmer S (1992) Fertility in mice requires X-Y pairing and a Y-chromosomal "spermiogenesis" gene mapping to the long arm. *Cell* 71(3): 391–8.
- Burtis K, Baker B (1989) Drosophila doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell* 56(6): 997–1010.
- Byskov A, Saxen L (1976) Induction of meiosis in fetal mouse testis in vitro. *Dev Biol* 52(2): 193–200.
- Byskov A, Guoliang X, Andersen C (1997) The cortex-medulla oocyte growth pattern is organized during fetal life: an in-vitro study of the mouse ovary. *Mol Hum Reprod* 3(9): 795–800.

- Cabrera A, *Fauna ibérica. Mamíferos*. (Nac Cienc Nat. Madrid., 1914).
- Cadigan K, Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11(24): 3286–305.
- Call K, Glaser T, Ito C, Buckler A, Pelletier J, Haber D, Rose E, Kral A, Yeger H, Lewis W, et al (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60(3): 509–20.
- Camerino G, Parma P, Radi O, Valentini S (2006) Sex determination and sex reversal. *Curr Opin Genet Dev* 16(3): 289–92.
- Canning C, Lovell-Badge R (2002) Sry and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet* 18(3): 111–3.
- Canto P, Soderlund D, Reyes E, Mendez J (2004) Mutations in the desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 89(9): 4480–3.
- Canto P, Vilchis F, Soderlund D, Reyes E, Mendez J (2005) A heterozygous mutation in the desert hedgehog gene in patients with mixed gonadal dysgenesis. *Mol Hum Reprod* 11(11): 833–6.
- Cantor A, Orkin S (2001) Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* 11(5): 513–9.
- Capel B (2000) The battle of the sexes. *Mech Dev* 92(1): 89–103.
- Capel B, Swain A, Nicolis S, Hacker A, Walter M, Koopman P, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1993) Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. *Cell* 73(5): 1019–30.
- Capel B, Albrecht K, Washburn L, Eicher E (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on Sry. *Mech Dev* 84(1-2): 127–31.
- Caricasole A, Duarte A, Larsson S, Hastie N, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A (1996) RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7562–6.
- Cate R, Mattaliano R, Hession C, Tizard R, Farber N, Cheung A, Ninfa E, Frey A, Gash D, Chow E, et al (1986) Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45(5): 685–98.
- Chaboissier M, Kobayashi A, Vidal V, Lutzkendorf S, van de Kant H, Wegner M, de Rooij D, Behringer R, Schedl A (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131(9): 1891–901.
- Chai C, Chan W (2000) Developmental expression of a novel Ftz-F1 homologue, fl1b (NR5A4), in the zebrafish *Danio rerio*. *Mech Dev* 91(1-2): 421–6.
- Chandra H (1984) A model for mammalian male determination based on a passive Y chromosome. *Mol Gen Genet* 193(3): 384–8.
- Chandra H (1985) Sex determination: a hypothesis based on noncoding DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(4): 1165–9.
- Charpentier G, Magre S (1990) Masculinizing effect of testes on developing rat ovaries in organ culture. *Development* 110(3): 839–49.

Bibliografia

- Chen C, Guo I, Chung B (1995) Regulation of cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 in mouse testis Leydig cell line I-10. *DNA Cell Biol* 14(9): 803–10.
- Cheng H, Ying M, Tian Y, Guo Y, McElreavey K, Zhou R (2006) Transcriptional diversity of DMRT1 (dsx- and mab3-related transcription factor 1) in human testis. *Cell Res* 16(4): 389–93.
- Chiang E, Pai C, Wyatt M, Yan Y, Postlethwait J, Chung B (2001) Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol* 231(1): 149–63.
- Cideciyan D, Rodriguez M, Haun R, Abdenour G, Bruce J (1993) New findings in short rib syndrome. *Am J Med Genet* 46(3): 255–9.
- Clark A, Garland K, Russell L (2000) Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 63(6): 1825–38.
- Clepet C, Schafer A, Sinclair A, Palmer M, Lovell-Badge R, Goodfellow P (1993) The human SRY transcript. *Hum Mol Genet* 2(12): 2007–12.
- Cohen E, Mariol M, Wallace R, Weyers J, Kamberov Y, Pradel J, Wilder E (2002) DWnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during Drosophila ovarian morphogenesis. *Dev Cell* 2(4): 437–48.
- Cohen-Haguenaer O, Picard J, Mattei M, Serero S, Nguyen V, de Tand M, Guerrier D, Hors-Cayla M, Josso N, Frezal J (1987) Mapping of the gene for anti-mullerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 44(1): 2–6.
- Colvin J, Feldman B, Nadeau J, Goldfarb M, Ornitz D (1999) Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Dev Dyn* 216(1): 72–88.
- Colvin J, Green R, Schmahl J, Capel B, Ornitz D (2001a) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104(6): 875–89.
- Colvin J, White A, Pratt S, Ornitz D (2001b) Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development* 128(11): 2095–106.
- Correa R, Domenice S, Bingham N, Billerbeck A, Rainey W, Parker K, Mendonca B (2004) A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 89(4): 1767–72.
- Couse J, Hewitt S, Bunch D, Sar M, Walker V, Davis B, Korach K (1999) Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 286(5448): 2328–31.
- Crawford P, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J (1998) Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 18(5): 2949–56.
- Crews D (1993) The organizational concept and vertebrates without sex chromosomes. *Brain Behav Evol* 42(4-5): 202–14.
- Crews D (1994) Temperature, steroids and sex determination. *J Endocrinol* 142(1): 1–8.

Bibliografia

- Crispino J, Lodish M, Thurberg B, Litovsky S, Collins T, Molkentin J, Orkin S (2001) Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev* 15(7): 839–44.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi M, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27(2): 159–66.
- Cui S, Ross A, Stallings N, Parker K, Capel B, Quaggin S (2004) Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in *Pod1* knockout mice. *Development* 131(16): 4095–105.
- Dale T (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J* 329 (Pt 2): 209–23.
- De Falco T, Verney G, Jenkins A, McCaffery J, Russell S, Van Doren M (2003) Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the *Drosophila* embryonic gonad. *Dev Cell* 5(2): 205–16.
- De Grandi A, Calvari V, Bertini V, Bulfone A, Peverali G, Camerino G, Borsani G, Guioli S (2000) The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech Dev* 90(2): 323–6.
- De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck P, Scherer G, Poulat F, Berta P (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18(11): 6653–65.
- Deconinck A, Mead P, Tevosian S, Crispino J, Katz S, Zon L, Orkin S (2000) FOG acts as a repressor of red blood cell development in *Xenopus*. *Development* 127(10): 2031–40.
- Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, Tanghe W, Proesmans W (1967) [Association of an anatomic-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism]. *Arch Fr Pediatr* 24(7): 729–39.
- Desclozeaux M, Poulat F, de Santa Barbara P, Capony J, Turowski P, Jay P, Mejean C, Moniot B, Boizet B, Berta P (1998) Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem* 273(14): 7988–95.
- DiNapoli L, Batchvarov J, Capel B (2006) FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development* 133(8): 1519–27.
- Drash A, Sherman F, Hartmann W, Blizzard R (1970) A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* 76(4): 585–93.
- Drevet J, Skeiky Y, Iatrou K (1994) GATA-type zinc finger motif-containing sequences and chorion gene transcription factors of the silkworm *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 269(14): 10660–7.
- Eicher E, Washburn L (1986) Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu Rev Genet* 20: 327–60.
- Eicher E, Washburn L, Whitney 3rd J, Morrow K (1982) Mus poschiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science* 217(4559): 535–7.

