

Control Genético del desarrollo gonadal de *Talpa
occidentalis*



Darío Jesús García Lupiáñez

Tesis Doctoral

Abril 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Darío Jesús García Lupiáñez
D.L.: GR 2387-2011
ISBN: 978-84-694-3606-6



Instituto de
Biotecnología



Facultad de
Ciencias



Universidad de
Granada



Estudios de
Biología



Departamento de
Genética

CIBM

Centro de
Investigación
Biomédica

Control Genético del desarrollo gonadal de *Talpa occidentalis*

Dirigida por los Doctores:

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el Licenciado Darío Jesús García Lupiáñez para optar al grado de “Doctor por la Universidad de Granada”.

Dr. Rafael Jiménez Medina

Dr. Miguel Burgos Poyatos

Abril 2011

El presente trabajo se ha desarrollado en los laboratorios del Departamento de Genética y del Instituto de Biotecnología en la Facultad de Ciencias y en el Centro de Investigación Biomédica (CIBM) de la Universidad de Granada. La investigación realizada ha sido financiada por el MICINN, mediante la concesión de una beca predoctoral y a través de los Proyectos CGL2004-00863/BOS y CGL2008-00928/BOS y por la Junta de Andalucía, a través del Programa de Ayudas a Grupos de Investigación (Grupo PAI BIO-109).

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en el Congreso de la Sociedad Española de Genética “SEG2007”, además de ser aceptados para su publicación en la revista científica *Journal of Experimental Zoology Part B*.

Agradecimientos

Desde el momento en que supe que iba a realizar esta tesis doctoral hasta el presente ha habido muchas personas sin las que, quizás, esto no se hubiera materializado. Me gustaría mostrar mi más sincera gratitud:

A los doctores Rafael Jiménez y Miguel Burgos a los cuales admiro no sólo por su capacidad laboral, la cual es indudable, sino por su calidad humana. Les agradezco sinceramente que me hayan brindado la oportunidad de abrirme camino en el mundo de la investigación. Siempre estaré en deuda con ellos.

Al doctor Federico Zurita por su apoyo y ayuda durante todo este periodo.

A Fany, por ser un valor incalculable tanto dentro del laboratorio como fuera de él.

A David por enseñarme tanto en mis comienzos y por todos esos momentos compartidos a lo largo de estos años.

A Rajesh (el Presidente) por el maravilloso tiempo que hemos compartido durante su estancia en Granada.

A Paco, por su ayuda y su sincera amistad en Alemania, la cual se ha visto incrementada en España.

A Ezequiel por haberme metido en este mundillo y sobre todo por estar ahí desde tiempos inmemoriales.

A todas las personas que han pasado por el laboratorio durante mi estancia, en especial a Lara y a Pepillo.

A los doctores Robin Lovell-Badge (Developmental Genetics and Stem Cells Division, NIMR, Londres, UK), Blanche Capel (Department of Cell Biology, Duke University School of Medicine, Durham, EEUU) y Gerd Scherer (Experimentelle Molekulargenetik, Institut für Humangenetik, Friburgo, Alemania) y a todos los componentes de sus laboratorios por poner a mi alcance todos sus recursos ya ayuda durante mis estancias, permitiéndome vivir unas experiencias inolvidables.

A todo el personal del Departamento de Genética por la acogida que me han dado y por demostrar ser unas personas excepcionales.

A mis antiguos maestros Don Francisco Recalde, a la Srta. Antonia Comino por tenerme siempre cerca de la puerta, a David Marr por tener la habilidad y la paciencia de enseñarme inglés y a Francisco Muñoz de Oliveira, tantas veces campeón de Taekwondo, por su habilidad para engancharme al deporte sin que me diese cuenta de la disciplina.

A mis compañeros del CIBM, y López-Neira, en especial a Juandi (socio), Sonia, Patri, Kiko, María (tita) por todos esos momentos únicos.

A mis amigos futboleros Tonino (príncipe), Carlos (su pana), Antonio, Roge y Manu, por tantos y tantos partidos descargando adrenalina y esos terceros tiempos.

A Victor (Pingu), Héctor (Lauren), Jacobo, Ángel (Joe), Quique (Viveres), Enri, Bola (Juan Antonio), Cristóbal, Xelu, Nicholas, Fátima, María, Pablo, Jaime, Fernando, Leo, Óscar y familia, y demás amigos que tantos buenos momentos me han hecho y me siguen haciendo pasar.

A Lucía, Olga, Javi, Christian, Marti y Juan Francisco por todo lo bueno que hemos compartido.

A mis tíos Antonio y María, a Rubén, Antonia, la pequeña Natalia (la princesa de la familia Lupiáñez), a mi tía Inma, Teresa, Mané y al pequeño Dan (el príncipe de la familia García) por ser mucho más que familia.

A David por aguantar con voluntad férrea a su primo durante todos estos años y ser un apoyo fundamental para mi.

A mi padre Antonio por quererme tanto y enseñarme a levantarme una y otra vez a pesar de los fracasos. A mis abuelos Diego y Loli, y a mis hermanos Juan Carlos, Carmen y Diego por esos momentos inolvidables colgados de mi cuello como unos monetes.

A mi tía Cati y a Pepillo por haberse desvivido para que nunca me faltara nada y hacer de mi niñez una época maravillosa.

A mi abuelo José, la persona que más me habría gustado que viera esto, al que siempre llevaré en mi corazón.

A Eva, por haber tenido siempre la palabra exacta para levantarme el ánimo, por haber compartido conmigo unos años maravillosos y por ser una persona excepcional. Un «mucho» de esta tesis le corresponde a ella.

Pero, por encima de todos, a mi madre, Paqui, sin la cual estoy totalmente convencido de que no hubiera llegado hasta aquí. Nunca podré agradecerle lo suficiente todo el amor, comprensión y apoyo que me ha aportado siempre. Bendigo cada día la suerte que he tenido de ser su hijo.

Dedicado a mi madre

Índice general

1. Abstract	1
1.1. Introduction	1
1.2. Material and methods	2
1.3. Results and discussion	3
2. Introducción y Objetivos	5
3. Antecedentes	7
3.1. Determinismo del sexo	8
3.2. Desarrollo gonadal en mamíferos	10
3.2.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada	10
3.2.2. Regionalización de la gónada indiferenciada	11
3.2.3. Diferenciación testicular	12
3.2.4. Diferenciación ovárica	15
3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual . . .	17
3.3.1. Genes implicados en el desarrollo temprano de la gónada indiferenciada	18
<i>WT1</i>	18
<i>SF1</i>	21
<i>GATA4</i>	24
<i>FOG2</i>	25
Otros genes	26
3.3.2. Genes implicados en la determinación del sexo y la diferenciación gonadal	27

<i>SRY</i>	28
<i>SOX9</i>	30
<i>FGF9</i>	34
<i>AMH</i>	36
<i>DHH</i>	38
<i>PTGDS</i>	40
<i>AR</i>	41
<i>DMRT1</i>	43
<i>DAX1</i>	46
<i>RSPO1</i>	49
<i>WNT4</i>	51
<i>FOXL2</i>	54
<i>FST</i>	57
3.4. Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal	58
3.5. Reversión sexual en mamíferos	62
3.5.1. Factores asociados a casos de reversión sexual y disgenesia gonadal	62
3.5.2. Reversión sexual en la familia <i>Talpidae</i>	64
3.6. Desarrollo gonadal en <i>Talpa occidentalis</i>	65
3.6.1. Desarrollo del testículo	65
3.6.2. Desarrollo del ovoteste	66
4. Material y Métodos	69
4.1. Material analizado	70
4.2. Métodos	72
4.2.1. Obtención del material	72
Captura de topos adultos	72
Obtención de embriones, fetos y crías	72
4.2.2. Determinación del estadio de desarrollo	74
4.2.3. Metodos citológicos e histológicos	76
Determinación del sexo de los embriones	76
Inclusión de material en parafina	76
Fijación.	76

	Deshidratación e inclusión.	77
	Procesado de los bloques y montaje de los cortes. . .	77
	Tinción con hemalumbre de Harris y Eosina. . . .	77
	Inclusión de material en resina	78
4.2.4.	Métodos inmunológicos	79
	Inmunofluorescencia indirecta	79
	Inmunohistoquímica	80
	Elaboración de anticuerpos frente a la proteína WNT4 de <i>Talpa</i>	81
	Obtención de sueros inmunizados.	81
	Test de ELISA	83
4.2.5.	Métodos de análisis molecular	84
	Extracción de DNA genómico	84
	Extracción de RNA total	85
	Tratamiento con DNAsa	86
	Reacción de reverso transcripción	87
	Diseño de primers para PCR y RT-Q-PCR	87
	Amplificación mediante PCR	89
	PCR cuantitativa en tiempo real (RT-Q-PCR)	89
	Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos	90
	Clonación de fragmentos de DNA	91
	Introducción del fragmento de DNA en vector. . . .	91
	Preparación de bacterias competentes.	92
	Transformación de bacterias competentes.	93
	Obtención de DNA plasmídico.	93
	Análisis de los transformantes positivos.	94
	Secuenciación de DNA	94
	Hibridación <i>in situ</i>	95
	Preparación de la ribosonda.	95
	Digestión.	95
	Purificación de la reacción de digestión.	95
	Transcripción <i>in vitro</i>	96
	Hibridación <i>in situ</i>	97
4.2.6.	Cultivo de órganos	99
	Preparación de gel de agar.	99
	Elaboración de cultivos celulares mesonéfricos	101
	Marcaje de células y formación de agregados celulares . .	101
	Cultivos de recombinación	102
	Recuento de células fluorescentes	103
4.2.7.	Perfusión con tinta china	103
4.3.	Preparación de soluciones y medios	103

5. Resultados	113
5.1. Genes implicados en el desarrollo de la gónada indiferenciada . . .	114
5.1.1. <i>WT1</i>	114
5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular	118
5.2.1. <i>SOX9</i>	118
5.2.2. <i>FGF9</i>	121
5.2.3. <i>SF1</i>	124
5.2.4. <i>DHH</i>	126
5.2.5. <i>PTCH1</i>	133
5.2.6. <i>PTGDS</i>	137
5.2.7. <i>AR</i>	142
5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico	146
5.3.1. <i>FOXL2</i>	146
5.3.2. <i>RSPO1</i> , <i>WNT4</i> y <i>FST</i>	159
5.3.3. Genes de referencia RT-Q-PCR: <i>18S</i> , <i>GAPDH</i> , <i>GPI</i> . . .	171
5.4. Caracterización de las células de Leydig en <i>Talpa occidentalis</i> . .	174
5.5. Diferenciación de células mioides peritubulares	175
5.5.1. Expresión de DES	175
5.5.2. Expresión de α -SMA	181
5.6. Desarrollo vascular en la gónada	185
5.6.1. Descripción morfológica	185
5.6.2. Expresión de α -SMA	186
5.6.3. Expresión de CAV1	190
5.6.4. Visualización <i>whole-mount</i> de la gónada	196
5.7. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano	200
6. Discusión	203
6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular	204
6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico	215
6.3. Diferenciación de células mioides peritubulares	223
6.4. Formación de la vasculatura	224
6.5. Migración celular hacia la gónada desde el mesonefros	227
7. Conclusiones	229
7.1. Conclusiones	230
7.2. Conclusions	231
Bibliografía	235

Índice de figuras

3.1. Esquema de la determinación y diferenciación sexual	59
4.1. Molde para la elaboración de discos de agar.	100
4.2. Disco de agar.	100
5.1. Detección de WT1 en gónadas pre-natales (s4c-s6) de <i>T. occi-</i> <i>dentalis</i>	114
5.2. Detección de WT1 en gónadas pre- y post-natales (s7-s9) de <i>T.</i> <i>occidentalis</i>	116
5.3. Detección de WT1 en gónadas post-natales (s10-s12) de <i>T.</i> <i>occidentalis</i>	117
5.4. Cuantificación de la expresión de <i>SOX9</i> en gónadas pre- y post- natales de <i>T. occidentalis</i>	118
5.5. Comparación de secuencias del gen <i>SOX9</i> de topo, ratón y humano.	119
5.6. Detección de <i>SOX9</i> en gónadas post-natales de <i>T. occidentalis</i> . .	120
5.7. Cuantificación de la expresión de <i>FGF9</i> en gónadas pre- y post- natales de <i>T. occidentalis</i>	121
5.8. Comparación de secuencias del gen <i>FGF9</i> de topo, ratón y humano.	123
5.9. Detección de SF1 en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i> .	124
5.10. Comparación de secuencias del gen <i>DHH</i> de topo, ratón y humano.	128
5.11. Detección de <i>DHH</i> en gónadas pre-natales de <i>T. occidentalis</i> . . .	128
5.13. Comparación de secuencias del gen <i>DHH</i> de topo, ratón y humano.	131
5.12. Detección de <i>DHH</i> en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occiden-</i> <i>talis</i>	131
5.14. Cuantificación de la expresión de <i>DHH</i> en gónadas pre- y post- natales de <i>T. occidentalis</i>	132