Bibliografia

- Eicher E, Shown E, Washburn L (1995) Sex reversal in C57BL/6J-YPOS mice corrected by a Sry transgene. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350(1333): 263–8; discussion 268–9.
- Eicher E, Washburn L, Schork N, Lee B, Shown E, Xu X, Dredge R, Pringle M, Page D (1996) Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet* 14(2): 206–9.
- Elejalde B, Opitz J, de Elejalde M, Gilbert E, Abellera M, Meisner L, Lebel R, Hartigan J (1984) Tandem dup (1p) within the short arm of chromosome 1 in a child with ambiguous genitalia and multiple congenital anomalies. *Am J Med Genet* 17(4): 723–30.
- Ferrari S, Harley V, Pontiggia A, Goodfellow P, Lovell-Badge R, Bianchi M (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J* 11(12): 4497–506.
- Flejtner W, Fergestad J, Gorski J, Varvill T, Chandrasekharappa S (1998) A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *Am J Hum Genet* 63(3): 794–802.
- Fleming A, Wibbels T, Skipper J, Crews D (1999) Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol* 116(3): 336–46.
- Ford C, Jones K, Polani P, De Almeida J, Briggs J (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1(7075): 711–3.
- Forwood J, Harley V, Jans D (2001) The C-terminal nuclear localization signal of the sex-determining region Y (SRY) high mobility group domain mediates nuclear import through importin beta 1. *J Biol Chem* 276(49): 46575–82.
- Fossett N, Tevosian S, Gajewski K, Zhang Q, Orkin S, Schulz R (2001) The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7342–7.
- Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kowk G, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, et al (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372(6506): 525–30.
- Fox A, Liew C, Holmes M, Kowalski K, Mackay J, Crossley M (1999) Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J* 18(10): 2812–22.
- Fraenkel L (1905) Vergleichend-histologische untersuchungen ber das vorkomen drsiger formationen im interstitiellen eirstocksgewebe. *Archiv Fund Gynakol Bd* 75.
- Gao F, Maiti S, Alam N, Zhang Z, Deng J, Behringer R, Lecureuil C, Guillou F, Huff V (2006) The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(32): 11987–92.
- Gao S, Zhang T, Zhou X, Zhao Y, Li Q, Guo Y, Cheng H, Zhou R (2005) Molecular cloning, expression of Sox5 and its down-regulation of Dmrt1 transcription in zebrafish. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 304(5): 476–83.
- Garces A, Nishimune H, Philippe J, Pettmann B, deLapeyriere O (2000) FGF9: a motoneuron survival factor expressed by medial thoracic and sacral motoneurons. *J Neurosci Res* 60(1): 1–9.

Bibliografia

- Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B (2002) A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(17): 11199–204.
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve R, Orkin S, Bruns G (1990) Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343(6260): 774–8.
- Gessler M, Konig A, Bruns G (1992) The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* 12(4): 807–13.
- Gibbons R, Wilkie A, Weatherall D, Higgs D (1991) A newly defined X linked mental retardation syndrome associated with alpha thalassaemia. *J Med Genet* 28(11): 729–33.
- Giese K, Cox J, Grosschedl R (1992) The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell* 69(1): 185–95.
- Giese K, Pagel J, Grosschedl R (1994) Distinct DNA-binding properties of the high mobility group domain of murine and human SRY sex-determining factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8): 3368–72.
- Gillman J (1948) The development of the gonad in man, with a consideration of the role of fetal endocrines and the histogenesis of ovarian tumors. *Contributions to Embryology* 210: 83–131.
- Ginsburg M, Snow M, McLaren A (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110(2): 521–8.
- Giuli G, Shen W, Ingraham H (1997) The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development* 124(9): 1799–807.
- Glickman S, Frank L, Davidson J, Smith E, Siiteri P (1987) Androstenedione may organize or activate sex-reversed traits in female spotted hyenas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10): 3444–7.
- Gnessi L, Emidi A, Jannini E, Carosa E, Maroder M, Arizzi M, Ulisse S, Spera G (1995) Testicular development involves the spatiotemporal control of PDGFs and PDGF receptors gene expression and action. *J Cell Biol* 131(4): 1105–21.
- Gnessi L, Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Spera G, Wang C, Bondjers C, Karlsson L, Betsholtz C (2000) Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J Cell Biol* 149(5): 1019–26.
- Godfrey G, Crowcroft P, *The life of mole*. (Museum Press London, 1960).
- Grimmond S, Van Hateren N, Siggers P, Arkell R, Larder R, Soares M, de Fatima Bonaldo M, Smith L, Tymowska-Lalanne Z, Wells C, Greenfield A (2000) Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum Mol Genet* 9(10): 1553–60.
- Guan G, Kobayashi T, Nagahama Y (2000) Sexually dimorphic expression of two types of DM (Doublesex/Mab-3)-domain genes in a teleost fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Biochem Biophys Res Commun* 272(3): 662–6.

Bibliografia

- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1990) A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346(6281): 245–50.
- 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): 172–3.
- Giulioli S, Schmitt K, Critcher R, Bouzyk M, Spurr N, Ogata T, Hoo J, Pinsky L, Gimelli G, Pasztor L, Goodfellow P (1998) Molecular analysis of 9p deletions associated with XY sex reversal: refining the localization of a sex-determining gene to the tip of the chromosome. *Am J Hum Genet* 63(3): 905–8.
- Guo W, Lovell R, Zhang Y, Huang B, Burris T, Craigen W, McCabe E (1996) Ahch, the mouse homologue of DAX1: cloning, characterization and synteny with GyK, the glycerol kinase locus. *Gene* 178(1-2): 31–4.
- Guirates B, Amsterdam A, Tamura M, Yang S, Zhou J, Fang Z, Amin S, Sebastian S, Bulun S (2003) WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom gene expression in gonadal cells. *Mol Cell Endocrinol* 208(1-2): 61–75.
- Haber D, Sohn R, Buckler A, Pelletier J, Call K, Housman D (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(21): 9618–22.
- Habert R, Lejeune H, Saez J (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 179(1-2): 47–74.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 121(6): 1603–14.
- Hammes A, Guo J, Lutsch G, Leheste J, Landrock D, Ziegler U, Gubler M, Schedl A (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106(3): 319–29.
- Hanley N, Ball S, Clement-Jones M, Hagan D, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker K, Wilson D (1999) Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 87(1-2): 175–80.
- Hanley N, Hagan D, Clement-Jones M, Ball S, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson D (2000) SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91(1-2): 403–7.
- Haqq C, Donahoe P (1998) Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev* 78(1): 1–33.
- Haqq C, Lee M, Tizard R, Wusk M, DeMarinis J, Donahoe P, Cate R (1992) Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. *Genomics* 12(4): 665–9.
- Harley V, Jackson D, Hextall P, Hawkins J, Berkovitz G, Sockanathan S, Lovell-Badge R, Goodfellow P (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science* 255(5043): 453–6.
- Harley V, Lovell-Badge R, Goodfellow P (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res* 22(8): 1500–1.

Bibliografia

- Harley V, Lovell-Badge R, Goodfellow P, Hextall P (1996) The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett* 391(1-2): 24–8.
- Harley V, Layfield S, Mitchell C, Forwood J, John A, Briggs L, McDowall S, Jans D (2003) Defective importin beta recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7045–50.
- Hasegawa T, Fukami M, Sato N, Katsumata N, Sasaki G, Fukutani K, Morohashi K, Ogata T (2004) Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 89(12): 5930–5.
- Hatano O, Takayama K, Imai T, Waterman M, Takakusu A, Omura T, Morohashi K (1994) Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120(10): 2787–97.
- Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K (1996) Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells* 1(7): 663–71.
- Hawkins J (1993) Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mutat* 2(5): 347–50.
- Hawkins J, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow P (1992) Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88(4): 471–4.
- Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, Rahman N, Narita N, Huhtaniemi I, Tapanainen J, Wilson D (1997) Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 138(8): 3505–14.
- Henderson S, Edwards R (1968) Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218(5136): 22–8.
- Hirobe S, He W, Lee M, Donahoe P (1992) Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology* 131(2): 854–62.
- Hoch R, Soriano P (2003) Roles of PDGF in animal development. *Development* 130(20): 4769–84.
- von Hofsten J, Karlsson J, Jones I, Olsson P (2002) Expression and regulation of fushi tarazu factor-1 and steroidogenic genes during reproduction in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Biol Reprod* 67(4): 1297–304.
- Hollyday M, McMahon J, McMahon A (1995) Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev* 52(1): 9–25.
- Holmes M, Turner J, Fox A, Chisholm O, Crossley M, Chong B (1999) hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J Biol Chem* 274(33): 23491–8.
- Hoo J, Salafsky I, Lin C, Pinsky L (1989) Possible location of a recessive testis forming gene on 9p24. *Am J Hum Genet Suppl* 45: A78.
- Hossain A, Saunders G (2001) The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 276(20): 16817–23.

Bibliografia

- Houston C, Opitz J, Spranger J, Macpherson R, Reed M, Gilbert E, Herrmann J, Schinzel A (1983) The campomelic syndrome: review, report of 17 cases, and follow-up on the currently 17-year-old boy first reported by Maroteaux et al in 1971. *Am J Med Genet* 15(1): 3–28.
- Hsu H, Lin G, Chung B (2003) Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros: differential control by wt1 and fl1b. *Development* 130(10): 2107–16.
- Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb A, Bartley J (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 87(4): 349–53.
- Huang W, Cukerman E, Liew C (1995) Identification of a GATA motif in the cardiac alpha-myosin heavy-chain-encoding gene and isolation of a human GATA-4 cDNA. *Gene* 155(2): 219–23.
- Huang W, Heng H, Liew C (1996) Assignment of the human GATA4 gene to 8p23.1–p22 using fluorescence in situ hybridization analysis. *Cytogenet Cell Genet* 72(2-3): 217–8.
- Huggins G, Bacani C, Boltax J, Aikawa R, Leiden J (2001) Friend of GATA 2 physically interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-TF2 (COUP-TF2) and COUP-TF3 and represses COUP-TF2-dependent activation of the atrial natriuretic factor promoter. *J Biol Chem* 276(30): 28029–36.
- Huret J, Leonard C, Forestier B, Rethore M, Lejeune J (1988) Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *J Med Genet* 25(11): 741–9.
- Ikeda Y, Lala D, Luo X, Kim E, Moisan M, Parker K (1993) Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7(7): 852–60.
- Ikeda Y, Shen W, Ingraham H, Parker K (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 8(5): 654–62.
- Ikeda Y, Swain A, Weber T, Hentges K, Zanaria E, Lalli E, Tamai K, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker K (1996) Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 10(10): 1261–72.
- Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi K (2001) Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn* 220(4): 363–76.
- Ingraham H, Lala D, Ikeda Y, Luo X, Shen W, Nachtigal M, Abbud R, Nilson J, Parker K (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8(19): 2302–12.
- Ito E, Toki T, Ishihara H, Ohtani H, Gu L, Yokoyama M, Engel J, Yamamoto M (1993) Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 362(6419): 466–8.
- Ito M, Yu R, Jameson J (1997) DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 17(3): 1476–83.
- Ito M, Masuda A, Yumoto K, Otomo A, Takahashi Y, Takamatsu N, Kanda H, Yamashita S, Shiba T (1998) cDNA cloning of a new member of the FTZ-F1 subfamily from a rainbow trout. *Biochim Biophys Acta* 1395(3): 271–4.

Bibliografía

- Itoh N, Ornitz D (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20(11): 563–9.
- Jacobs P, Strong J (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183(4657): 302–3.
- Jager R, Anvret M, Hall K, Scherer G (1990) A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature* 348(6300): 452–4.
- Jantzen H, Admon A, Bell S, Tjian R (1990) Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344(6269): 830–6.
- Jaubert F, Vasiliu V, Patey-Mariaud de Serre N, Auber F, Jeanpierre C, Gubler M, Nihoul-Fekete C, Fellous M (2003) Gonad development in Drash and Frasier syndromes depends on WT1 mutations. *Arkh Patol* 65(2): 40–4.
- Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A (2003) Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development* 130(16): 3663–70.
- Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A (2004) Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol* 276(2): 431–40.
- Jeske Y, Bowles J, Greenfield A, Koopman P (1995) Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet* 10(4): 480–2.
- Jiménez R, Burgos M, Caballero L, Díaz de la Guardia R (1988) Sex reversal in a wild population of *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia). *Genet Res Cambridge* 52: 135–140.
- Jiménez R, Burgos M, Sanchez A, Diaz de la Guardia R (1990a) The reproductive cycle of *Talpa occidentalis* in the Southeastern Iberian Peninsula. *Act Ther* 35(1-2): 165–169.
- Jiménez R, Burgos M, Sanchez A, Diaz de la Guardia R (1990b) Synaptonemal complex analysis in *Talpa occidentalis* spermatocytes (Insectivora, Mammalia). II. Evolution of the X-chromosome self-pairing process. *Cytogenet Cell Genet* 54(1-2): 35–7.
- Jiménez R, Burgos M, Sanchez A, Diaz de la Guardia R (1990c) Synaptonemal complex analysis of spermatocytes of *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia): autosomal synapsis and substaging of zygonema and pachynema. *Cytogenet Cell Genet* 53(2-3): 97–102.
- Jiménez R, Burgos M, Sanchez A, Sinclair A, Alarcon F, Marin J, Ortega E, Diaz de la Guardia R (1993) Fertile females of the mole *Talpa occidentalis* are phenotypic intersexes with ovotestes. *Development* 118(4): 1303–11.
- Jiménez R, Alarcon F, Sanchez A, Burgos M, De La Guardia R (1996a) Ovotestis variability in young and adult females of the mole *Talpa occidentalis* (insectivora, mammalia). *J Exp Zool* 274(2): 130–7.
- Jiménez R, Sanchez A, Burgos M, Diaz de la Guardia R (1996b) Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet* 12(5): 164–6.
- Jiménez R, Barrionuevo F, Burgos M (2000) A procedure for preparing amniotic cells for sexing embryos. *Trends in Genetics on line. Technical Tips on line* (<http://research.bmn.com/tto>)T02062 .

Bibliografia

- Jordan B, Mohammed M, Ching S, Delot E, Chen X, Dewing P, Swain A, Rao P, Elejalde B, Vilain E (2001) Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 68(5): 1102–9.
- Jordan B, Shen J, Olaso R, Ingraham H, Vilain E (2003) Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10866–71.
- Jost A (1947) Recherches sur la differenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 36: 271–315.
- Jost A (1953) Problems of fetal endocrinology: the gonadal and the hypophyseal hormones. *Recent Prog Horm Res* 8: 379–418.
- Jost A, Perchellet J, Prepin J, Vigier B (1975) The prenatal development of bovine freemartins. In *Symposium on Intersexuality* (ed R. Reinborn). Berlin, Springer-Verlag 392–406.
- Karl J, Capel B (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol* 203(2): 323–33.
- Karlsson L, Bondjers C, Betsholtz C (1999) Roles for PDGF-A and sonic hedgehog in development of mesenchymal components of the hair follicle. *Development* 126(12): 2611–21.
- Karlsson L, Lindahl P, Heath J, Betsholtz C (2000) Abnormal gastrointestinal development in PDGF-A and PDGFR-(alpha) deficient mice implicates a novel mesenchymal structure with putative instructive properties in villus morphogenesis. *Development* 127(16): 3457–66.
- Katoh-Fukui Y, Tsuchiya R, Shiroishi T, Nakahara Y, Hashimoto N, Noguchi K, Higashinakagawa T (1998) Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature* 393(6686): 688–92.
- Kawano K, Furusawa S, Matsuda H, Takase M, Nakamura M (2001) Expression of steroidogenic factor-1 in frog embryo and developing gonad. *Gen Comp Endocrinol* 123(1): 13–22.
- Kent J, Wheatley S, Andrews J, Sinclair A, Koopman P (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122(9): 2813–22.
- Ketola I, Rahman N, Toppari J, Bielinska M, Porter-Tinge S, Tapanainen J, Huhtaniemi I, Wilson D, Heikinheimo M (1999) Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 140(3): 1470–80.
- Ketola I, Pentikainen V, Vaskivuo T, Ilvesmaki V, Herva R, Dunkel L, Tapanainen J, Toppari J, Heikinheimo M (2000) Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 85(10): 3925–31.
- Ketola I, Anttonen M, Vaskivuo T, Tapanainen J, Toppari J, Heikinheimo M (2002) Developmental expression and spermatogenic stage specificity of transcription factors GATA-1 and GATA-4 and their cofactors FOG-1 and FOG-2 in the mouse testis. *Eur J Endocrinol* 147(3): 397–406.
- Kettlewell J, Raymond C, Zarkower D (2000) Temperature-dependent expression of turtle Dmrt1 prior to sexual differentiation. *Genesis* 26(3): 174–8.