5.15. Comparación de secuencias del gen <i>PTCH1</i> de topo, ratón y humano.	135
5.16. Cuantificación de la expresión de <i>PTCH1</i> en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i>	136
5.17. Detección de PTGDS en gónadas pre-natales (s4c-s5c) de <i>T. occidentalis</i>	138
5.18. Detección de PTGDS en gónadas pre-natales (s6-s8) de <i>T. occidentalis</i>	139
5.19. Detección de PTGDS en gónadas post-natales (s9) de <i>T. occidentalis</i>	140
5.20. Detección de PTGDS en gónadas post-natales (s10-s11) de <i>T. occidentalis</i>	141
5.21. Detección de AR en gónadas pre-natales (s4c-s5c) de <i>T. occidentalis</i>	142
5.22. Detección de AR en gónadas pre- y post-natales (s6-s9) de <i>T. occidentalis</i>	144
5.23. Detección de AR en gónadas post-natales (s10-s12) de <i>T. occidentalis</i>	145
5.24. Detección de FOXL2 en gónadas pre-natales (s4c-s6) de <i>T. occidentalis</i> y <i>M. musculus</i>	146
5.25. Detección de FOXL2 en gónadas pre-natales (s7-s8) de <i>T. occidentalis</i>	148
5.26. Detección de FOXL2 en gónadas post-natales (s9-s10) de <i>T. occidentalis</i>	150
5.27. Detección de FOXL2 en gónadas post-natales (s11-s12) de <i>T. occidentalis</i>	151
5.28. Detección de FOXL2 en gónadas post-natales (s13-s14) de <i>T. occidentalis</i>	152
5.29. Detección de FOXL2 en gónadas juveniles de <i>T. occidentalis</i>	153
5.30. Recuento de células FOXL2 positivas en la región cortical de la gónada XX de <i>T. occidentalis</i>	153
5.31. Detección de WT1 y FOXL2 en gónadas de <i>T. occidentalis</i> y <i>M. musculus</i>	154
5.32. Proyecciones celulares de los cordones corticales hacia la región medular en la gónada XX de <i>T. occidentalis</i>	156
5.33. Comparación de secuencias del gen <i>FOXL2</i> de topo, ratón y humano	157

5.34. Cuantificación de la expresión de <i>FOXL2</i> en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i>	158
5.35. Detección de WNT4 y FST en gónadas pre-natales (s4c-s6) de <i>T. occidentalis</i>	160
5.36. Detección de WNT4 y FST en gónadas pre- y post-natales (s7-s11) de <i>T. occidentalis</i>	161
5.37. Identificación de las diferentes poblaciones de células somáticas que expresan marcadores ováricos en la región cortical de la gónada XX de <i>T. occidentalis</i>	162
5.38. Comparación de secuencias del gen <i>RSPO1</i> de topo, ratón y humano	165
5.39. Comparación de secuencias del gen <i>WNT4</i> de topo, ratón y humano	166
5.40. Comparación de secuencias del gen <i>FST</i> de topo, ratón y humano	167
5.41. Cuantificación de la expresión de <i>RSPO1</i> en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i>	168
5.42. Cuantificación de la expresión de <i>WNT4</i> en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i>	169
5.43. Cuantificación de la expresión de <i>FST</i> en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i>	170
5.44. Comparación de secuencias del gen <i>18S</i> de topo, ratón y humano	172
5.45. Comparación de secuencias del gen <i>GAPDH</i> de topo, ratón y humano	172
5.46. Comparación de secuencias del gen <i>GPI</i> de topo, ratón y humano	173
5.47. Caracterización de las células de Leydig en gónadas juveniles de <i>T. occidentalis</i>	174
5.48. Detección de DES en gónadas pre-natales (s5b-s5c) de <i>T. occidentalis</i>	176
5.49. Detección de DES en gónadas pre-natales (s6-s8) de <i>T. occidentalis</i> .	177
5.50. Detección de DES en gónadas post-natales (s9-s10) de <i>T. occidentalis</i>	178
5.51. Detección de DES en gónadas post-natales (s11-s12) de <i>T. occidentalis</i>	179
5.52. Detección de DES en gónadas post-natales (s13-s14) de <i>T. occidentalis</i>	180
5.53. Detección de α -SMA en gónadas pre-natales (s5b-s6) de <i>T. occidentalis</i>	182

5.54. Detección de α -SMA en gónadas pre- y post-natales (s7-s9) de <i>T. occidentalis</i>	183
5.55. Detección de α -SMA en gónadas post-natales (s10-s12) de <i>T. occidentalis</i>	184
5.56. Desarrollo de la vasculatura en gónadas XY de <i>T. occidentalis</i>	188
5.57. Desarrollo de la vasculatura en gónadas XX de <i>T. occidentalis</i>	189
5.58. Detección de CAV1 en gónadas pre-natales de <i>T. occidentalis</i>	191
5.59. Detección de CAV1 en gónadas postnatales de <i>T. occidentalis</i>	192
5.60. Detección de CAV1 en gónadas pre-natales de <i>M. musculus</i>	193
5.61. Detección de WT1 y CAV1 en gónadas pre- y post-natales de <i>T. occidentalis</i> y <i>M. musculus</i>	194
5.62. Visualización de la vasculatura en gónadas pre-natales de <i>M. musculus</i>	196
5.63. Visualización de la vasculatura en gónadas post-natales de <i>M. musculus</i>	197
5.64. Visualización de la vasculatura en gónadas post-natales de <i>T. occidentalis</i>	198
5.65. Migración de células mesonéfricas al interior de gónadas pre-natales de <i>T. occidentalis</i> y <i>M. musculus</i>	201

Índice de cuadros

3.1. Eventos en el desarrollo del tejido testicular de <i>T. occidentalis</i> . . .	68
4.1. Material analizado.	71
4.2. Estadios de desarrollo de <i>T. occidentalis</i>	75
4.3. Anticuerpos primarios utilizados	82
4.4. Anticuerpos secundarios utilizados	82
4.5. Cebadores utilizados	88

Abreviaturas

- Ad4BP** Adrenal 4-binding protein (proteína 4 de unión adrenal).
- AF1** Activation function 1 (función de activación 1).
- A-GSU** Glycoprotein subunit a (subunidad a de la hormona glicoproteína).
- AHC** X-linked adrenal hypoplasia congenita (hipoplasia adrenal congénita ligada al X, OMIM#300200).
- α SMA** Alpha smooth muscle actin (actina α de músculo liso).
- AMH** Antimullerian hormone (hormona antimulleriana).
- AMPc** Adenosinmonofosfato cíclico.
- AMV-RT** Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar).
- AP1** Activator protein 1 (proteína activadora 1)
- AR** Androgen receptor (Receptor de andrógenos).
- AREs** Androgen response elements (elementos de respuesta androgénica).
- ARX** Aristaless-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).

β CAT β Catenin (β Catenina).

CBLN4 Cerebellin 4 precursor (precursor de la cerebelina 4).

CD Campomelic displasia (displasia campomélica, OMIM#114290).

CH25H Cholesterol 25 hydroxylase (hidroxilasa de colesterol 25).

ChIP CHromatin immunoprecipitation (immunoprecipitación de cromatina).

CK19 Cytokeratin 19 (citokeratina 19).

CLA Células de Leydig adultas.

CLF Células de Leydig fetales.

CMDP1 Campomelic displasia gene 1 (locus 1 de la displasia campomélica).

COL2A1 Collagen gene 2A1 (gen de colágeno 2A1).

COX2 Cyclooxygenase 2 (ciclooxigenasa 2).

CRL Crown-rump length (longitud corona-grupa).

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).

CYP19A1 Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1.

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).

ddNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfato.

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

DES Desmin (desmina).

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).

dNTPs Ribonucleótidos trifosfato.

DO Densidad óptica.

dpc Días post-coito.

dpo Días post-ovulación.

dpp Días post-parto.

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

DSX Doublesex protein (proteína de sexo doble).

DTT 1,4-ditio-DL-treitol.

EGR1 Early growth response protein 1 (proteína de respuesta al crecimiento rápido 1)

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).

FU Furine (furina).

FZ Frizzled.

GFP Green fluorescent protein (proteína fluorescente verde).

GLI1 Glioma-associated oncogene homolog 1 (homólogo del oncogen asociado a glioma 1).

GNRH Gonadotropin-releasing hormone (hormona liberadora de gonadotropina).

GSD Genetic sex determination (determinación sexual genética).

γ **H2AX** 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).

HH Hedgehog (erizo)

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

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

HSP65 Heat shock protein 65 (proteína de choque de calor 65).

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).

IHH Indian hedgehog (erizo indio).

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

IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

IR Insulin receptor (receptor de la insulina).

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

JNK c-Jun N-terminal kinase (kinasa c-Jun N-terminal).

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

KRAB Kruppel associated box (caja asociada a Kruppel).

KTS Lisina-treonina-serina.

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

LB Luria-Bertoni.

LH Luteinizing hormone (hormona luteinizante).

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

LRP5 Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 5).

LRP6 Low-density lipoprotein receptor-related protein 6 (proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 6).

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).

MNSOD Mitochondrial superoxido dismutase (superóxido dismutasa mitocondrial).

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).

NR5A2 Nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 2 gene (receptor nuclear 2 del grupo A de la subfamilia 5).

NTD N-terminal domain (dominio N-terminal).

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).

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).

pDK3 DK3 promotor (promotor DK3).

pFOXL2 FOXL2 promotor (promotor de FOXL2).

PGCs Primordial germ cells (células germinales primordiales).

PGD₂ Prostaglandina D₂.

PKA Protein kinase A (proteína kinasa A).

PKC Protein kinase C (proteína kinasa C).

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

POD1 Podocyte protein 1 (proteína 1 del podocito).

PPARGC1A Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (coactivador 1-alpha del receptor gamma activado por el inductor de la proliferación de peroxisoma).

PPARG Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (receptor gamma activado por el inductor de la proliferación de peroxisoma).

PTCH Patched homolog (homólogo de patched).

PTCH1 Patched homolog 1 (homólogo de patched 1).

PTGDS Prostaglandin D2 synthase (sintasa de la Prostaglandina D2).

RA Retinoic acid (ácido retinoico).

RNAi RNA interference (interferencia de RNA).

RSPO1 R-spondin 1 (espondina R1).

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

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

SF1 Steroidogenic factor 1 (factor esteroidogénico 1).

SHH Sonic hedgehog (erizo sónico).

SMAD3 Mothers against decapentaplegic homolog 3 (homólogo del gen madres contra la decapentapleja 3).

SMO Smoothened.

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).

SP Signaling peptide (péptido de señalización).

SP1 Specific protein 1 (proteína específica 1).

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

STAR Steroidogenic acute regulatory protein (proteína reguladora aguda esteroidogénica).

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

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

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.

TES Testis-specific enhancer of Sox9 (activador específico de testículo de Sox9).

TSD Temperature sex determination (determinación sexual por temperatura).

TSP1 Trombospondin (trombospondina).

VNN1 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*).

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

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

1. Abstract

1.1. Introduction

Gonadal development is a biological process of huge complexity. The bipotentiality of this organ allows it to develop either as a testis or as an ovary according to strict mechanisms of genetic control that take place during sexual determination and differentiation.

Two stages can be considered in mammalian sexual differentiation: At first, the undifferentiated gonad starts to develop according to a sexual pathway that depends on the presence or absence of *SRY*, a key gene involved in sexual determination. The expression of *SRY* triggers the testicular pathway (Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991), upregulating some male-specific genes including *SF1*, *SOX9*, *FGF9* or *AMH* and down-regulating other ovarian markers such as *WNT4*, *FST* or *RSPO1*. The absence of *SRY* in XX individuals leads to the triggering of the ovarian pathway some time later. In a second stage, secondary sexual features arise as a consequence of the hormones produced by the gonad, leading to a male phenotype in the presence of testosterone, or a female phenotype when absent (Jost, 1947).

Regarding the timing of events, in mice the gonad arises from the mesonephros at 9.5 days post coitum (dpc), and at 10.5 dpc somatic cells of the XY gonad express *Sry*, becoming pre-Sertoli cells (Hacker *et al.*, 1995) and triggering the male pathway. These pre-Sertoli cells start to express *Sox9* at 11.5 dpc, and differentiate as Sertoli cells, a cellular type that is responsible of the further development of the testis (Schmahl *et al.*, 2000). Then, mesonephric cells migrate into the gonad and endothelial cells, contributing to the formation of a dense vascular network, becomes the main portion of these migrating cells (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008; Cool *et al.*, 2008; Combes *et al.*, 2009). The migration is essential for a correct formation of testis cords at 12.5 dpc (Tilmann and Capel, 1999; Schmahl and Capel, 2003). At this stage, Sertoli cells start to produce AMH, which originates the regression of Müllerian ducts (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991). Between 12.5 and 13.5 dpc myoid peritubular cell (Tung and Fritz, 1987) and Leydig cells, that produce testosterone, differentiate. This hormone leads to the masculinization of the embryo and gives rise to the Wolffian ducts (Habert *et al.*, 2001).

If *Sry* is not expressed, ovarian development takes place, allowing the expression of some specific ovarian genes such as *Foxl2*, *Rspo1* or *Wnt4*,

1. Abstract

among others. While in most mammals sexual cords are visible, they are not morphologically visible in the mouse although a functional regionalization of the gonad still exist, differentiating a cortical and a medullar region. At 13.5 dpc, meiosis onset takes place being the origin of the remaining processes of the ovarian differentiation (Yao *et al.*, 2003).

XX individuals of the genus *Talpa* are an exception among mammals because they develop ovotestes instead of normal ovaries, without disturbing their reproductive capacity (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991; Jiménez *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1996). The development of these ovotestes takes place in absence of *SRY* suggesting that other downstream gene/s can be responsible for this anomalous development. These ovotestes show two clearly differentiated regions: an ovarian (cortical) and a testicular (medullary) dysgenetic portion that lacks germ cells but undergoes some testicular-specific processes including cellular migration from the mesonephros, formation of a testis-like vascular system, differentiation of myoid peritubular and Leydig cells and production of high levels of testosterone (Barrionuevo *et al.*, 2004b). Furthermore, the ovarian development of the cortical region is considerably delayed to the point that meiosis start after birth (Zurita *et al.*, 2007). During prenatal stages, this portion remains quiescent, being the most remarkable event the formation of sex cortical cords (s6-7) (Barrionuevo *et al.*, 2004b). Ovotestes have also been described in other species belonging to the genus *Talpa* as *T. stankovici*, *T. europaea* and *T. romana* (Popoff, 1911; Mathews, 1935; Jiménez *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1996), the desman *Galemys pyrenaicus* (Peyre, 1962), the star-nose mole *Condylura cristata* (Mossman and Duke, 1973; Rubenstein *et al.*, 2003), the american shrew mole (Rubenstein *et al.*, 2003) and the japanese mole *Mogera wogura* (Carmona *et al.*, 2008).