Bibliografia

- Kim J, Prawitt D, Bardeesy N, Torban E, Vicaner C, Goodyer P, Zabel B, Pelletier J (1999) The Wilms' tumor suppressor gene (*wt1*) product regulates *Dax-1* gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol* 19(3): 2289–99.
- Kim S, Kettlewell J, Anderson R, Bardwell V, Zarkower D (2003) Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr Patterns* 3(1): 77–82.
- Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier M, Poulat F, Behringer R, Lovell-Badge R, Capel B (2006) *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4(6): e187.
- Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns W, Yokoyama M, Morohashi K (2002) Mutation of *ARX* causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* 32(3): 359–69.
- Kolaskar A, Tongaonkar P (1990) A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276(1-2): 172–4.
- Kondo M, Froschauer A, Kitano A, Nanda I, Hornung U, Volf J, Asakawa S, Mitani H, Naruse K, Tanaka M, Schmid M, Shimizu N, Schartl M, Shima A (2002) Molecular cloning and characterization of *DMRT* genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene* 295(2): 213–22.
- Koopman P (1999) *Sry* and *Sox9*: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* 55(6-7): 839–56.
- Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348(6300): 450–2.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 351(6322): 117–21.
- Koubova J, Menke D, Zhou Q, Capel B, Griswold M, Page D (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(8): 2474–9.
- Kreidberg J, Sariola H, Loring J, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R (1993) *WT-1* is required for early kidney development. *Cell* 74(4): 679–91.
- Kuo C, Morrisey E, Anandappa R, Sigrist K, Lu M, Parmacek M, Soudais C, Leiden J (1997) *GATA4* transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 11(8): 1048–60.
- Lahbib-Mansais Y, Barbosa A, Yerle M, Parma P, Milan D, Pailhoux E, Gellin J, Cotinot C (1997) Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: *AMH*, *WT1*, *FTZ1*, *SOX2*, *SOX9*, *AHC*, and placental and embryonic *CYP19*. *Cytogenet Cell Genet* 76(1-2): 109–14.
- Laitinen M, Anttonen M, Ketola I, Wilson D, Ritvos O, Butzow R, Heikinheimo M (2000) Transcription factors *GATA-4* and *GATA-6* and a *GATA* family cofactor, *FOG-2*, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3476–83.

Bibliografia

- Lala D, Rice D, Parker K (1992) Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 6(8): 1249–58.
- Lalli E, Bardoni B, Zazopoulos E, Wurtz J, Strom T, Moras D, Sassone-Corsi P (1997) A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 11(13): 1950–60.
- Lalli E, Ohe K, Hindelang C, Sassone-Corsi P (2000) Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol Cell Biol* 20(13): 4910–21.
- Larsson S, Charlieu J, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie N (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81(3): 391–401.
- Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C (1991) FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 252(5007): 848–51.
- Lawson K, Hage W (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182: 68–84; discussion 84–91.
- Lei N, Heckert L (2002) Sp1 and Egr1 regulate transcription of the Dmrt1 gene in Sertoli cells. *Biol Reprod* 66(3): 675–84.
- Lei N, Heckert L (2004) Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol* 24(1): 377–88.
- Lemeh C (1960) A study of the development and structural relationships of the testis and guernaculum. *Surg Gynecol Obstet* 110: 164–72.
- Leutert R (1974) [Sex differentiation and gametogenesis in *Bonellia viridis* Rolando (author's transl)]. *J Embryol Exp Morphol* 32(1): 169–93.
- Li B, Zhang W, Chan G, Jancso-Radek A, Liu S, Weiss M (2001) Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. A clinical correlation. *J Biol Chem* 276(49): 46480–4.
- Li J, Hoyle G (2001) Overexpression of PDGF-A in the lung epithelium of transgenic mice produces a lethal phenotype associated with hyperplasia of mesenchymal cells. *Dev Biol* 239(2): 338–49.
- Lin A, Roche A, Wilk J, Svensson E (2004) The N termini of Friend of GATA (FOG) proteins define a novel transcriptional repression motif and a superfamily of transcriptional repressors. *J Biol Chem* 279(53): 55017–23.
- Little M, Holmes G, Bickmore W, van Heyningen V, Hastie N, Wainwright B (1995) DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum Mol Genet* 4(3): 351–8.
- Liu D, Le Drean Y, Ekker M, Xiong F, Hew C (1997) Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin IIbeta subunit gene. *Mol Endocrinol* 11(7): 877–90.
- Lossky M, Wensink P (1995) Regulation of *Drosophila* yolk protein genes by an ovary-specific GATA factor. *Mol Cell Biol* 15(12): 6943–52.
- Lovell-Badge R, Robertson E (1990) XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development* 109(3): 635–46.

Bibliografia

- Lu J, McKinsey T, Xu H, Wang D, Richardson J, Olson E (1999) FOG-2, a heart- and brain-enriched cofactor for GATA transcription factors. *Mol Cell Biol* 19(6): 4495–502.
- Ludbrook L, Harley V (2004) Sex determination: a 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab* 15(3): 116–21.
- Luo X, Ikeda Y, Parker K (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77(4): 481–90.
- Madl J, Herman R (1979) Polyploids and sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 93(2): 393–402.
- Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B (2005a) Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res* 309(2): 468–75.
- Malki S, Nef S, Notarnicola C, Thevenet L, Gasca S, Mejean C, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B (2005b) Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J* 24(10): 1798–809.
- Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83(6): 835–9.
- Mansour S, Hall C, Pembrey M, Young I (1995) A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet* 32(6): 415–20.
- Mansour S, Offiah A, McDowall S, Sim P, Tolmie J, Hall C (2002) The phenotype of survivors of campomelic dysplasia. *J Med Genet* 39: 597–602.
- Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel O, Lareyre J, Bernot A, Laudet V, Guiguen Y (2000) DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta* 1493(1-2): 180–7.
- Marshall Graves J, Shetty S (2001) Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* 290(5): 449–62.
- Martineau J, Nordqvist K, Tilmann C, Lovell-Badge R, Capel B (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol* 7(12): 958–68.
- Mathews L (1935) The oestrous cycle and intersexuality in the female mole (*Talpa europaea* Linn). *Proc Zool Soc Lond* 2: 347–83.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey C, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417(6888): 559–63.
- Matsunaga E (1981) Genetics of Wilms' tumor. *Hum Genet* 57(3): 231–46.
- Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue J, Semba K (2003) Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene* 22(39): 7900–4.
- Mattei M, Penault-Llorca F, Coulier F, Birnbaum D (1995) The human FGF9 gene maps to chromosomal region 13q11-q12. *Genomics* 29(3): 811–2.
- McClung C (1902) The accessory chromosome sex determinant? *Biol Bull* (3): 72–77.
- McDonald M, Flejter W, Sheldon S, Putzi M, Gorski J (1997) XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy. *Am J Med Genet* 73(3): 321–6.

Bibliografia

- McLaren A (1984) Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 38: 7–23.
- McLaren A (1990) Sexual differentiation. Of MIS and the mouse. *Nature* 345(6271): 111.
- McLaren A (1995) Germ cells and germ cell sex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350(1333): 229–33.
- McLaren A (2000) Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2): 3–9.
- McLaren A (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262(1): 1–15.
- McLaren A, Southee D (1997) Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol* 187(1): 107–13.
- Meeks J, Crawford S, Russell T, Morohashi K, Weiss J, Jameson J (2003a) Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 130(5): 1029–36.
- Meeks J, Weiss J, Jameson J (2003b) Dax1 is required for testis determination. *Nat Genet* 34(1): 32–3.
- Meinke G, Sigler P (1999) DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nat Struct Biol* 6(5): 471–7.
- Menke D, Page D (2002) Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns* 2(3-4): 359–67.
- Menke D, Koubova J, Page D (2003) Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol* 262(2): 303–12.
- Merchant-Larios H (1975) Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol* 44(1): 1–21.
- Merchant-Larios H, Centeno B (1981) Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog Clin Biol Res* 59B: 383–92.
- Merchant-Larios H, Chimal-Monroy J (1989) The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Prog Clin Biol Res* 296: 55–63.
- Merchant-Larios H, Taketo T (1991) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microsc Tech* 19(2): 158–71.
- Merchant-Larios H, Moreno-Mendoza N, Buehr M (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol* 37(3): 407–15.
- Miller D, Summers J, Silber S (2004) Environmental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction? *Fertil Steril* 81(4): 954–64.
- Miyamoto M, Naruo K, Seko C, Matsumoto S, Kondo T, Kurokawa T (1993) Molecular cloning of a novel cytokine cDNA encoding the ninth member of the fibroblast growth factor family, which has a unique secretion property. *Mol Cell Biol* 13(7): 4251–9.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S (1997) Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124(9): 1653–64.