1.2. Material and methods

A total number of 172 embryos, foetuses, newborns and adult individuals of the mole specie *Talpa occidentalis* were analyzed for this study. Embryos and foetuses were obtained from wild pregnant females and were sexed by the observation of sex chromatin when necessary. Newborns were obtained from mole nests an adults were captured using traps, especially designed in our lab, that ensure that the specimens do not suffer any kind of harm. In the laboratory, individuals were dissected and their gonads extracted for further analysis. One of the gonads was processed for RT-Q-PCR studies and the other one for paraffin or epoxy resin embedding for further haematoxylin-eosin staining, *in situ* hybridization for detection of mRNA and indirect immunofluorescence and immunohistochemistry for protein detection. Commercial antibodies are available for most of the proteins produced by genes involved in sex determination. However, none of the commercially tested antibodies against WNT4 demonstrated immunoreactivity against the mole protein. Thus, we developed our own antibody against this protein by cloning a fragment of the *WNT4* mole gene and using

specific software for searching potential antigenic regions (Rice *et al.*, 2000). Mole-specific WNT4 peptides were synthesized and used for the immunization of rabbits in order to obtain a mole-specific antibody.

Primers were designed for RT-Q-PCR for each of the genes in this study. We used consensus sequences obtained by alignment of sequences of related species as template for the searching of primer with the program "primer3" from the EMBOSS package. Each primer pair was tested for efficiency and only those pairs with efficiencies near 100 % were selected. The PCR products were confirmed by sequencing. For normalization of the quantitative PCR reactions, we used three housekeeping genes, *GAPDH*, *GPI* and *18S*.

Several mouse and mole gonads coming from early stages of development were used to perform organ culture experiments. These gonads were cultured for two days in a CO₂ incubator and attached to an aggregate of mouse fluorescent-labeled mesonephric cells to check if migration from the mesonephros was occurring during early XX gonadal development. After two days of culture, gonads were fixed and processed for confocal microscopy imaging.

Mouse and mole embryos and newborns were perfused with indian ink by injection in the extra-embryonic vitellin vein in the case of embryos and by post-mortem perfusion in newborns, in order to investigate the vasculogenesis process. After perfusing the contrast medium in the vascular system, gonads were dissected and cleared using a mixture of benzyl benzoate/benzyl alcohol and photographed using a camera attached to a stereo-microscope.

1.3. Results and discussion

Several male-specific genes were studied in XY and XX gonads. We checked whether the expression pattern of these genes is conserved in males and whether some of these genes could be responsible for the male-specific characteristics that appear in the medullary region of the ovotestis. The expression patterns of *SF1*, *SOX9*, *FGF9*, *DHH*, *PTCH1* and *PTGDS* are consistent with the data in other mammals. However the time span of prenatal mole development, compared to mouse, gives rise to some interesting conclusions. In the XY gonad, as described previously, Sertoli cells differentiate very early (s4), three days before testis cords are formed (Carmona *et al.*, 2009a), which is consistent with the fact that sertollian markers as *SF1*, *SOX9* or *FGF9* are present at this stage. It seems that the positive feedback of *SOX9/FGF9* is established very early but 3 days after (s5b) *FGF9* is downregulated, suggesting that this loop is not taking place anymore. At this stage, *PTGDS* is upregulated which leads us to the hypothesis that the *SOX9/FGF9* loop takes place at first but it is later substituted by the *SOX9/PTGDS* loop to keep *SOX9* upregulated. *SOX9* expression levels are increasing over development, reaching maximum levels at s12, when testosterone levels are decreasing pointing the end of the infantile development. At s5b, *DHH* is expressed in the male gonad suggesting a role in testis cord formation together

1. Abstract

with *PTGDS*, *SOX9*, *DHH*, *PTGDS* and *FGF9* do not seem to be involved in the development of the testicular portion of the XX gonad, being SF1 the only sertolian marker that is expressed in the cords of the medullary region of the ovotestis. This gene switch its expression from Sertoli to Leydig cells at s9-10, when Leydig cells differentiation takes place. It is thus downregulated in Sertoli and upregulated in Leydig cells. It is noteworthy that Leydig cells present in the medullary region are always fetal-type, being adult-type never observed. This is consistent with the phenotype of *Dhh*^{-/-} XY mice where adult individuals only show fetal-type Leydig cells (Clark *et al.*, 2000; Pierucci-Alves *et al.*, 2001). As fetal-type Leydig cells differentiate successfully in the mole, *DHH* is not likely involved in this process.

We also studied ovarian markers such as *FOXL2*, *RSPO1*, *WNT4* and *FST* during gonad organogenesis. As expected, these markers show very low levels of expression during the development the XY gonad. In the medullary region of the XX gonad, *FOXL2* is expressed in somatic cells and low-medium levels *RSPO1*, *WNT4* and *FST* can also be detected. Nevertheless, it seems that the expression of these genes is not sufficient to inhibit the testicular developmental processes taking place in this region. In the cortical region, high levels of *RSPO1*, *WNT4* and *FST* are detected after birth at the time of meiosis onset, decreasing slowly after this event. The expression of *FOXL2*, a gene essential for folliculogenesis as it is expressed by pre-follicular cells (Schmidt *et al.*, 2004b), allowed us to distinguish two different types of somatic cells in this region: the *FOXL2* positive mesenchymal population located at the interstitium between cortical cords, and the *FOXL2* negative epithelial population inside the cords that are in direct contact with the germ cells. This mesenchymal population will originate the granulosa cells forming the follicle, in contrast to the classical assumptions about gonadal development in mammals that form sex cords. This population is also different from the one expressing *WNT4* and *FST*, located inside the cords.

Some others features of the XX gonad have been investigated. Thus, the expression pattern of DES and α -SMA revealed that myoid peritubular cells differentiation occurs postnatally (s11) some days after it takes place in males (s9). The differentiation of the *tunica albuginea* is also delayed (s9) compared to males (s6). Semi-thin sections, *in toto* perfusion of gonads and the expression pattern of CAV-1 (a marker for endothelial cells) revealed that, while the cortical portion of the ovotestes has a ovarian-type vasculature, the medullary region develops a profuse vasculature as observed in males, and an analog structure of the coelomic vessel, typical of the XY gonad, is also observed. This vascular development starts, however, after birth. Finally, experiments of organ culture revealed that mesonephric cells migration takes place in the female gonad of the mole during early prenatal stages, but it is not as profuse as it is observed in the XY gonad.

2. Introducción y Objetivos

El desarrollo de la gónada es un proceso biológico de enorme complejidad. La naturaleza única de éste órgano radica en su bipotencialidad, siendo capaz de desarrollarse a partir de un primordio gonadal indiferenciado siguiendo dos rutas alternativas: la testicular o la ovárica. Como consecuencia, la gónada está sometida a un estricto control génico tanto en los procesos de determinación como de diferenciación sexual. Históricamente, el estudio de estos procesos ha suscitado un enorme interés dentro de la comunidad científica.

En mamíferos, el proceso de diferenciación sexual abarca dos etapas. En primer lugar, la gónada indiferenciada comienza a desarrollarse siguiendo una de las dos rutas en función de la presencia o ausencia del cromosoma Y en el embrión, es decir, según la dotación cromosómica de éste. En éste cromosoma, esta localizado el gen *SRY*, gen maestro de la determinación sexual, cuya expresión inicia la ruta testicular (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991), activando la expresión de numerosos genes de la ruta masculina como *SF1*, *SOX9*, *FGF9* o *AMH* entre otros e inhibiendo otros de la femenina como *WNT4*, *FST* o *RSPO1*. La ausencia de *SRY* en individuos XX origina que se produzca el desarrollo ovárico poco tiempo después. Durante la segunda etapa tiene lugar el desarrollo de características sexuales secundarias como consecuencia de la producción de hormonas por parte de las gónadas. Este proceso origina un fenotipo masculino o femenino (Jost, 1947).

Los genes implicados en ambas rutas de diferenciación gonadal forman parte de una compleja red, interaccionando entre si y de la cual todavía no se conocen muchos componentes. Las alteraciones en estos genes son capaces originar una desestabilización en los procesos de diferenciación gonadal que pueden dar lugar a alteraciones a nivel del desarrollo de distinto tipo y severidad. Se han descrito casos donde simplemente se observan anomalías leves en los órganos sexuales hasta casos de reversión sexual completa en donde el sexo cromosómico no se corresponde con el fenotipo mostrado.

Los individuos XX del género *Talpa* representan un caso único dentro de los mamíferos, ya que desarrolla ovotestes en lugar de ovarios normales, sin que su capacidad reproductiva se vea comprometida (Jiménez *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1996). Sus gónadas se componen de una porción ovárica y otra de tejido testicular disgenésico. Ésta última carece de células germinales y sufre numerosos procesos de desarrollo testicular que incluyen migración celular desde el mesonefros, formación de un sistema vascular análogo al de la gónada XY,

2. Introducción y Objetivos

diferenciación de células de mioides peritubulares y de Leydig ([Barrionuevo et al., 2004b](#)).

En este proyecto de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo una investigación con objeto de conocer en profundidad los mecanismos moleculares que intervienen en el desarrollo gonadal de *Talpa occidentalis*. Para este fin se ha llevado a cabo un exhaustivo estudio de los patrones de expresión de diversos genes clave en estos procesos durante el desarrollo prenatal y postnatal de la gónada XY y XX de *Talpa*, así como de otros eventos testiculares que tienen lugar en dicho periodo. Los datos obtenidos han permitido conocer en mayor profundidad como tiene lugar el proceso de organogénesis en mamíferos y en la especie *Talpa occidentalis* en concreto.

3. Antecedentes

Contenidos

3.1. Determinismo del sexo	8
3.2. Desarrollo gonadal en mamíferos	10
3.2.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada	10
3.2.2. Regionalización de la gónada indiferenciada	11
3.2.3. Diferenciación testicular	12
3.2.4. Diferenciación ovárica	15
3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual	17
3.3.1. Genes implicados en el desarrollo temprano de la gónada indiferenciada	18
3.3.2. Genes implicados en la determinación del sexo y la diferenciación gonadal	27
3.4. Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal	58
3.5. Reversión sexual en mamíferos	62
3.5.1. Factores asociados a casos de reversión sexual y disgenesia gonadal	62
3.5.2. Reversión sexual en la familia <i>Talpidae</i>	64
3.6. Desarrollo gonadal en <i>Talpa occidentalis</i>	65
3.6.1. Desarrollo del testículo	65
3.6.2. Desarrollo del ovoteste	66

3. Antecedentes

3.1. Determinismo del sexo

El origen y naturaleza de las diferencias entre sexos ha sido una fuente de inquietud para la humanidad desde tiempos ancestrales. El hecho de que la gónada, a diferencia del resto de órganos, pueda desarrollarse como testículo u ovario gracias a su naturaleza bipotencial, sugiere que los mecanismos de control del desarrollo en este órgano son probablemente muy complejos. La activación de la ruta masculina o la femenina determina numerosas modificaciones posteriores en el individuo, tanto a nivel morfológico como fisiológico y comportamental.

Las primeras teorías acerca del determinismo del sexo fueron propuestas por Aristóteles (384 a. C. 322 a. C.), quien sugirió que el sexo se determinaba por el calor de la pasión durante el coito. Cuanto mayor era esta pasión, mayores probabilidades habría de obtener una descendencia masculina. De acuerdo con esta teoría, a diferencia de los hombres, las mujeres serían seres fríos y pasivos, considerándose como hombres mutilados cuyos genitales no se habían desarrollado lo suficiente como para producir semillas activas, debido a que durante el coito, el frío del seno materno habría contrarrestado el calor paterno. Estas teorías aconsejaban mantener relaciones sexuales durante el verano para poder engendrar varones. Para Aristóteles, el semen masculino constituía una sustancia amorfa que al mezclarse con el femenino adquiriría potencia y tomaba forma.

Las teorías de Aristóteles permanecieron vigentes durante mucho tiempo. Incluso en pleno siglo XIX se seguía considerando a la mujer como una productora de huevos que permitían la transmisión de los caracteres paternos. Se propusieron teorías que postulaban que el ambiente tenía un papel relevante en la determinación del sexo, especialmente la nutrición y el calor. Así, factores que favorecían el almacenamiento de energía y de nutrientes darían lugar a la aparición de descendencia femenina, mientras que factores que potenciaran la utilización de esos recursos originarían con mayor probabilidad una descendencia masculina.

Muchas de estas teorías fueron muy populares aunque la mayoría de ellas se desecharon. No obstante, algunas de ellas no eran del todo erróneas, ya que posteriormente se descubrió que, en algunas especies, el sexo viene determinado por variables ambientales como veremos a continuación.

Las teorías cromosómicas de determinación del sexo comenzaron a aparecer a principios del siglo XX gracias al redescubrimiento de los trabajos de Mendel y de los cromosomas sexuales (McClung, 1902). De esta manera, Stevens (1905), estableció que, en insectos, los individuos XX presentaban fenotipo femenino, mientras que los XY o XO se desarrollaban como machos. Esto hizo que se comenzara a creer que algún factor nuclear podía estar controlando el determinismo del sexo, independientemente de las condiciones ambientales.

Actualmente, a pesar de que los sistemas de determinación del sexo son muy variables, éstos pueden ser clasificados en dos grandes grupos: ambientales

3.1. Determinismo del sexo

y genéticos. Los sistemas de determinación ambientales se basan en la presencia de una señal externa que determina el desarrollo sexual del individuo y que se produce en un momento posterior a la fecundación. Estas señales ambientales pueden ser de diversos tipos, presencia o ausencia de ciertas bacterias (Rousset *et al.*, 1992), el pH del medio (Shapiro, 1990), la densidad de población (Crews, 1993) o la temperatura (Crews, 1994). Este tipo de determinación es muy común en diversas especies de reptiles, donde el sexo se determina por la temperatura de incubación de los huevos, como por ejemplo, en la especie de tortuga *Trachemys scripta*, donde temperaturas de incubación superiores a 30°C generan una descendencia femenina en su totalidad, mientras que a 25°C se obtiene una población compuesta de machos. A una temperatura intermedia de 28.5°C, se produce un número similar de machos que de hembras.