Bibliografia

- Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, Swain A, Morohashi K (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): 507–19.
- Moffett P, Bruening W, Nakagama H, Bardeesy N, Housman D, Housman D, Pelletier J (1995) Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 11105–9.
- Molkentin J, Lin Q, Duncan S, Olson E (1997) Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11(8): 1061–72.
- Molyneaux K, Stallock J, Schaible K, Wylie C (2001) Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* 240(2): 488–98.
- Moniot B, Berta P, Scherer G, Sudbeck P, Poulat F (2000) Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev* 91(1-2): 323–5.
- Moorthy A, Chesney R, Lubinsky M (1987) Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Frasier" syndrome—a commentary on reported cases. *Am J Med Genet Suppl* 3: 297–302.
- Moreno-Mendoza N, Harley V, Merchant-Larios H (1999) Differential expression of SOX9 in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* at male- or female-promoting temperatures. *J Exp Zool* 284(6): 705–10.
- Morohashi K, Iida H, Nomura M, Hatano O, Honda S, Tsukiyama T, Niwa O, Hara T, Takakusu A, Shibata Y, et al (1994) Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol Endocrinol* 8(5): 643–53.
- Morris J, Madden S, Tournay O, Cook D, Sukhatme V, Rauscher 3rd F (1991) Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene* 6(12): 2339–48.
- Morrish B, Sinclair A (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction* 124(4): 447–57.
- Mossman H, Duke K, *Comparative morphology of the mammalian ovary*. (The University of Wisconsin Press., 1973).
- Mueller R (1994) The Denys-Drash syndrome. *J Med Genet* 31(6): 471–7.
- Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development* 119(4): 1329–41.
- Munsterberg A, Lovell-Badge R (1991) Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* 113(2): 613–24.
- Murdock C, Wibbels T (2003) Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Res* 101(3-4): 302–8.
- Murdock C, Wibbels T (2006) Dmrt1 expression in response to estrogen treatment in a reptile with temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 306(2): 134–9.

Bibliografia

- Muroya K, Okuyama T, Goishi K, Ogiso Y, Fukuda S, Kameyama J, Sato H, Suzuki Y, Terasaki H, Gomyo H, Wakui K, Fukushima Y, Ogata T (2000) Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *J Clin Endocrinol Metab* 85(9): 3094–100.
- Muscatelli F, Strom T, Walker A, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, et al (1994) Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 372(6507): 672–6.
- Nachtigal M, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten D, Flanagan J, Hammer G, Ingraham H (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 93(3): 445–54.
- Nakamoto M, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N (2005) Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 333(3): 729–36.
- Nanda I, Shan Z, Scharl M, Burt D, Koehler M, Nothwang H, Grutzner F, Paton I, Windsor D, Dunn I, Engel W, Staeheli P, Mizuno S, Haaf T, Schmid M (1999) 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet* 21(3): 258–9.
- Nanda I, Zend-Ajusck E, Shan Z, Grutzner F, Scharl M, Burt D, Koehler M, Fowler V, Goodwin G, Schneider W, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M (2000) Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet Cell Genet* 89(1-2): 67–78.
- Nanda I, Kondo M, Hornung U, Asakawa S, Winkler C, Shimizu A, Shan Z, Haaf T, Shimizu N, Shima A, Schmid M, Scharl M (2002) A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18): 11778–83.
- Natoli T, Alberta J, Bortvin A, Taglienti M, Menke D, Loring J, Jaenisch R, Page D, Housman D, Kreidberg J (2004) Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. *Dev Biol* 268(2): 429–40.
- Neeper M, Lowe R, Galuska S, Hofmann K, Smith R, Elbrecht A (1996) Molecular cloning of an avian anti-Mullerian hormone homologue. *Gene* 176(1-2): 203–9.
- Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, Vassalli J, Efstratiadis A, Accili D, Parada L (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426(6964): 291–5.
- van Niekerk W, Retief A (1981) The gonads of human true hermaphrodites. *Hum Genet* 58(1): 117–22.
- Notarnicola C, Malki S, Berta P, Poulat F, Boizet-Bonhoure B (2006) Transient expression of SOX9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expr Patterns* .
- Ogata T, Muroya K, Matsuo N, Hata J, Fukushima Y, Suzuki Y (1997) Impaired male sex development in an infant with molecularly defined partial 9p monosomy: implication for a testis forming gene(s) on 9p. *J Med Genet* 34(4): 331–4.
- Oh H, Li Y, Lau Y (2005) Sry associates with the heterochromatin protein 1 complex by interacting with a KRAB domain protein. *Biol Reprod* 72(2): 407–15.

Bibliografia

- Oreal E, Pieau C, Mattei M, Josso N, Picard J, Carre-Eusebe D, Magre S (1998) Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* 212(4): 522–32.
- Ornitz D, Itoh N (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2(3): REVIEWS3005.
- Osada M, Park H, Nagakawa Y, Begum S, Yamashita K, Wu G, Kim M, Trink B, Sidransky D (2006) A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 339(4): 1120–8.
- Ottolenghi C, McElreavey K (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab* 71(1-2): 397–404.
- Ottolenghi C, Fellous M, Barbieri M, McElreavey K (2002) Novel paralogy relations among human chromosomes support a link between the phylogeny of doublesex-related genes and the evolution of sex determination. *Genomics* 79(3): 333–43.
- Ounap K, Uibo O, Zordania R, Kiho L, Ilus T, Oiglane-Shlik E, Bartsch O (2004) Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: a girl with XY complement, bilateral ovotestes, and extreme growth retardation, and two XX females with normal pubertal development. *Am J Med Genet A* 130(4): 415–23.
- Page D, Mosher R, Simpson E, Fisher E, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown L (1987) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 51(6): 1091–104.
- Palmer M, Sinclair A, Berta P, Ellis N, Goodfellow P, Abbas N, Fellous M (1989) Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 342(6252): 937–9.
- Park S, Meeks J, Raverot G, Pfaff L, Weiss J, Hammer G, Jameson J (2005) Nuclear receptors Sfl and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development* 132(10): 2415–23.
- Parker K, Schimmer B (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18(3): 361–77.
- Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier M, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G (2006) R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* .
- Pask A, Harry J, Graves J, O'Neill R, Layfield S, Shaw G, Renfree M (2002) SOX9 has both conserved and novel roles in marsupial sexual differentiation. *Genesis* 33(3): 131–9.
- Patel M, Dorman K, Zhang Y, Huang B, Arnold A, Sinsheimer J, Vilain E, McCabe E (2001) Primate DAX1, SRY, and SOX9: evolutionary stratification of sex-determination pathway. *Am J Hum Genet* 68(1): 275–80.
- Patient R, McGhee J (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev* 12(4): 416–22.
- Pelletier J, Schalling M, Buckler A, Rogers A, Haber D, Housman D (1991) Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 5(8): 1345–56.
- Peltoketo H, Allinen M, Vuosku J, Kujala S, Lundan T, Salminen A, Winqvist R, Vainio S (2004) Characterization and expression of the human WNT4; lack of associated germline mutations in high- to moderate-risk breast and ovarian cancer. *Cancer Lett* 213(1): 83–90.