Los mecanismos genéticos de determinación sexual se basan en la existencia de diferencias genéticas entre individuos de diferente sexo. En muchas especies de invertebrados, este sistema se basa en la relación entre el número de cromosomas X y de complementos autosómicos, como en *Drosophila melanogaster*, donde el gen maestro *Sxl* se activa si la relación entre autosomas y cromosomas X es igual a 1, generándose una hembra, mientras que si esta relación es de 0,5 se producirá un macho (Bridges, 1925). Algo parecido ocurre en *Caenorhabditis elegans* donde los individuos con un solo cromosoma X se desarrollan como machos, mientras que las hembras y hermafroditas poseen 2 cromosomas X (Madl and Herman, 1979).

Por analogía con los sistemas conocidos en otros organismos, se pensó que el sexo en mamíferos estaría también determinado por la dosis de cromosomas X, independientemente del Y. Según esto, una doble dosis del cromosoma X originaría una hembra y una sola dosis, un macho. Sin embargo, la descripción de una mujer 45 XO, con síndrome de Turner (Ford *et al.*, 1959) demostró que no era necesaria una doble dosis del cromosoma X para el desarrollo femenino. Por otro lado, el descubrimiento de un hombre 47 XXY, con síndrome de Klinefelter (Jacobs and Strong, 1959) puso de manifiesto que se podía producir un desarrollo masculino con una dosis doble de este cromosoma. Estos y otros descubrimientos posteriores indicaron claramente que es el cromosoma Y el que contiene el determinante masculino. En este sistema de cromosomas sexuales heteromórficos XX/XY, se entiende que el sexo heterogamético es el masculino ya que los machos pueden producir dos tipos de gametos (según porten un X o un Y), mientras que las hembras producen solamente un tipo de gametos (portadores de cromosoma X). Existe otro sistema cromosómico de determinación sexual, denominado ZZ/ZW, en el que el sexo heterogamético es el femenino, como ocurre en algunas especies de aves y reptiles. En este caso es la presencia o ausencia del cromosoma W lo que determina un sexo o el otro, siendo machos los individuos ZZ y hembra los ZW (Smith and Sinclair, 2004).

Las diferencias entre ambos sexos no se limitan exclusivamente a la señal que activa una ruta de diferenciación u otra, sino también al modo en que se propaga de esta señal. En *Drosophila*, por ejemplo, los genes de determinación sexual se activan en todas las células del organismo, lo que permite la

3. Antecedentes

formación de individuos ginandromórficos (con partes masculinas y femeninas simultáneamente; [Hodgkin \(1992\)](#)). En mamíferos, sin embargo, la señal se produce únicamente en las células somáticas de las gónadas y éstas dirigen la producción de hormonas que transmitan esta señal al resto del cuerpo.

3.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

La gónada es un órgano excepcional dentro del desarrollo embrionario en mamíferos debido a que es el único que puede seguir dos vías diferentes de desarrollo a partir de un mismo primordio indiferenciado. Este primordio gonadal, presente en individuos de ambos sexos, sigue una de las dos rutas como consecuencia de la expresión o no del gen *SRY* durante el corto periodo de tiempo en que se produce la determinación sexual ([Sinclair *et al.*, 1990](#)). Este gen codifica un factor de transcripción que activa la ruta masculina inhibiendo a su vez la femenina. Una vez que la determinación sexual ha tenido lugar, la producción de andrógenos por parte del testículo dirige el proceso de diferenciación somática masculina, dando lugar a características sexuales secundarias de los machos. La falta de andrógenos en las hembras permite un desarrollo somático sexual típicamente femenino. Determinados defectos en las rutas génicas que controlan estos procesos pueden producir fenotipos incongruentes con el sexo genético del individuo.

A continuación se describirá en profundidad el desarrollo de la gónada en mamíferos desde la formación del primordio gonadal, hasta que se diferencia en testículo u ovario. El proceso de organogénesis testicular está, en general, bastante bien conservado en mamíferos, por lo que para describirlo se tomará como modelo el ratón. Sin embargo, el proceso de diferenciación ovárica muestra gran variabilidad entre especies ([Jiménez, 2009](#)) por lo que se utilizará como modelo para su descripción tanto ratón como humano.

3.2.1. Establecimiento de la gónada indiferenciada

El sistema genitourinario de los mamíferos se forma a partir del mesodermo intermedio y se divide en pronefros, localizado en la parte anterior y que degenera durante el desarrollo embrionario, el mesonefros que realiza las funciones renales durante el desarrollo embrionario, y el metanefros que se sitúa en la parte posterior y que originará el riñón definitivo. Estas tres estructuras se desarrollan en el eje antero-posterior, a lo largo del conducto de Wolff o conducto néfrico. Además, dentro del mesonefros se forma otro conducto llamado “paramesonefrico” o “de Muller”. El mesonefros ocupa gran parte del volumen abdominal del embrión y sobre él se forma la “cresta genital” como un engrosamiento de su superficie ventral ([Merchant-Larios and Taketo, 1991](#)). Este evento tiene lugar a los 9.5 días post-coitum (dpc) en ratón, y en torno a la cuarta semana de gestación en humanos. Este engrosamiento

3.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

ocurre por una proliferación tanto del componente somático de la gónada (células mesoteliales, mesenquimáticas y endoteliales) procedentes del epitelio celómico, como de las células germinales primordiales (PGC), que proceden del mesodermo extraembrionario de donde migran al saco vitelino adyacente a través del alantoides, dirigiéndose desde aquí hacia las crestas genitales a través del primordio intestinal y el mesenterio dorsal (McLaren, 2003).

Tras la colonización de las gónadas por las PGCs, se produce una gran proliferación de células somáticas, especialmente del tipo mesotelial y mesenquimático, como consecuencia de la cual las células del primordio gonadal quedan empaquetadas estrechamente entre el epitelio celómico y el mesénquima mesonéfrico. Se forman cordones gonadales, también denominados cordones sexuales, que contienen células somáticas de tipo epitelial y PGCs. El resto de la gónada queda formado por el estroma, que contiene células de tipo mesenquimático y vasos sanguíneos en desarrollo (Merchant-Larios and Taketo, 1991). Estos vasos sanguíneos se proyectan desde el mesonefros y forman un sistema vascular primitivo en el primordio gonadal indiferenciado. Tras la diferenciación sexual, que tiene lugar en ratones 12.5 dpc, esta red vascular se hace más profusa en los testículos de los machos gracias a la migración de células endoteliales desde el mesonefros adyacente. En los ovarios en desarrollo se produce simplemente un proceso de remodelado de su red vascular.

En la gónada indiferenciada encontramos diferentes tipos celulares que presentan una naturaleza bipotencial y que evolucionarán de manera diferente según el ambiente gonadal (masculino o femenino) en el que se desarrollen. Entre los tipos celulares principales están: 1) la línea germinal, que puede iniciar tanto la ruta espermatogénica como la oogénica, 2) la línea de sostén, que origina las células de Sertoli en el macho y las células foliculares en la hembra y que rodea a las células germinales dentro de los cordones sexuales proporcionándoles un ambiente adecuado para su desarrollo posterior, y 3) la línea esteroidogénica, responsable de la producción de hormonas esteroideas, que dará lugar a las células de Leydig en machos y células de las tecas en hembras. Otros tipos celulares presentes en la gónada, como las células endoteliales que originarán la red vascular del órgano, se identifican tanto en ovario como en testículo.

3.2.2. Regionalización de la gónada indiferenciada

Durante el desarrollo gonadal se produce una regionalización del primordio gonadal, estableciéndose una región cortical y otra medular, lo que ocurre en diferentes taxones (Merchant-Larios *et al.*, 1997; DeFalco and Capel, 2009). Sin embargo siempre ha habido una cierta controversia acerca del origen y de cómo evolucionan cada una de estas dos regiones a lo largo del desarrollo de la gónada.

Waldeyer (1870) sugirió que la región cortical procedía de una proliferación del epitelio celómico, mientras que la médula tenía un origen mesonéfrico. Sin embargo, unos años más tarde, Janosik (1885) postuló que ambos provenían del epitelio celómico, siendo la médula el producto de una primera oleada de

3. Antecedentes

proliferación celular y el córtex el producto de una segunda oleada proliferativa. De acuerdo con esta hipótesis, sugirió que en machos, únicamente ocurre esta primera proliferación, dando lugar a los cordones medulares, y en hembras ocurre además una segunda proliferación que origina los cordones corticales u ovígeros. Otra hipótesis alternativa fue la propuesta por [Winiwarter and Sainmont \(1909\)](#) que sugirieron que el epitelio celómico llegaba a proliferar hasta tres veces, formándose el córtex en la tercera de éstas.

Con el tiempo se aceptó que la corteza gonadal provenía del epitelio celómico. Más tarde se corroboró mediante experimentos de trazado celular con DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) que las células de Sertoli y las foliculares provenían del epitelio celómico ([Karl and Capel, 1998](#)), y que estas células comparten un precursor común ([Albrecht and Eicher, 2001](#)). Esto no hizo sino corroborar la hipótesis de [Janosik \(1885\)](#), donde se apuntaba que el tejido medular de la gónada provenía de una primera oleada proliferativa, mientras que la segunda originaba la corteza.

Sin embargo, se sabe que el mesonefros tiene una importante contribución en la formación de la gónada, ya que suministra células endoteliales que migran durante el periodo de diferenciación testicular, originando la vasculatura específica de este órgano ([Coveney et al., 2008](#)). Por tanto, la idea de que la médula proviene del mesonefros no es del todo errónea ya que el testículo contiene una proporción de células procedentes del mesonefros, que no se encuentran en el ovario ([Jiménez, 2009](#)).

La regionalización no se limita únicamente a una diferenciación morfológica de ambos tejidos. Estudios recientes han demostrado que algunos días antes de que sea morfológicamente observable, existe una clara diferencia a nivel de expresión génica ([Yao et al., 2004](#); [Coveney et al., 2008](#); [Carmona et al., 2009a,b](#)). Se ha sugerido que esta regionalización funcional es producto de una señalización por parte del epitelio celómico ([Jiménez, 2009](#)), aunque las verdaderas causas son aún desconocidas.

3.2.3. Diferenciación testicular

Durante la diferenciación testicular tienen lugar diversos procesos biológicos en la gónada en formación que se encuentran bastante conservados entre los mamíferos. A continuación se procede a enumerarlos y describirlos:

Migración celular. Desde el mesonefros adyacente se produce una migración de células hacia el interior de la gónada. En ratón, este proceso comienza alrededor de 11.5 dpc y afecta principalmente a células de tipo endotelial que contribuyen a formar una densa red vascular que irrigará todo el órgano ([Brennan et al., 2002](#); [Coveney et al., 2008](#); [Cool et al., 2008](#); [Combes et al., 2009](#)). Esta migración desde el mesonefros es esencial para la correcta formación de los cordones testiculares, que son agregados de

3.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

células de Sertoli y células germinales rodeados de una lámina basal, (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993; Tilmann and Capel, 1999). Experimentos de bloqueo de esta migración utilizando membranas permeables revelan que su ausencia no afecta a la diferenciación de las células de Sertoli ni al proceso de determinación sexual, aunque sí a la formación de los cordones. También se produce una disrupción del patrón de vascularización, lo que sugiere que la población migrante está formada, en su mayoría, por células endoteliales, aunque no se descarta que no sea el único tipo celular (Martineau *et al.*, 1997; Cool *et al.*, 2008; Combes *et al.*, 2009).

Vasculogénesis. Como hemos dicho anteriormente, la formación de la vasculatura es similar en individuos XY y XX hasta que llega el momento de la diferenciación sexual. Ésta se encuentra formada por un sistema vascular primitivo, derivado de vasos mesonéfricos que se extienden hacia el interior de la gónada. A partir de 11.5 dpc, se produce la migración de células endoteliales procedentes de la ruptura de vasos mesonéfricos, que colonizan la gónada XY originando una densa red vascular que ocupa los espacios entre cordones testiculares y forman un gran vaso celómico en el dominio externo de la gónada (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008; Cool *et al.*, 2008; Combes *et al.*, 2009). La presencia del este vaso celómico es un claro indicador morfológico de que se está llevando a cabo la diferenciación testicular. Cuando, posteriormente, se diferencian las células de Leydig, las cuales comienzan a producir andrógenos, éstos se exportan hacia todo el embrión gracias a la red vascular de la gónada, produciendo así la masculinización del mismo.

Diferenciación de células de Sertoli y formación de cordones. Al mismo tiempo que ocurren los procesos de migración, hay una intensa proliferación de las células del epitelio celómico, diferenciándose en células de Sertoli, probablemente el tipo celular más importante dentro del desarrollo testicular (Schmahl *et al.*, 2000). Estas células rodean agregados de células germinales dando lugar a la formación de los cordones sexuales. Las células de Sertoli se disponen en la periferia de los mismos, sirviendo como elemento de sostén. La proliferación celular y la migración desde el mesonefros son procesos indispensables para la formación de los cordones y la diferenciación de las células de Sertoli (Tilmann and Capel, 1999; Schmahl and Capel, 2003). Los cordones penetran en la región medular de la gónada, se anastomosan y se separan del epitelio celómico por medio de la túnica albugínea, una gruesa capa de tejido conectivo que contiene abundante matriz extracelular, y forman los denominados cordones testiculares (Merchant-Larios and Taketo, 1991). Las células de Sertoli también tienen una naturaleza secretora, y en torno a 12.5 dpc producen hormona antimülleriana (AMH), que inhibe el desarrollo de los conductos de Müller, que son precursores de los órganos sexuales accesorios de la hembra (oviducto, útero y parte superior de la vagina; ver Munsterberg

3. Antecedentes

and Lovell-Badge (1991)).