Bibliografia

- Pendergrass T (1976) Congenital anomalies in children with Wilms' tumor: a new survey. *Cancer* 37(1): 403–8.
- Peters H (1969) The effect of radiation in early life on the morphology and reproductive function of the mouse ovary. *Adv Reprod Physiol* 4: 150–85.
- Peters H, Levy E, Crone M (1965) Oogenesis in rabbits. *J Exp Zool* 158: 169–79.
- Pfeiffer R, Rauch A, Trautmann U, Dorr H, Hiort O, Scherer G, Rosch G, Papadopoulos T, v d Hardt K, Lachmann E (1999) Defective sexual development in an infant with 46, XY, der(9)t(8;9)(q23.1;p23)mat. *Eur J Pediatr* 158(3): 213–6.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N (1999) Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. *Cell Mol Life Sci* 55(6-7): 887–900.
- Pierucci-Alves F, Clark A, Russell L (2001) A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod* 65(5): 1392–402.
- Pollock R, Treisman R (1990) A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res* 18(21): 6197–204.
- Pontiggia A, Rimini R, Harley V, Goodfellow P, Lovell-Badge R, Bianchi M (1994) Sex-reversing mutations affect the architecture of SRY-DNA complexes. *EMBO J* 13(24): 6115–24.
- Popoff N (1911) Le tissu interstitiel et les corps jaunes de l'ovaire. *Arch Biol Paris* 26: 483–556.
- Poulat F, Girard F, Chevron M, Goze C, Rebillard X, Calas B, Lamb N, Berta P (1995) Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol* 128(5): 737–48.
- Preiss S, Argentaro A, Clayton A, John A, Jans D, Ogata T, Nagai T, Barroso I, Schafer A, Harley V (2001) Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon SOX9 structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation. *J Biol Chem* 276(30): 27864–72.
- Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, et al (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346(6280): 194–7.
- Privitera O, Vessecchia G, Bernasconi B, Bettio D, Stioui S, Giordano G (2005) Prenatal diagnosis of del(9)(p24): a sex reverse case. *Prenat Diagn* 25(10): 945–8.
- Qin Y, Bishop C (2005) Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum Mol Genet* 14(9): 1221–9.
- Qin Y, Kong L, Poirier C, Truong C, Overbeek P, Bishop C (2004) Long-range activation of Sox9 in Odd Sex (Ods) mice. *Hum Mol Genet* 13(12): 1213–8.
- Quaggin S, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, Rossant J (1999) The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* 126(24): 5771–83.
- Rackley R, Flenniken A, Kuriyan N, Kessler P, Stoler M, Williams B (1993) Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ* 4(12): 1023–31.

Bibliografía

- Rao M, Pham J, Imam J, MacLean J, Murali D, Furuta Y, Sinha-Hikim A, Wilkinson M (2006) Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev* 20(2): 147–52.
- Raverot G, Weiss J, Park S, Hurley L, Jameson J (2005) Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis. *Dev Biol* 283(1): 215–25.
- Raymond C, Shamu C, Shen M, Seifert K, Hirsch B, Hodgkin J, Zarkower D (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature* 391(6668): 691–5.
- Raymond C, Kettlewell J, Hirsch B, Bardwell V, Zarkower D (1999a) Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 215(2): 208–20.
- Raymond C, Parker E, Kettlewell J, Brown L, Page D, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter W, Bardwell V, Hirsch B, Zarkower D (1999b) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Hum Mol Genet* 8(6): 989–96.
- Raymond C, Murphy M, O’Sullivan M, Bardwell V, Zarkower D (2000) Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev* 14(20): 2587–95.
- Reynaud K, Driancourt M (2000) Oocyte attrition. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2): 101–8.
- Riccardi V, Sujansky E, Smith A, Francke U (1978) Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms’ tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics* 61(4): 604–10.
- Ricci G, Catizone A, Galdieri M (2004) Embryonic mouse testis development: role of platelet derived growth factor (PDGF-BB). *J Cell Physiol* 200(3): 458–67.
- Rice D, Mouw A, Bogerd A, Parker K (1991) A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* 5(10): 1552–61.
- Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 6(6): 276–277.
- Robert N, Tremblay J, Viger R (2002) Friend of GATA (FOG)-1 and FOG-2 differentially repress the GATA-dependent activity of multiple gonadal promoters. *Endocrinology* 143(10): 3963–73.
- Ross A, Capel B (2005) Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab* 16(1): 19–25.
- Ross R, Glomset J, Kariya B, Raines E (1978) Role of platelet factors in the growth of cells in culture. *Natl Cancer Inst Monogr* (48): 103–8.
- Rousset F, Bouchon D, Pintureau B, Juchault P, Solignac M (1992) Wolbachia endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc Biol Sci* 250(1328): 91–8.
- Rozen S, Skaletsky H J (1998) Primer3. *Código disponible en http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html* .
- Rubenstein N, Cunha G, Wang Y, Campbell K, Conley A, Catania K, Glickman S, Place N (2003) Variation in ovarian morphology in four species of New World moles with a peniform clitoris. *Reproduction* 126(6): 713–9.

Bibliografia

- Sadovsky Y, Crawford P, Woodson K, Polish J, Clements M, Tourtellotte L, Simburger K, Milbrandt J (1995) Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(24): 10939–43.
- Salas-Cortes L, Jaubert F, Barbaux S, Nessmann C, Bono M, Fellous M, McElreavey K, Rosemblatt M (1999) The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol* 43(2): 135–40.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.* .
- Sanchez A, Bullejos M, Burgos M, Hera C, Jimenez R, Diaz de la Guardia R (1996a) High sequence identity between the SRY HMG box from humans and insectivores. *Mamm Genome* 7(7): 536–8.
- Sanchez A, Bullejos M, Burgos M, Hera C, Stamatopoulos C, Diaz De la Guardia R, Jimenez R (1996b) Females of four mole species of genus *Talpa* (insectivora, mammalia) are true hermaphrodites with ovotestes. *Mol Reprod Dev* 44(3): 289–94.
- 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 Dyn* 217(3): 293–8.
- Sarre S, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays* 26(6): 639–45.
- Saxen L, Sariola H (1987) Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol* 1(3): 385–92.
- Schaefer L, Beermann M, Miller J (1999) Coding sequence, genomic organization, chromosomal localization, and expression pattern of the signalosome component Cops2: the mouse homologue of *Drosophila* alien. *Genomics* 56(3): 310–6.
- Scharnhorst V, Dekker P, van der Eb A, Jochemsen A (1999) Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem* 274(33): 23456–62.
- Schepers G, Bullejos M, Hosking B, Koopman P (2000) Cloning and characterisation of the Sry-related transcription factor gene Sox8. *Nucleic Acids Res* 28(6): 1473–80.
- Schepers G, Wilson M, Wilhelm D, Koopman P (2003) SOX8 is expressed during testis differentiation in mice and synergizes with SF1 to activate the *Amh* promoter in vitro. *J Biol Chem* 278(30): 28101–8.
- Schmahl J, Capel B (2003) Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol* 258(2): 264–76.
- Schmahl J, Eicher E, Washburn L, Capel B (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development* 127(1): 65–73.
- Schmahl J, Kim Y, Colvin J, Ornitz D, Capel B (2004) Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development* 131(15): 3627–36.
- Schmidt D, Ovitt C, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier A, Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131(4): 933–42.

Bibliografia

- Schutt C, Nothiger R (2000) Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127(4): 667–77.
- Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol* 274(2): 271–9.
- Sette C, Dolci S, Geremia R, Rossi P (2000) The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int J Dev Biol* 44(6): 599–608.
- Shan Z, Zabel B, Trautmann U, Hillig U, Ottolenghi C, Wan Y, Haaf T (2000) FISH mapping of the sex-reversal region on human chromosome 9p in two XY females and in primates. *Eur J Hum Genet* 8(3): 167–73.
- Shapiro D (1990) Sex-changing fish as a manipulable system for the study of the determination, differentiation, and stability of sex in vertebrates. *J Exp Zool Suppl* 4: 132–6.
- Sharma P, Bowman M, Madden S, Rauscher 3rd F, Sukumar S (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev* 8(6): 720–31.
- Shen M, Hodgkin J (1988) mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell* 54(7): 1019–31.
- Shen W, Moore C, Ikeda Y, Parker K, Ingraham H (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77(5): 651–61.
- Shibata K, Takase M, Nakamura M (2002) The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen Comp Endocrinol* 127(3): 232–41.
- Shimamura R, Fraizer G, Trapman J, Lau YfC, Saunders G (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 Pt 2): 2571–80.
- Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O, et al (1995) Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn* 204(1): 22–9.
- Siggers P, Smith L, Greenfield A (2002) Sexually dimorphic expression of Gata-2 during mouse gonad development. *Mech Dev* 111(1-2): 159–62.
- Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R (1996) Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 14(1): 62–8.
- Sim E, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay M, Little M (2002) Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* 21(19): 2948–60.
- Sim H, Rimmer K, Kelly S, Ludbrook L, Clayton A, Harley V (2005) Defective calmodulin-mediated nuclear transport of the sex-determining region of the Y chromosome (SRY) in XY sex reversal. *Mol Endocrinol* 19(7): 1884–92.
- Simpson J, *Disorders of sexual differentiation*. New York (Academic Press, 1976).