Diferenciación de células mioides peritubulares. Alrededor de 12.5 dpc, tras la diferenciación de las células de Sertoli, se produce la de otro tipo celular, las células mioides peritubulares (Tung and Fritz, 1987). Se encuentran en el intersticio y encapsulan a los cordones testiculares formando una monocapa que adquiere posteriormente capacidad contráctil, de modo que ayuda a la movilización del espermatozoides a través de los túbulos seminíferos en el testículo adulto. Cooperan con las células de Sertoli para la deposición de la lámina basal, que envuelve los cordones testiculares. Además se ha demostrado que toman parte en la regulación paracrina de las funciones del epitelio seminífero (Tung and Fritz, 1986), como células secretoras respondiendo al estímulo de la testosterona. Este tipo celular no tiene ningún equivalente en ovario, como ocurre con las demás poblaciones de células gonadales.

Diferenciación de células de Leydig. A partir de una población de células intersticiales se produce la diferenciación, entre 12.5 y 13.5 dpc, de las células de Leydig. Éstas son denominadas células de Leydig de tipo fetal (CLF) y se presume que tienen un origen doble ya que al menos una parte de ellas provienen de células que migran a la gónada desde el mesonefros; el resto proceden de la diferenciación de células gonadales (Jeays-Ward *et al.*, 2003). Las células de Leydig producen testosterona, hormona que estimula el desarrollo de los conductos de Wolff, precursores de los conductos eferentes, las vesículas seminales y el epidídimo. Se encuentran formando agregados y frecuentemente cerca de la vasculatura, donde secretan la testosterona. En la pubertad, la población de células de Leydig se renueva ya que las células embrionarias son sustituidas por las llamadas células de Leydig de tipo adulto (CLA). Éstas son responsables del comienzo de la espermatogénesis y del desarrollo de las características sexuales secundarias (Habert *et al.*, 2001).

Formación de la túnica albugínea. La tunica albugínea es el componente mayoritario de la cápsula de los testículos de mamíferos. Esta compuesta principalmente de fibroblastos y fibras de colágeno entrelazadas y contiene células contráctiles (Setchell BP, 1994; Middendorff *et al.*, 2002). Parece implicada en procesos de exportación del espermatozoides al epidídimo, mantenimiento de la presión intratesticular y control del flujo sanguíneo testicular (Setchell BP, 1994). En ratón, su desarrollo comienza en 12.5 dpc, una vez organizados los cordones testiculares (Karl and Capel, 1998). El proceso de formación conlleva la producción de fibras de colágeno y la diferenciación de células formando la membrana basal bajo el epitelio celómico.

Arresto mitótico de las células germinales. Como hemos dicho anteriormente, las PGCs migran desde la base del alantoides a la gónada indiferenciada. Al mismo tiempo, estas células comienzan a dividirse masivamente

3.2. Desarrollo gonadal en mamíferos

(Wylie and Heasman, 1993). Independientemente de su sexo cromosómico, se diferencian y cambian sus características de acuerdo con su entorno celular (Adams and McLaren, 2002). Alrededor de 13.5 dpc, las células se disponen en la periferia de los cordones y dejan de dividirse, entrando en arresto mitótico, hasta después del nacimiento. Más tarde, muchas células germinales y espermatogonias sufrirán apoptosis y solamente una pequeña porción de ellas completarán con éxito su diferenciación hasta gametos (Allan *et al.*, 1987). Las razones de esta apoptosis no se conocen exactamente, aunque se han propuesto diversas hipótesis, como la existencia de un control de la calidad cromosómica, de manera que células con mutaciones cromosómicas son eliminadas, o que un exceso de proliferación puede conducir también al suicidio celular, optimizando así la proporción de células germinales y somáticas. Durante la pubertad, se activa el proceso de meiosis, aunque algunas espermatogonias continúan dividiéndose mitóticamente para renovar el pool de células germinales

Una vez que todos estos procesos han tenido lugar, el desarrollo testicular se completa con la transformación de los cordones testiculares, túbulos rectos y *rete testis*. El mesonefros degenera y los testículos quedan suspendidos por una proyección del peritoneo llamada mesorquio (Lemeh, 1960).

3.2.4. Diferenciación ovárica

La organogénesis de la gónada femenina muestra una gran heterogeneidad, con notables diferencias entre taxones (Jiménez, 2009). A continuación se describen los procesos más significativos:

Formación de cordones sexuales. En ratón, la gónada indiferenciada (10.5-11.5 dpc) no presenta cordones sexuales y las células somáticas y germinales mantienen la estructura inicial presente en el blastema gonadal. Esto nos indica que el patrón de organogénesis ovárica en esta especie es bastante simple e incluso excepcional, puesto que incluso en rata se ha descrito la formación de estos cordones en la gónada indiferenciada (Merchant, 1975). En estadios posteriores se observan agregados de PGCs, formando unas estructuras parecidas a cordones sexuales en la corteza de la gónada (Pepling and Spradling, 1998). El desarrollo ovárico en humanos sigue un patrón más convencional (Gillman, 1948; Pinkerton *et al.*, 1961). Tras la formación inicial de la gónada a las 5 semanas de gestación, las células germinales se agrupan en la periferia de la gónada, agregándose y formando los cordones sexuales aproximadamente en la décima semana. Esta gónada muestra una clara regionalización ya que las células germinales dispuestas en la superficie del epitelio son las que sufren una mayor proliferación. En la semana 15, los cordones se disponen en el cortex de la gónada, sin que se aprecie su presencia en la región

3. Antecedentes

medular, y experimentan un intenso proceso de proliferación, lo que hace que estos cordones sexuales crezcan aún más. Los cordones se rodean de células somáticas, las células pre-granulosa y de células mesenquimáticas del estroma (Rajah *et al.*, 1992; Pepling and Spradling, 2001).

Vascularización. En la gónada indiferenciada encontramos un sistema vascular primitivo como consecuencia de la proyección de vasos mesonéricos hacia la gónada (Coveney *et al.*, 2008). Tras la diferenciación ovárica, no se observa migración de células endoteliales desde el mesonefros, a diferencia de lo que ocurre en los machos, de manera que el desarrollo de la vasculatura se produce por proliferación y remodelado del sistema vascular preexistente, tal como se ha descrito en otros órganos (Patan, 2000). En consecuencia, la vasculatura del ovario es mucho menos profusa que la del testículo.

Inicio de la meiosis. Éste es un evento clave en la formación del ovario ya que desencadena el resto de procesos de diferenciación ovárica. En gónadas XY, las células pre-Sertoli comienzan la diferenciación testicular antes de la entrada en meiosis de las células germinales y éstas, en un ambiente testicular, se diferencian como espermatogónias. Por tanto, la diferenciación testicular, que no la ovárica, puede producirse en ausencia de células germinales (Merchant-Larios, 1975; McLaren and Southey, 1997). Cuando entran en meiosis, las células germinales XX (oocitos) bloquean la diferenciación de cordones de tipo testicular y la migración celular desde el mesonefros, interfiriendo así el desarrollo testicular. Una vez que estas células han entrado en meiosis, la diferenciación testicular no puede producirse (Yao *et al.*, 2003). En la mayor parte de los mamíferos, el inicio de la meiosis tiene lugar antes del nacimiento, siendo en ratón alrededor de los 13.5 dpc (Menke *et al.*, 2003). En humanos, alrededor de la semana 20 de gestación, las células germinales del cortex profundo entran en meiosis, mientras que aquellas localizadas en el cortex externo siguen manteniendo una cierta actividad mitótica. Las células germinales XX entran en la profase I de la meiosis y sufren un arresto meiótico quedando en dictiotene de la primera división meiotica. Los oocitos permanecen en esta fase hasta la ovulación (para una revisión ver (para una revisión, ver Tripathi *et al.*, 2010)). La producción de ácido retinóico por parte del mesonefros es responsable de la activación del gen STRA8 (stimulated by retinoic acid gene 8), que induce el inicio de la meiosis en el ovario embrionario. En la gónada XY, el enzima CYP26B1 (cytochrome P450, P450RAI-2) degrada el ácido retinóico, retrasando la meiosis (Bowles *et al.*, 2006; Koubova *et al.*, 2006). Sin embargo, más recientemente, Kumar *et al.* (2011) han mostrado que CYP26B1 previene el inicio de la meiosis metabolizando un sustrato distinto del ácido retinóico, que controla la expresión de STRA8.

Foliculogénesis. El desarrollo del folículo ovárico es esencial para la maduración del oocito y su liberación del folículo durante la ovulación (Choi

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

and Rajkovic, 2006; Sato *et al.*, 2006). Este proceso comienza en ratón alrededor del nacimiento [2 días *post-partum* (dpp)] y antes de éste en humanos (28 semanas de gestación). Los grupos de células germinales se rompen y se comienzan a formar los folículos primordiales. Estos folículos se componen de oocitos rodeados individualmente por una monocapa de células somáticas llamadas ahora células foliculares (derivadas de las pre-granulosa mencionadas anteriormente). Solamente un pequeño número de folículos alcanza el estado ovulatorio, mientras que el resto se pierde por atresia. La reanudación de la meiosis y su progresión hasta metafase II ocurre en los folículos que entran en ovulación. A lo largo de la vida del animal, los folículos primordiales se van desarrollando secuencialmente, convirtiéndose en folículos primarios, secundarios y maduros (folículos de De-Graaf). Durante este proceso el oocito aumenta de tamaño y las capas de células foliculares que lo rodean van siendo cada vez más numerosas. Alrededor del folículo maduro se forman capas de células esteroideogénicas, denominadas teca, y una cavidad dentro del folículo denominada antro (Merchant-Larios and Chimal-Monroy, 1989).

Aunque se ha detectado producción de AMH en las células foliculares, que pudiera estar relacionada con el mantenimiento del ciclo ovárico (Ueno *et al.*, 1989; Hirobe *et al.*, 1992), durante el desarrollo embrionario esta hormona no está presente en las hembras dado su presunto carácter citotóxico para las PGCs. Además, esta ausencia permite el desarrollo de los conductos de Müller y la consecuente formación de los oviductos, el útero y la vagina superior. Al no producirse testosterona por la ausencia de células de Leydig, los conductos de Wolff no se desarrollan (Mossman and Duke, 1973).

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

La caracterización de los procesos genéticos de determinación sexual y de los cambios morfológicos que los acompañan, son indispensables para comprender cómo se lleva a cabo la organogénesis gonadal. Una parte importante de este conocimiento deriva del estudio de los patrones de expresión de los genes implicados en estos procesos y de las interacciones entre ellos. La capacidad de silenciar o expresar ectópicamente determinados genes, mediante la manipulación génica de ratones, ha supuesto un enorme adelanto para asignar funciones concretas y establecer asociaciones entre genes, mediante el estudio de los fenotipos resultantes. A pesar de ello, todavía se desconocen muchos genes y el lugar y función que ocupan dentro de la extensa red de señales moleculares que dirigen la diferenciación gonadal.

3. Antecedentes

3.3.1. Genes implicados en el desarrollo temprano de la gónada indiferenciada

Debido al reducido espacio temporal existente entre la aparición del primordio gonadal y el comienzo de la diferenciación sexual, junto con el hecho de que la gónada no presenta una estructura definida, hace que resulte muy complicado el estudio de genes implicados en estos procesos. Sin embargo se han conseguido identificar varios que parecen tener un papel crucial en la organogénesis gonadal.

WT1

Este gen se localiza en la banda 11p13 del cromosoma 11 de humanos. Tiene un tamaño de aproximadamente 50 Kb y se compone de 10 exones y 9 intrones. Los primeros seis exones de *WT1* codifican un dominio de regulación de la transcripción, mientras que los 4 últimos codifican dominios de dedos de zinc (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1992). *WT1* presenta maduraciones alternativas que originan diversas proteínas. Las regiones de maduración alternativa se encuentran en los exones 5 y 9 (Haber *et al.*, 1991; Gessler *et al.*, 1992). La presencia del exón 5, al producirse la maduración del RNA mensajero, origina la adición de 17 aminoácidos en el dominio de regulación transcripcional. Por otro lado, la inclusión del exón 9 inserta una secuencia de 3 aminoácidos llamada KTS (lisina-treonina-serina) que se intercala entre los dedos de zinc 3 y 4. Estas 2 posibilidades originan 4 proteínas WT1 diferentes que presentan un tamaño de 52-54 KDa (Morris *et al.*, 1991). Gracias a la existencia de modificaciones posteriores (edición del mRNA y sitios alternativos de inicio de la traducción), se originan hasta 24 isoformas menores (Sharma *et al.*, 1994; Caricasole *et al.*, 1996; Scharnhorst *et al.*, 1999). Todas las proteínas resultantes se clasifican en +KTS o -KTS en función de la presencia o ausencia de esta región.

La presencia de la región KTS influye en la localización celular de la proteína WT1. Las proteínas que contienen esta región (+KTS) se encuentran alrededor del núcleo, mientras que las que no la tienen (-KTS) presentan localización nuclear. Se ha propuesto que quizás las isoformas +KTS, que presentan sitios de unión al RNA, forman parte de los spliceosomas, mientras que las -KTS, que muestran mayor afinidad por el DNA, podrían actuar como factores o cofactores en la transcripción de genes (Bickmore *et al.*, 1992; Larsson *et al.*, 1995; Caricasole *et al.*, 1996; Hammes *et al.*, 2001).

El gen *WT1* se descubrió mediante el análisis genético de pacientes afectados por el tumor de Wilms. Se demostró que un alto porcentaje de pacientes que presentaban una delección en el cromosoma 11 desarrollaban el tumor (Riccardi *et al.*, 1978). En el interior del fragmento delecionado se identificó un gen al que se le denominó *WT1* (Wilms' tumour suppressor gene 1; Gessler *et al.*, 1992). Este tipo de cáncer afecta al riñón en desarrollo de uno de cada diez mil niños (Matsunaga, 1981). En ocasiones, el tumor va acompañado por

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

otras anomalías en el sistema genitourinario, originando diferentes síndromes, como 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 et al. \(1987\)](#), 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](#)), o el síndrome de Denys-Drash (DDS, Denys-Drash syndrome), caracterizado por nefropatía y malformaciones en el sistema reproductivo ([Denys et al., 1967](#); [Drash et al., 1970](#)). Posteriormente se confirmó que este gen estaba implicado además en los síndromes anteriormente mencionados ([Baird et al., 1992](#); [Little et al., 1995](#); [Barboux et al., 1997](#); [Jaubert et al., 2003](#)). Actualmente se sabe que cuando *WT1* se encuentra en hemicígosis, causa los problemas en el desarrollo testicular que presentan los pacientes con el síndrome WAGR ([Baird et al., 1992](#)). En individuos con síndrome DDS, la existencia de mutaciones dominantes que afectan a los dominios de dedos de zinc codificados por los exones 7-10, puede originar casos de pseudohermafroditismo masculino ([Little et al., 1995](#)). En el caso del síndrome FS, el origen son mutaciones puntuales que afectan al intrón 9 e interfieren con la maduración de la secuencia KTS ([Barboux et al., 1997](#)). Esta alteración produce niveles anormales de proteínas +KTS y -KTS, lo que origina feminización del testículo, que puede llegar a producir casos de reversión sexual XY. Esto se basa en el hecho de que ratones que expresan únicamente la isoforma -KTS, presentan también reversión sexual al producirse una gran reducción en los niveles de SRY [Hammes et al. \(2001\)](#), lo que demuestra el papel fundamental que juegan las isoformas +KTS en el proceso de diferenciación sexual masculina.

La expresión de *Wt1* comienza a detectarse a los 9 dpc en ratón, localizándose en la zona del mesodermo intermedio que originará la cresta genital. Conforme avanza el desarrollo se observa expresión de este gen en el epitelio celómico, en los cordones sexuales de la gónada indiferenciada y en el mesonefros ([Armstrong et al., 1993](#); [Rackley et al., 1993](#)). Hasta llegar a la edad adulta, la expresión de *Wt1* se mantiene en las células de Sertoli en testículos y en células foliculares en ovario, que provienen de un precursor común. Además se ha detectado expresión en útero, oviductos y endometrio ([Pelletier et al., 1991](#)). En humanos, la expresión de *WT1* comienza en el mesonefros y la cresta genital en torno a la séptima semana de gestación ([Mundlos et al., 1993](#); [Pritchard-Jones et al., 1990](#)). En aves y en reptiles con determinación sexual dependiente de la temperatura, no se observa dimorfismo en la expresión durante el desarrollo embrionario, habiendo una alta expresión de *WT1* en ambos sexos ([Smith et al., 1999b](#); [Western et al., 2000](#)). En anfibios, aunque también hay expresión en la gónada indiferenciada, ésta solamente se mantiene en el testículo hasta la edad adulta ([Yamamura et al., 2005](#)). En peces teleósteos parece ser un factor crucial para el desarrollo del primordio gonadal ([Hsu et al., 2003](#)). En aves y en reptiles con determinación sexual dependiente de la temperatura, no se observa dimorfismo en la expresión durante el desarrollo embrionario, habiendo una alta expresión de *WT1* en ambos sexos ([Smith et al., 1999b](#); [Western et al., 2000](#)).

3. Antecedentes

En peces teleósteos parece ser un factor crucial en el desarrollo del primordio gonadal (Hsu *et al.*, 2003).

En individuos adultos de *Talpa occidentalis*, se detecta la proteína en células de Sertoli de la gónada XY y los niveles de expresión que muestran los transcritos varían de manera estacional, observándose una bajada de expresión en testículos inactivos (Dadhich *et al.*, 2011).

WT1 esta muy conservado entre especies y se encuentra por tanto implicado en el desarrollo de la cresta genital y es esencial para la supervivencia del primordio gonadal de los vertebrados (Hammes *et al.*, 2001). También se ha sugerido que *WT1* podría ser necesario para el mantenimiento de la estructura tubular del testículo (Gao *et al.*, 2006), y 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 *et al.*, 2004).

Los ratones transgénicos homocigotos para un alelo mutante de *Wt1*, mueren durante el desarrollo embrionario a causa de las graves malformaciones que presentan en el corazón y en el sistema genitourinario (Kreidberg *et al.*, 1993), por lo que se han producido mutantes condicionados para poder analizar el papel de este gen en los procesos de gonadogénesis. Estos mutantes no expresaban *Wt1* en células de Sertoli durante el desarrollo testicular. En estos mutantes, había un incremento en los niveles de apoptosis que sufrían las células germinales, así como una pérdida de las uniones adherentes y problemas de infertilidad. Este fenotipo sugiere que WT1 podría estar implicado en las señales de transducción que se producen entre las uniones de las células de Sertoli y las germinales, esenciales para la espermatogénesis (Rao *et al.*, 2006).

El uso de microarrays de cDNA ha revelado que el gen que más afectado por la ausencia de *Wt1* era el del receptor de la hormona antimülleriana *Amhr2*. Además, la proteína WT1 es capaz de unirse al promotor de este gen, sugiriendo que podría estar implicada en la regresión del conducto de Müller ((revisado por Klattig and Englert, 2007).

Las diferentes isoformas que presenta esta proteína hace que esté implicada en muchos procesos biológicos dentro de la célula. Parece que las isoformas +KTS intervienen en la regulación post-transcripcional de *SRY*, gen clave en la activación de la ruta masculina (Hammes *et al.*, 2001). Las isoformas -KTS pueden actuar como cofactores de proteínas que se encuentran implicadas en la regulación de la transcripción de genes como *SRY* (Matsuzawa-Watanabe *et al.*, 2003), *LHX9* o *SF1*. Estas isoformas son capaces de formar un complejo LHX9-WT1 que induce la expresión de *SF1* (Wilhelm and Englert, 2002), y el complejo WT1-SF1 es capaz de activar al promotor de *AMH* (Nachtigal *et al.*, 1998). Estudios *in vitro* han sugerido que DAX1 podría reprimir la unión entre WT1 y SF1 (Nachtigal *et al.*, 1998), pero experimentos *in vivo* apuntan a que podría actuar conjuntamente con WT1 para inhibir a SF1 en su actuación sobre genes de síntesis de hormonas esteroideas (Gurates *et al.*, 2003). Aunque se ha visto que se puede producir multimerización de WT1 (Moffett *et al.*, 1995), parece que las isoformas -KTS podrían actuar como monómeros en la activación

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

de algunos genes como *SOX9* (Gao *et al.*, 2006), *WNT4* (Sim *et al.*, 2002), *DAX1* (Kim *et al.*, 1999) o *SF1* (Wilhelm and Englert, 2002) y en la represión de otros como el del receptor de andrógenos (*AR*; (Shimamura *et al.*, 1997; Zaia *et al.*, 2001)). Los casos de reversión sexual, pseudohermafroditismo masculino y disgenesia gonadal que ocurren en los síndromes asociados a proteínas mutantes de WT1, podrían deberse a la imposibilidad por parte de éstas de activar a los promotores de *SRY* y *AMH*. También se ha demostrado que SRY es capaz de regular la expresión de *Wt1*. Mediante experimentos con líneas celulares M15, se ha observado que en estas líneas celulares, los niveles de mRNA de las diferentes isoformas de *Wt1* disminuyen cuando expresan SRY. Es posible que WT1 tenga un doble papel en la diferenciación gonadal con respecto a *Sry*, activando inicialmente su expresión y siendo inhibido después por el producto resultante (Ito *et al.*, 2006). WT1 es capaz de regular negativamente la expresión de *βCat*, cuya inhibición es esencial en para que se produzca un desarrollo normal del testículo (Chang *et al.*, 2008). Ratones knock-out condicionales para *Wt1* que dejan de expresar este gen en 14.5 dpc en las células de Sertoli, muestran túbulos seminíferos mal formados y una pérdida progresiva de células de Sertoli y germinales, además de sufrir una drástica bajada de los niveles de *Sox9*, lo que sugiere que WT1 está implicado en su mantenimiento (Gao *et al.*, 2006).

SF1

El gen *SF1* (steroidogenic factor 1), que también se conoce con los nombres de *NR5A1* (nuclear receptor subfamily type 5, group A, member 1 gene) y de *Ad4bp* (adrenal 4-binding protein), se localiza en el locus 9q33.3 del cromosoma 9 humano. Tiene un tamaño de 28 Kb, componiéndose de 7 exones y 6 intrones. Codifica una proteína nuclear de 54 KDa que pertenece a la familia de receptores nucleares que incluye receptores de hormonas como andrógenos, estrógenos, progesterona, o del tiroides, vitamina D y retinoides (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Presenta un dominio de dedos de zinc que le permite unirse al promotor de diversos genes reconociendo la secuencia consenso CAAGGTCA (Meinke and Sigler, 1999; Parker and Schimmer, 1997; Wilson *et al.*, 1993b). Esta proteína presenta una elevada homología con la proteína FTZ-F1 (Fushi-Tarazu factor 1) de *Drosophila*, implicada en funciones de regulación de la embriogénesis y la metamorfosis (Lavorgna *et al.*, 1991).

La primera función asignada a la proteína SF1 fue la de ser un importante regulador de la expresión de las hidroxilasas esteroideas de Citocromo P450 en líneas celulares adrenocorticales y gonadales (Lala *et al.*, 1992; Rice *et al.*, 1991). Al encontrar expresión de *SF1* en tejidos esteroideogénicos en ratón adulto, tales como la corteza adrenal, testículo y ovario, se relacionó con la síntesis de esteroides (Ikeda *et al.*, 1993; Morohashi *et al.*, 1994). Por otra parte, se descubrió su importante papel en la diferenciación sexual y en el desarrollo de la gónada y la glándula adrenal (Luo *et al.*, 1994), así como en la síntesis

3. Antecedentes

de gonadotropinas (Barnhart and Mellon, 1994; Ingraham *et al.*, 1994; Shinoda *et al.*, 1995).

En todas las especies de vertebrados estudiadas hasta ahora, se ha encontrado expresión de *SF1* en el primordio gonadal antes de llevarse a cabo la diferenciación sexual y durante ésta. No obstante, se observan diferencias significativas en cuanto a los niveles de expresión entre ambos sexos en diferentes especies. En el primordio gonadal de ratón se observa expresión de *Sf1* en ambos sexos a partir de 9.5 dpc, estableciéndose un claro dimorfismo sexual a partir de 11.5 dpc, con aumento en las gónadas XY y disminución en las XX. En el testículo encontramos expresión en células de Leydig y de Sertoli (Hatano *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994). Algo similar ocurre en humanos, donde se observa expresión en ambos sexos durante la formación de la cresta genital, desde los 32 hasta los 44 días post-ovulación (dpo), que es cuando se produce la diferenciación sexual.

En el testículo recién formado, la expresión se restringe principalmente a las células de Sertoli, aunque algunas células de Leydig también lo expresan. A las 18 semanas de gestación, sin embargo, hay una expresión mucho más intensa en las células de Leydig que en las de Sertoli. En la gónada XX, a los 52 dpo, el patrón de expresión se muestra difuso en la totalidad de la gónada y más adelante se observa fuerte expresión en el epitelio celómico (Hanley *et al.*, 1999). En pollo, no obstante, durante el periodo de determinación sexual se mantiene la expresión de *SF1*, pero aumenta significativamente en hembras (Smith *et al.*, 1999b). En caimanes, que presentan un sistema de determinación sexual dependiente de la temperatura de incubación de los huevos (TSD), se produce una represión del mismo en machos en el momento en que la temperatura determina el sexo del individuo (Western *et al.*, 2000), a pesar de que en tortugas con TSD ocurre justo lo contrario (Fleming *et al.*, 1999). Una posible explicación de este patrón de expresión en hembras de estas especies sea la intensa actividad esteroidogénica que se produce durante el desarrollo ovárico. La expresión de *SF1* en testículo, no obstante, podría deberse a la regulación que ejerce sobre el gen *AMH* (Morrish and Sinclair, 2002). *SF1* es un gen muy conservado en todo el reino animal. En peces teleósteos y en invertebrados también se han identificado una gran variedad de ortólogos de *SF1* (Lala *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1999; Chai and Chan, 2000; von Hofsten *et al.*, 2002).

En la gónada XY de *Talpa occidentalis*, *SF1* comienza a detectarse en el estadio s4b (15 dpc), siendo las células medulares la que lo expresan con mayor intensidad. Dos días más tarde, en el estadio s5a, las células que forman parte de los cordones en desarrollo muestran una mayor expresión que las que se encuentran fuera. Este patrón se invierte a partir del estadio 5b y posteriores (Carmona *et al.*, 2009a). En la gónada XX, *SF1* se detecta en e4b y 4c en el núcleo de todas las células de la gónada en médula y córtex. En s5a, en la corteza se distinguen células con expresión débil y en s5b hay dos tipos celulares con una expresión muy diferente en intensidad. Las células con mayor intensidad de expresión son aquellas pertenecientes a la médula y a los cordones corticales

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

profundos. En los estadios s6-8 las células que componen los cordones corticales son fuertemente positivas para SF1, mientras que las que se encuentran fuera de estos lo son mucho menos. Tras el nacimiento, su expresión decrece hasta casi desaparecer en e11. En los cordones medulares ocurre algo similar, disminuyendo su expresión, pero manteniéndose un nivel medio hasta la edad adulta (Carmona *et al.*, 2009b). En individuos adultos XY, la expresión de SF1 varía según cambios estacionales observándose una reducción en los niveles de transcrito en individuos inactivos. La proteína se detecta fuertemente en células de Leydig y en menor medida en células de Sertoli (Dadhich *et al.*, 2011).