Bibliografia

- Sinclair A, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346(6281): 240–4.
- Sinclair A, Smith C, Western P, McClive P (2002) A comparative analysis of vertebrate sex determination. *Novartis Found Symp* 244: 102–11; discussion 111–4, 203–6, 253–7.
- Singh L, Wadhwa R, Naidu S, Nagaraj R, Ganesan M (1994) Sex- and tissue-specific Bkm(GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. *J Biol Chem* 269(41): 25321–7.
- Skinner M, Tung P, Fritz I (1985) Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol* 100(6): 1941–7.
- Smith C, Sinclair A (2004) Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26(2): 120–32.
- Smith C, McClive P, Western P, Reed K, Sinclair A (1999a) Conservation of a sex-determining gene. *Nature* 402(6762): 601–2.
- Smith C, Smith M, Sinclair A (1999b) Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 234(2): 395–402.
- Smith C, Clifford V, Western P, Wilcox S, Bell K, Sinclair A (2000) Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J Mol Endocrinol* 24(1): 23–32.
- Smith C, Hurley T, McClive P, Sinclair A (2002) Restricted expression of DMRT3 in chicken and mouse embryos. *Gene Expr Patterns* 2(1-2): 69–72.
- Smith C, McClive P, Hudson Q, Sinclair A (2005) Male-specific cell migration into the developing gonad is a conserved process involving PDGF signalling. *Dev Biol* 284(2): 337–50.
- Smith L, Van Hateren N, Willan J, Romero R, Blanco G, Siggers P, Walsh J, Banerjee R, Denny P, Ponting C, Greenfield A (2003) Candidate testis-determining gene, Maestro (Mro), encodes a novel HEAT repeat protein. *Dev Dyn* 227(4): 600–7.
- Sock E, Schmidt K, Hermanns-Borgmeyer I, Bosl M, Wegner M (2001) Idiopathic weight reduction in mice deficient in the high-mobility-group transcription factor Sox8. *Mol Cell Biol* 21(20): 6951–9.
- Sock E, Pagon R, Keymolen K, Lissens W, Wegner M, Scherer G (2003) Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum Mol Genet* 12(12): 1439–47.
- Spieth J, Shim Y, Lea K, Conrad R, Blumenthal T (1991) elt-1, an embryonically expressed *Caenorhabditis elegans* gene homologous to the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 11(9): 4651–9.
- Spotila L, Spotila J, Hall S (1998) Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J Exp Zool* 281(5): 417–27.
- Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon A (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372(6507): 679–83.

Bibliografia

- Stevens N (1905) Studies in spermatogenesis with special reference to the "accessory chromosome". *Carnegie Inst Washington Rep* (36).
- Sudbeck P, Scherer G (1997) Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J Biol Chem* 272(44): 27848–52.
- Sugita J, Takase M, Nakamura M (2001) Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene* 280(1-2): 67–74.
- Sun T, Jayatilake D, Afink G, Ataliotis P, Nister M, Richardson W, Smith H (2000) A human YAC transgene rescues craniofacial and neural tube development in PDGFRalpha knockout mice and uncovers a role for PDGFRalpha in prenatal lung growth. *Development* 127(21): 4519–29.
- Svensson E, Tufts R, Polk C, Leiden J (1999) Molecular cloning of FOG-2: a modulator of transcription factor GATA-4 in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3): 956–61.
- Svensson E, Huggins G, Dardik F, Polk C, Leiden J (2000) A functionally conserved N-terminal domain of the friend of GATA-2 (FOG-2) protein represses GATA4-dependent transcription. *J Biol Chem* 275(27): 20762–9.
- Swain A, Lovell-Badge R (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev* 13(7): 755–67.
- Swain A, Narvaez V, Burgoyne P, Camerino G, Lovell-Badge R (1998) Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391(6669): 761–7.
- Taguchi O, Cunha G, Lawrence W, Robboy S (1984) Timing and irreversibility of Mullerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol* 106(2): 394–8.
- Takada S, Koopman P (2003) Origin and possible roles of the Sox8 transcription factor gene during sexual development. *Cytogenet Genome Res* 101(3-4): 212–8.
- Tang P, Park D, Marshall Graves J, Harley V (2004) ATRX and sex differentiation. *Trends Endocrinol Metab* 15(7): 339–44.
- Tease C, Fisher G (1989) Further examination of the production-line hypothesis in mouse foetal oocytes. II. T(14; 15)6Ca heterozygotes. *Chromosoma* 97(4): 315–20.
- Temple I, Barber J, James R, Burge D (1994) Diaphragmatic herniae and translocations involving 8q22 in two patients. *J Med Genet* 31(9): 735–7.
- Tevosian S, Deconinck A, Cantor A, Rieff H, Fujiwara Y, Corfas G, Orkin S (1999) FOG-2: A novel GATA-family cofactor related to multitype zinc-finger proteins Friend of GATA-1 and U-shaped. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(3): 950–5.
- Tevosian S, Deconinck A, Tanaka M, Schinke M, Litovsky S, Izumo S, Fujiwara Y, Orkin S (2000) FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell* 101(7): 729–39.
- Tevosian S, Albrecht K, Crispino J, Fujiwara Y, Eicher E, Orkin S (2002) Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development* 129(19): 4627–34.

Bibliografia

- Thevenet L, Mejean C, Moniot B, Bonneaud N, Galeotti N, Aldrian-Herrada G, Poulat F, Berta P, Benkirane M, Boizet-Bonhoure B (2004) Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J* 23(16): 3336–45.
- Tilmann C, Capel B (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development* 126(13): 2883–90.
- Tommerup N, Schempp W, Meinecke P, Pedersen S, Bolund L, Brandt C, Goodpasture C, Guldberg P, Held K, Reinwein H, et al (1993) Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and campomelic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet* 4(2): 170–4.
- Torres Maldonado L, Landa Piedra A, Moreno Mendoza N, Marmolejo Valencia A, Meza Martinez A, Merchant Larios H (2002) Expression profiles of Dax1, Dmrt1, and Sox9 during temperature sex determination in gonads of the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Comp Endocrinol* 129(1): 20–6.
- Tremblay J, Viger R (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): 1388–401.
- Tremblay J, Viger R (2001a) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology* 142(3): 977–86.
- Tremblay J, Viger R (2001b) Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod* 64(4): 1191–9.
- Tremblay J, Viger R (2003a) 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* 278(43): 42637–42.
- Tremblay J, Viger R (2003b) Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5): 291–8.
- Tremblay J, Robert N, Viger R (2001) Modulation of endogenous GATA-4 activity reveals its dual contribution to Mullerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Mol Endocrinol* 15(9): 1636–50.
- Tsang A, Visvader J, Turner C, Fujiwara Y, Yu C, Weiss M, Crossley M, Orkin S (1997) FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* 90(1): 109–19.
- Tsang A, Fujiwara Y, Hom D, Orkin S (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev* 12(8): 1176–88.
- Tung P, Fritz I (1987) Morphogenetic restructuring and formation of basement membranes by Sertoli cells and testis peritubular cells in co-culture: inhibition of the morphogenetic cascade by cyclic AMP derivatives and by blocking direct cell contact. *Dev Biol* 120(1): 139–53.
- Turner J, Crossley M (1998) Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO J* 17(17): 5129–40.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia J, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13(11): 1171–81.