En humanos se han descrito varios cuadros clínicos asociados con mutaciones en el gen SF1, como casos de insuficiencia adrenal con disgenesia gonadal y reversión sexual XY (Achermann *et al.*, 1999, 2002), insuficiencia adrenal con desarrollo ovárico normal (Biaison-Lauber and Schoenle, 2000) y disgenesia testicular con función adrenal normal (Correa *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2004). Los ratones mutantes para este gen mueren poco después del nacimiento como consecuencia de una insuficiencia adrenocortical, lo que indica que este gen no es esencial para que el embrión sobreviva. En el fenotipo destaca una ausencia de glándulas adrenales y de gónadas, debido a la apoptosis y degeneración que ocurre alrededor de 12.5 dpc. Los individuos XY llegan a desarrollar conductos de Müller y presentan genitales femeninos internos (Luo *et al.*, 1994; Sadovsky *et al.*, 1995). También se han descrito un desarrollo anormal del hipotálamo y la glándula pituitaria, con ausencia de hormonas gonadotrópicas LH y FSH (Shinoda *et al.*, 1995) en mutantes para SF1. En consecuencia, parece que SF1 está implicado en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante la reproducción y en el desarrollo y correcto funcionamiento de glándulas adrenales.

En el caso de la gonadogénesis, SF1 interviene en la proliferación y supervivencia de células de la cresta genital (Luo *et al.*, 1994) y en la regulación de síntesis de enzimas esteroideas (Hatano *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1994). Se ha demostrado que las proteínas LHX9 y WT1 podrían formar un complejo que provocaría la activación del promotor de SF1 (Wilhelm and Englert, 2002). También se ha encontrado una diana para la proteína GATA4 en el promotor de SF1, lo que sugiere que GATA4 también podría estar implicado en su regulación (Tremblay and Viger, 2001a). Por otra parte, se acepta que DAX1 es un antagonista de SF1 en la diferenciación masculina (Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay and Viger, 2001b), aunque estudios recientes sugieren que se establece una colaboración entre ambas proteínas para la correcta diferenciación de las células somáticas del testículo (Park *et al.*, 2005).

Además, SF1 activa el promotor del gen AMH (Giuli *et al.*, 1997; Shen *et al.*, 1994) con la posible colaboración de WT1, GATA4, SOX8 y SOX9 (Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay and Viger, 1999; De Santa Barbara *et al.*, 2000; Schepers *et al.*, 2003). En el promotor de AMH en diferentes especies de aves también se han encontrado sitios de unión para SF1 (Takada *et al.*, 2006). SF1 también coopera con SRY para activar la expresión de *Sox9*, interaccionando después

3. Antecedentes

con la proteína SOX9 para mantener la expresión de ésta, una vez que SRY ha desaparecido (Sekido and Lovell-Badge, 2008).

GATA4

El gen *GATA4* tiene un tamaño de 64 Kb, se encuentra situado en el locus 8p23.1 del cromosoma 8 humano y consta de 7 exones y 6 intrones (Huang *et al.*, 1996). El gen se traduce en una proteína de 48 KDa con dos dominios de dedos de zinc que le permiten unirse al DNA reconociendo promotores que contienen la secuencia consenso GATA (Patient and McGhee, 2002). Esta característica es común a los componentes de la familia de transcripción GATA que se encuentran implicadas en procesos de modulación de la hematopoyesis (Weiss and Orkin, 1995) y en el desarrollo embrionario (Viger *et al.*, 2004).

En ratón, *Gata4* se expresa abundantemente en la cresta genital, tanto en machos como en hembras. Esta expresión se produce en las células somáticas del primordio gonadal, y a partir de 13.5 dpc aumenta su expresión en testículos y disminuye en ovarios. En la gónada masculina, las células de Sertoli y de Leydig y la túnica albuginea presentan altos niveles de expresión que persiste hasta la edad adulta, momento en el que vuelve a aparecer expresión en los ovarios, principalmente en las células foliculares (Heikinheimo *et al.*, 1997; Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 1999), aunque no se puede descartar que no haya cierto nivel de expresión en las células somáticas del ovario hasta la edad adulta (Anttonen *et al.*, 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 *et al.*, 2000). De igual forma, en el ovario adulto también hay expresión de *GATA4* en las células foliculares (Laitinen *et al.*, 2000).

Los ratones mutantes para *Gata4* morían antes de la formación del primordio gonadal debido a sus defectos cardiovasculares (Kuo *et al.*, 1997; Molkentin *et al.*, 1997). Para salvar este inconveniente, se generaron ratones transgénicos con una modificación del gen que origina una proteína sin capacidad para unirse a la proteína Fog2 (Crispino *et al.*, 2001), puesto que se conoce la necesidad de que se produzca una cooperación entre los factores GATA y proteínas de la familia FOG (friend of GATA) para que los primeros ejerzan su función (Crispino *et al.*, 2001). Estos ratones prolongan su supervivencia hasta los 13.5 dpc y permitieron estudiar la función del complejo Gata4/Fog2 en el desarrollo gonadal temprano.

Individuos homocigóticos para este alelo sufrían una drástica disminución de los niveles de la proteína SRY, lo que provoca el silenciamiento de diversos genes masculinos en células de Sertoli y Leydig, y da lugar a anomalías en el desarrollo testicular (Tevosian *et al.*, 2002). Este hecho, junto a la identificación de una diana para GATA4 en el promotor de *Sry*, hacen sospechar que el complejo Gata4/Fog2 es indispensable para la determinación y el desarrollo testicular (Tevosian *et al.*, 2002).

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

Estudios realizados en humanos XX con mutaciones en el gen del receptor de la FSH han revelado que estos individuos muestran niveles reducidos de la proteína GATA4 lo que sugiere que FSH es un posible activador de GATA4 (Vaskivuo *et al.*, 2002). Se sabe también que GATA4 es un activador directo del gen *AMH* mediante unión a su promotor (Viger *et al.*, 1998), posiblemente en cooperación con SF1 (Tremblay and Viger, 1999; Watanabe *et al.*, 2000). Como se ha visto anteriormente, DAX1 podría ser un inhibidor de esta unión (Tremblay and Viger, 2001b), así como FOG2 también parece reprimir la capacidad de GATA4 para activar el gen *AMH* (Tremblay *et al.*, 2001; Anttonen *et al.*, 2003). Además se han encontrado dianas de GATA4 en los promotores de *SRY*, *SF1* (Tremblay and Viger, 2001a) y *DMRT1* (Lei and Heckert, 2004).

Por tanto, *GATA4* aparece implicado en el desarrollo del primordio gonadal, la diferenciación testicular y de células de Sertoli y Leydig y en la esteroidogénesis (Tevosian *et al.*, 2002; Tremblay and Viger, 2003b,a). El hecho de que otros miembros de la familia GATA se encuentran implicados en el desarrollo gonadal en multitud de especies (Spieth *et al.*, 1991; Drevet *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1994; Yomogida *et al.*, 1994; Lossky and Wensink, 1995; Heikinheimo *et al.*, 1997; Viger *et al.*, 1998; Ketola *et al.*, 2000), demuestra que el papel de los miembros de esta familia génica en los procesos de gonadogénesis se encuentra muy conservado evolutivamente.

En mamíferos, *GATA1*, *GATA2* y *GATA6* se expresan en células somáticas de la gónada (Heikinheimo *et al.*, 1997; Ito *et al.*, 1993; Ketola *et al.*, 1999; Siggers *et al.*, 2002; Yomogida *et al.*, 1994). Por otra parte, *GATA2* también se expresa en gónada, pero en células germinales durante el desarrollo temprano del ovario de ratón (Siggers *et al.*, 2002).

FOG2

El gen *FOG2* (friend of GATA), también llamado *ZFPM2* (zinc finger protein multitype 2), está ubicado en el cromosoma 8 humano, en la banda 8q23.1. Consta de 10 exones y 9 intrones, originando una proteína de 128 KDa. Se incluye dentro de la familia de proteínas FOG, que son factores de transcripción. La primera proteína de esta familia que se identificó fue un cofactor de la proteína GATA1 que interviene en procesos de hematopoyesis (Tsang *et al.*, 1997). Se descubrió que este tipo de proteínas presentan dominios represores de la transcripción y dominios de dedos de zinc, aunque no poseen capacidad de unión al DNA. Sin embargo, actúan como cofactores de las proteínas GATA, modulando positiva o negativamente su actividad (Tsang *et al.*, 1997; Fox *et al.*, 1999; Tevosian *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004). Tienen un dominio de represión que es el que les confiere la capacidad de inhibir a proteínas GATA, además de su extremo carboxilo que puede unirse al correpresor transcripcional CtBP2 (C-terminal binding protein-2) (Turner and Crossley, 1998; Holmes *et al.*, 1999; Svensson *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004). La familia FOG se encuentra muy conservada entre diferentes especies estando

3. Antecedentes

implicada en hematopoyesis y en el sistema cardiovascular en invertebrados, peces, aves, anfibios y mamíferos (Tsang *et al.*, 1998; Tevosian *et al.*, 2000; Deconinck *et al.*, 2000; Fossett *et al.*, 2001; Huggins *et al.*, 2001; Walton *et al.*, 2006).

La expresión de *Fog2* comienza en el primordio gonadal de ratón a los 10.5 dpc en ambos sexos. En 12.5 dpc se detecta expresión en células de Sertoli en machos y en células somáticas en hembras. Esta expresión se mantiene constante en la gónada XX hasta el estadio adulto, donde se localiza en las células foliculares, pero en la gónada masculina comienza a declinar, siendo muy baja en 13.5 dpc, momento en que aumenta la de *Gata4* y *Amh*. A los 15.5 dpc sus niveles son indetectables en células de Sertoli, quedando sólo una expresión en algunas células intersticiales y de la túnica albugínea. Tras el nacimiento, se vuelve a detectar abundantes niveles de la proteína en células de Sertoli hasta las tres semanas de vida, volviendo a detectarse en los túbulos seminíferos que se encuentran las etapas VII-XII de la espermatogénesis (Ketola *et al.*, 2002; Anttonen *et al.*, 2003).

La proteína FOG se encuentra implicada en procesos de diferenciación en sistema nervioso, corazón y gónadas (Tevosian *et al.*, 1999). La generación de ratones *knockout* para *Fog2* desveló que su ausencia provoca anomalías en el desarrollo masculino, debido a que se imposibilita la formación del complejo GATA4/FOG2, produciéndose una falta de regulación de *Sry* (Tevosian *et al.*, 2000) que da como resultado un fenotipo parecido al que presentan los ratones *knockout* para *Gata4*. Estos ratones morían a los 13.5 dpc debido a alteraciones cardiovasculares. Esto sugería que su función podría ser similar a la de *Gata4*, pero al comprobar que su expresión disminuía al aumentar la de *Amh*, se concluyó que solamente estaba implicado en el desarrollo temprano de la gónada masculina. También FOG2 podría regular a AMH, debido a su expresión durante el desarrollo ovárico (Anttonen *et al.*, 2003) y a que en cultivos primarios de células de Sertoli se ha observado un descenso en la actividad del promotor de AMH causado por niveles altos de FOG2 (Tremblay *et al.*, 2001). Una de las funciones del complejo GATA4/FOG2 es la regulación de los niveles de *SOX9*, como demuestran diversos experimentos realizados en ratón (Manuylov *et al.*, 2007; Bouma *et al.*, 2007). Estudios más recientes han demostrado que el complejo GATA4/FOG2 resulta imprescindible para el desarrollo ovárico, reprimiendo el gen *DKK1*, que codifica un inhibidor segregado de la ruta canónica de señalización por β CAT (Manuylov *et al.*, 2008).

Otros genes

Además de los anteriormente mencionados, hay otros genes que también se encuentran implicados en la formación de la gónada bipotencial, como es el caso de *LHX9* (LIM homeobox gene 9). Este gen pertenece a la familia de genes homeobox LIM que se caracterizan por la presencia de dos dominios LIM NH2-terminales, que se encuentran involucrados en interacciones proteína-proteína, y

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

de un dominio homeobox de unión a DNA (revisado por [Hobert and Westphal, 2000](#)). El fenotipo que presentan los ratones *knockout Lhx9^{-/-}* es muy similar al que se observa en ratones *Sf1^{-/-}* y *Wt1^{-/-}* ([Luo et al., 1994](#)). Mediante experimentos *in vitro* se ha revelado que LHX9 es capaz de unirse directamente al promotor de *Sf1* y que tiene un efecto aditivo a la activación *in vitro* inducida por WT1 ([Wilhelm and Englert, 2002](#)).

El gen homeótico *EMX2* conserva cierta homología con el gen *Ems* de *Drosophila* y en los ratones *knockout* para este gen la migración de PGCs ocurre de una manera normal, pero el engrosamiento del epitelio celómico que marca la primera fase del desarrollo gonadal no es prominente y el conducto de Müller nunca llega a formarse. Estos mutantes carecen de gónadas y de tracto genital ([Miyamoto et al., 1997](#)).

Ratones mutantes con inactivación en el gen *M33* sufren reversión sexual de macho a hembra ([Katoh-Fukui et al., 1998](#)). Los ratones XX, o no mostraban ovarios o éstos eran más pequeños que los que exhibían ratones normales. Parece que *M33* está implicado en la regulación de *Sf1* en bazo y glándula adrenal, por lo que podría ejercer una función similar en gónada.