Bibliografia

- Ueno S, Kuroda T, Maclaughlin D, Ragin R, Manganaro T, Donahoe P (1989) Mullerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 125(2): 1060–6.
- Uhlenhaut N, Treier M (2006) Foxl2 function in ovarian development. *Mol Genet Metab* 88(3): 225–34.
- Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsuya T, Osame M (2000) A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* 67(5): 1302–5.
- Ungar A, Kelly G, Moon R (1995) Wnt4 affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo. *Mech Dev* 52(2-3): 153–64.
- Upadhyay S, Zamboni L (1982) Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(21): 6584–8.
- Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon A (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397(6718): 405–9.
- Vaskivuo T, Aittomaki K, Anttonen M, Ruokonen A, Herva R, Osawa Y, Heikinheimo M, Huhtaniemi I, Tapanainen J (2002) Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin in individuals with an inactivating mutation of the FSH receptor. *Fertil Steril* 78(1): 108–13.
- Veith A, Froschauer A, Korting C, Nanda I, Hanel R, Schmid M, Scharl M, Volff J (2003) Cloning of the dmrt1 gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene* 317(1-2): 59–66.
- Veitia R, Nunes M, Brauner R, Doco-Fenzy M, Joanny-Flinois O, Jaubert F, Lortat-Jacob S, Fellous M, McElreavey K (1997) Deletions of distal 9p associated with 46,XY male to female sex reversal: definition of the breakpoints at 9p23.3-p24.1. *Genomics* 41(2): 271–4.
- Veitia R, Nunes M, Quintana-Murci L, Rappaport R, Thibaud E, Jaubert F, Fellous M, McElreavey K, Goncalves J, Silva M, Rodrigues J, Caspurro M, Boeiro F, Marques R, Lavinha J (1998) Swyer syndrome and 46,XY partial gonadal dysgenesis associated with 9p deletions in the absence of monosomy-9p syndrome. *Am J Hum Genet* 63(3): 901–5.
- Vialard F, Ottolenghi C, Gonzales M, Choiset A, Girard S, Siffroi J, McElreavey K, Vibert-Guigue C, Sebaoun M, Joye N, Portnoi M, Jaubert F, Fellous M (2002) Deletion of 9p associated with gonadal dysfunction in 46,XY but not in 46,XX human fetuses. *J Med Genet* 39(7): 514–8.
- Vidal V, Chaboissier M, de Rooij D, Schedl A (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28(3): 216–7.
- Viger R, Mertineit C, Trasler J, Nemer M (1998) Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 125(14): 2665–75.
- Viger R, Taniguchi H, Robert N, Tremblay J (2004) Role of the GATA family of transcription factors in andrology. *J Androl* 25(4): 441–52.
- Vigier B, Watrin F, Magre S, Tran D, Josso N (1987) Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development* 100(1): 43–55.

Bibliografia

- Vogel W, Jainta S, Rau W, Geerkens C, Baumstark A, Correa-Cerro L, Ebenhoch C, Just W (1998) Sex determination in *Ellobius lutescens*: the story of an enigma. *Cytogenet Cell Genet* 80(1-4): 214–21.
- Volf J, Zarkower D, Bardwell V, Schartl M (2003) Evolutionary dynamics of the DM domain gene family in metazoans. *J Mol Evol* 57 Suppl 1: S241–9.
- Wachtel S, Ono S, Koo G, Boyse E (1975) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 257(5523): 235–6.
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli F, Keutel J, Hustert E, et al (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79(6): 1111–20.
- Waldeyer W, *Eierstock und Ei [Ovarios y huevos]*. (Leipzig, 1870).
- Walton R, Bruce A, Olivey H, Najib K, Johnson V, Earley J, Ho R, Svensson E (2006) Fog1 is required for cardiac looping in zebrafish. *Dev Biol* 289(2): 482–93.
- Wang D, Kobayashi T, Senthilkumaran B, Sakai F, Sudhakumari C, Suzuki T, Yoshikuni M, Matsuda M, Morohashi K, Nagahama Y (2002) Molecular cloning of DAX1 and SHP cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem Biophys Res Commun* 297(3): 632–40.
- Wartenberg H (1978) Human testicular development and the role of the mesonephros in the origin of a dual Sertoli cell system. *Andrologia* 10(1): 1–21.
- Wartenberg H (1982) Development of the early human ovary and role of the mesonephros in the differentiation of the cortex. *Anat Embryol (Berl)* 165(2): 253–80.
- Watanabe K, Clarke T, Lane A, Wang X, Donahoe P (2000) Endogenous expression of Mullerian inhibiting substance in early postnatal rat sertoli cells requires multiple steroidogenic factor-1 and GATA-4-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1624–9.
- Watanabe M, Tanaka M, Kobayashi D, Yoshiura Y, Oba Y, Nagahama Y (1999) Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization. *Mol Cell Endocrinol* 149(1-2): 221–8.
- Wegner M (1999) From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27(6): 1409–20.
- Weiss J, Meeks J, Hurley L, Raverot G, Frassetto A, Jameson J (2003) Sox3 is required for gonadal function, but not sex determination, in males and females. *Mol Cell Biol* 23(22): 8084–91.
- Weiss M, Orkin S (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol* 23(2): 99–107.
- Welshons W, Russell L (1959) The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 45(4): 560–6.
- Werner M, Huth J, Gronenborn A, Clore G (1995) Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 81(5): 705–14.
- Western P, Harry J, Graves J, Sinclair A (1999) Temperature-dependent sex determination in the American alligator: AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn* 216(4-5): 411–9.

Bibliografia

- Western P, Harry J, Marshall Graves J, Sinclair A (2000) Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene* 241(2): 223–32.
- White R, Dowler L, Pasztor L, Gatson L, Adkison L, Angeloni S, Wilson D (1995) Assignment of the transcription factor GATA4 gene to human chromosome 8 and mouse chromosome 14: Gata4 is a candidate gene for Ds (disorganization). *Genomics* 27(1): 20–6.
- Wieacker P, Missbach D, Jakubiczka S, Borgmann S, Albers N (1996) Sex reversal in a child with the karyotype 46,XY, dup (1) (p22.3p32.3). *Clin Genet* 49(5): 271–3.
- Wilhelm D, Englert C (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sfl. *Genes Dev* 16(14): 1839–51.
- Wilhelm D, Martinson F, Bradford S, Wilson M, Combes A, Beverdam A, Bowles J, Mizusaki H, Koopman P (2005) Sertoli cell differentiation is induced both cell-autonomously and through prostaglandin signaling during mammalian sex determination. *Dev Biol* .
- Wilson C, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky R, Josso N, Vigier B, Cate R (1993a) Mullerian inhibiting substance requires its N-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol* 7(2): 247–57.
- Wilson T, Fahrner T, Milbrandt J (1993b) The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 13(9): 5794–804.
- Wingfield J (2005) A continuing saga: the role of testosterone in aggression. *Horm Behav* 48(3): 253–5; discussion 256–8.
- Witschi E (1951) Gonad development and function. *Recent Prog Horm Res* 6: 1–27.
- Yamamura Y, Aoyama S, Oshima Y, Kato T, Osawa N, Nakamura M (2005) Molecular cloning and expression in gonad of *Rana rugosa* WT1 and Fgf9. *Zool Sci* 22(9): 1045–50.
- Yang H, Chen Y, Takita J, Soeda E, Piao H, Hayashi Y (2001) Genomic structure and mutational analysis of the human KIF1B gene which is homozygously deleted in neuroblastoma at chromosome 1p36.2. *Oncogene* 20(36): 5075–83.
- Yao H, Whoriskey W, Capel B (2002) Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 16(11): 1433–40.
- Yao H, DiNapoli L, Capel B (2003) Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development* 130(24): 5895–902.
- Yao H, Matzuk M, Jorgez C, Menke D, Page D, Swain A, Capel B (2004) Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn* 230(2): 210–5.
- Yi W, Zarkower D (1999) Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. *Development* 126(5): 873–81.
- Yi W, Ross J, Zarkower D (2000) Mab-3 is a direct tra-1 target gene regulating diverse aspects of *C. elegans* male sexual development and behavior. *Development* 127(20): 4469–80.

Bibliografia

- Ying Y, Qi X, Zhao G (2002) Induction of primordial germ cells from pluripotent epiblast. *ScientificWorldJournal* 2: 801–10.
- Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel J, Yamamoto M (1994) Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development* 120(7): 1759–66.
- Yu R, Ito M, Saunders T, Camper S, Jameson J (1998) Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* 20(4): 353–7.
- Zaia A, Fraizer G, Piantanelli L, Saunders G (2001) Transcriptional regulation of the androgen signaling pathway by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Anticancer Res* 21(1A): 1–10.
- Zamboni L, Upadhyay S (1983) Germ cell differentiation in mouse adrenal glands. *J Exp Zool* 228(2): 173–93.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom T, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker A, McCabe E, et al (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372(6507): 635–41.
- Zarkower D (2001) Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet* 2(3): 175–85.
- Zarkower D (2002) Invertebrates may not be so different after all. *Novartis Found Symp* 244: 115–26; discussion 126–35, 203–6, 253–7.
- Zurita F, Barrionuevo F, Berta P, Ortega E, Burgos M, Jimenez R (2003) Abnormal sex-duct development in female moles: the role of anti-Mullerian hormone and testosterone. *Int J Dev Biol* 47(6): 451–8.