3.3.2. Genes implicados en la determinación del sexo y la diferenciación gonadal

El descubrimiento de que la presencia de un cromosoma Y se asociaba con el desarrollo de un fenotipo masculino ([Ford et al., 1959](#); [Jacobs and Strong, 1959](#); [Welshons and Russell, 1959](#)), sugirió que este cromosoma debería contener un gen maestro que fuera responsable de la determinación sexual en mamíferos. Este gen fue denominado *TDF* (testis determining factor) en humanos y *Tdy* (testis determining Y gene) en ratón. Se procedió entonces a buscar un gen cuya alteración originase reversión sexual y cuya expresión coincidiese con el momento en que ocurre la diferenciación testicular de la gónada. Uno de los primeros genes candidatos fue el del antígeno H-Y (histocompatibility-Y antigen; ([Wachtel et al., 1975](#)), aunque esta idea se descartó al comprobar que se localizaba fuera de la porción del cromosoma Y donde debería localizarse el *TDF*, determinada mediante mapas de delección ([Guellaen et al., 1984](#); [Palmer et al., 1989](#)). Posteriormente se sugirieron otros como las secuencias *BKM* (banded krait minor satellite DNA; [Chandra, 1984, 1985](#)) y el gen *ZFY* (zinc finger Y gene; ([Page et al., 1987](#))). Sin embargo, estos candidatos tampoco satisfacen todos los requisitos para ser *TDF/Tdy*.

Los mapas de delección del cromosoma Y humano elaborados con el fin de localizar el fragmento más pequeño del mismo que, al encontrarse en varones XX o al faltar en mujeres XY, fuera capaz de originar la reversión sexual, revelaron que *TDF* debía estar localizado en el segmento diferencial del Y, en una zona próxima al límite con la región pseudoautosómica ([Guellaen et al., 1984](#); [Palmer et al., 1989](#)). [Gubbay et al. \(1990\)](#) y [Sinclair et al. \(1990\)](#) identificaron el gen

3. Antecedentes

SRY de humano y ratón (*Sry*), respectivamente. Tras varias investigaciones que demostraban que el gen *SRY* estaba mutado en mujeres XY (Berta *et al.*, 1990; Jager *et al.*, 1990; Harley *et al.*, 1992; Hawkins *et al.*, 1992), la confirmación de que *Sry* equivale en efecto a *Tdy* se obtuvo tras la producción de ratones XX transgénicos para *Sry*, que mostraban un fenotipo masculino (Koopman *et al.*, 1991).

SRY

El gen *SRY* está localizado en humanos en el cromosoma Y, en el locus Yp11.3 y ocupa 897 bp. Este gen no contiene intrones en la mayoría de especies de mamíferos y codifica una proteína de 204 aminoácidos de aproximadamente 24 KDa. Forma parte de la familia de genes *SOX* (*SRY-related HMG box*), que codifican factores de transcripción que presentan un dominio llamado caja HMG (high-mobility group), y que consta de 79 aminoácidos que definen un dominio de unión al DNA (Sinclair *et al.*, 1990). Este dominio se une a la secuencia consenso (A/T)AACAA(T/A) (Pollock and Treisman, 1990; Harley *et al.*, 1994), induciendo una curvatura en el DNA (Ferrari *et al.*, 1992; Giese *et al.*, 1992, 1994). Aparte de esta caja HMG, se ha observado que la proteína SRY está muy poco conservada entre diferentes especies de mamíferos. Aún así, el gen se divide en 3 partes, el extremo N-terminal, que oscila entre 30-60 aminoácidos, la caja HMG y el extremo C-terminal, con una longitud variable entre especies. En este extremo C-terminal hay un dominio rico en glutamina (“Q-rich”), cuya delección mediante la introducción de un codón de STOP tras la caja HMG de ratón origina la pérdida de su capacidad para llevar a cabo la determinación del sexo masculina. Se han identificado dos señales de localización nuclear (NLS, nuclear localization signal) en humanos y ratón. Estas secuencias se encuentran muy conservadas en otros miembros de la familia *SOX* y podrían intervenir en el transporte de la proteína a través de la membrana nuclear (Sudbeck and Scherer, 1997; Li *et al.*, 2001). La calmodulina reconoce el NLS del extremo N-terminal para su entrada en el núcleo en presencia de Ca^{2+} (Harley *et al.*, 1996). Por otra parte, la importina- β interacciona con el NLS del extremo C-terminal para inducir acetilación (Thevenet *et al.*, 2004). La proteína SRY sólo está presente en mamíferos y muestra localización nuclear (Poulat *et al.*, 1995; Salas-Cortes *et al.*, 1999).

La expresión de *Sry* en ratón comienza muy temprano en el desarrollo, alrededor de 10.5 dpc en los precursores de las células de Sertoli en la cresta genital. Alcanza un pico en 11.5 y justo antes de 12.5 dpc cesa su expresión (Hacker *et al.*, 1995; Bullejos and Koopman, 2001; Sekido *et al.*, 2004). Este pico coincide con el inicio de la diferenciación de las células de Sertoli. Esta expresión ocurre siguiendo un patrón que va desde el centro de la gónada extendiéndose hacia los polos, a través del eje antero-posterior (Bullejos and Koopman, 2001). Estas células *Sry*-positivas se convierten en células de Sertoli con altos niveles de *Sox9* (Sekido *et al.*, 2004). En humanos, se comienza a detectar la expresión de *SRY* en torno a los 41 dpo, alcanzando su pico de expresión a los 44 dpo, cuando

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

ocurre la determinación sexual masculina. A diferencia de lo que ocurre en ratón, en otros mamíferos, incluido humano, cerdo y topo (*Talpa occidentalis*), se han detectado niveles de *SRY* en estadios postnatales (Salas-Cortes *et al.*, 1999; Parma *et al.*, 1999)(nuestros datos no publicados). Además, en humano, la expresión de *SRY* no está restringida exclusivamente a las células de Sertoli, sino que también se ha detectado en células germinales (Salas-Cortes *et al.*, 1999).

La función de *SRY* en la determinación sexual parece muy conservada entre mamíferos a pesar de lo poco conservado que se encuentra el gen entre especies, lo cual quedó patente al comprobar que ratones transgénicos para el gen *SRY* humano o un BAC con DNA de cabra que contenía *SRY* también se desarrollaban como machos (Lovell-Badge *et al.*, 2002; Pannetier *et al.*, 2006). Lo que realmente parece actuar como *TDF* es sólo la caja HMG, ya que al reemplazar la del gen *Sry* con la de *Sox9* o *Sox3*, se seguía produciendo reversión sexual XX en ratones transgénicos (Bergstrom *et al.*, 2000). Esto se ve además corroborado por la gran cantidad de casos de reversión XY en humanos asociados con mutaciones en este dominio.

Proteínas tales como GATA4, FOG2 o WT1 (en su forma +KTS) se encuentran implicadas en la regulación de *SRY*, modulando su transcripción o induciendo modificaciones postranscripcionales (Hammes *et al.*, 2001; Tevosian *et al.*, 2002). A su vez, la unión al DNA de la proteína SRY parece ser regulada mediante fosforilación vía quinasa de la proteína A, dependiente de AMPc (Desclozeaux *et al.*, 1998). La translocación mediada por la calmodulina e importina (vía acetilación) es esencial, ya que determinadas mutaciones en los dominios NLS causan reversión sexual XY (Forwood *et al.*, 2001; Harley *et al.*, 2003; Sim *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la proteína SRY de ratón es capaz de inhibir la ruta WNT/ β CAT (Vainio *et al.*, 1999; Maatouk *et al.*, 2008), requiriéndose los dominios HMG y “Q-rich” para ello. Aunque el gen humano no contiene este último dominio, también se ha sugerido que es capaz de llevar a cabo esta inhibición. Estos datos sugerían que SRY podría actuar como un represor de la transcripción. No obstante, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), combinados con transgénesis en ratón, han desvelado una cooperación sinérgica entre SRY y SF1 para activar al gen *Sox9* a través de un enhancer específico de testículo (TES), lo que resulta necesario para inducir la diferenciación de células de Sertoli (Sekido and Lovell-Badge, 2008). Esto alimenta la idea de que SRY interacciona con SF1 a través de su caja HMG, al igual que se produce con SOX9, elevando los niveles del propio gen *Sox9*. Además de *Sox9*, el gen precursor de cerebellina 4 (*Cbln4*) es una diana directa de SRY en ratón. Este codifica una proteína transmembrana que podría ser cortada y actuar como molécula de secreción, aunque no se conoce si tiene función en la diferenciación testicular. Aunque podría haber más dianas directas de SRY, sin duda *Sox9* es la más importante. Además, la activación de *Sox9* debe producirse dentro de una ventana temporal muy estrecha, tal como se ha demostrado en experimentos donde SRY podía desencadenar la diferenciación testicular mediante la activación de *Sox9* en embriones entre

3. Antecedentes

11.0 dpc y 11.25 dpc, pero no en aquellos desarrollados más allá de 11.5 dpc (Hiramatsu *et al.*, 2009).

SOX9

El gen *SOX9* (*Sry related HMG box-9*) se encuentra localizado en el locus 17q24.3 del cromosoma 17 de humanos, con un tamaño de 5 Kb. Forma parte del grupo E de genes *SOX*, al igual que *SOX8* y *SOX10* (Bowles *et al.*, 2000). Consta de 3 exones y 2 intrones y origina una proteína de 509 aminoácidos. Es un factor de transcripción que al igual que SRY presenta una caja HMG (71 % homología con la de SRY), que le confiere capacidad de unión al DNA. Este dominio es capaz de unirse a las secuencias consenso AACAAAT y AACAAAG, al igual que SRY y otras proteínas SOX, aunque también se ha demostrado que interacciona con las secuencias ATGAAT y CACAAT que se encuentran en el intensificador específico de condrocito en el primer intrón del gen *COL2A1* de colágeno de tipo II humano (Bell *et al.*, 1997). También presenta los dos dominios NLS que intervienen en procesos de translocación de la proteína al núcleo, además de una señal de exportación nuclear (NES) que depende de CRM1 (chromosomal region maintenance 1 protein) (Sudbeck and Scherer, 1997; Gasca *et al.*, 2002). En el extremo C-terminal encontramos una región rica en prolina, glutamina y serina, parecida a los dominios de trans-activación de los factores de transcripción (Foster *et al.*, 1994). También ha sido identificado un dominio situado antes de la caja HMG e involucrado en la dimerización de la proteína, aunque este proceso parece no ser necesario para la determinación del sexo, sino para procesos de condrogénesis.

El estudio de pacientes con displasia campomélica, enfermedad caracterizada por una malformación de los huesos largos y deficiencias en diversos órganos como oído interno, cerebro, páncreas y corazón (Houston *et al.*, 1983; Mansour *et al.*, 1995, 2002) reveló que un elevado número de individuos XY presentaban episodios de reversión sexual completa o defectos en el desarrollo testicular (Houston *et al.*, 1983). Los estudios de localización de la displasia campomélica (CMPD1) y la reversión sexual asociada (SRA1) permitieron identificar al gen *SOX9* como el gen responsable de estos síndromes (Tommerup *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Más tarde se comprobó que la duplicación de *SOX9* originaba reversión sexual en pacientes XX (Huang *et al.*, 1999), lo que confirmó a *SOX9* como un gen clave en la diferenciación testicular. En humanos, solamente se han descrito casos de heterocigosis, pero su contrapartida en ratón origina la muerte con un síndrome similar al que aparece en humanos, pero sin observarse casos de reversión sexual (Bi *et al.*, 2001). Los conductos de Müller y sus derivados sufren regresión normalmente, lo que indica niveles normales de hormona AMH y el sistema del conducto de Wolff se desarrolla de forma normal. Los ratones generados con mutaciones en *Sox9* en heterocigosis, morían alrededor de 11.5 dpc por alteraciones cardiovasculares, por lo que para el estudio de la implicación de *Sox9* en la determinación del sexo se procedió a generar mutantes condicionados. Estos ratones mutantes

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

no muestran expresión de *Sox9* en las gónadas, originándose reversión sexual completa en individuos XY detectándose expresión de marcadores de la ruta femenina como *Wnt4* o *Foxl2* (Barrionuevo *et al.*, 2006). Todo esto apunta a la implicación de *Sox9* en la diferenciación sexual y actuando junto con *Sry* en estadios tempranos. Al observarse su expresión poco después de *Sry* y en células pre-Sertoli, se llegó a la conclusión de que podría estar regulado por éste (Austin and Edwards, 1981; Kent *et al.*, 1996; Canning and Lovell-Badge, 2002).

Diversos estudios han revelado que en la gónada bipotencial de ratón y de humanos (10.5 dpc y en torno a la sexta semana de gestación en humano) hay expresión de *SOX9* en ambos sexos y con una localización citoplasmática. Después de la expresión de *SRY* en machos, se detectan altos niveles nucleares de *SOX9* en el mismo tipo celular. Posteriormente, estas células se diferencian como células de Sertoli, dirigiendo la organogénesis masculina y siguen expresando *SOX9* hasta la edad adulta. En la gónada XX, sin embargo, esta expresión desaparece. En aves y reptiles, al igual que ocurre en mamíferos, el patrón de expresión es similar, ya que es específico de testículo (Morais da Silva *et al.*, 1996; Moreno-Mendoza *et al.*, 1999). No obstante, no parece que todas las funciones de *SOX9* estén conservadas, ya que en mamíferos regula la expresión del gen *AMH*, mientras que en pollo y caimán, *AMH* comienza su expresión antes de la de *SOX9* (Sinclair *et al.*, 2002). En peces teleosteos se han identificado varios ortólogos de *SOX9* con diversos patrones de expresión, como en Zebrafish, donde *SOX9a* se expresa en el testículo mientras que *SOX9b* lo hace en el ovario (Chiang *et al.*, 2001). En *Drosophila*, un ortólogo de *SOX9* llamado *Sox199B*, que presenta un 80 % de homología en la caja HMG parece influir en el desarrollo testicular (De Falco *et al.*, 2003). Es por tanto *SOX9* un gen que se encuentra muy conservado en mamíferos, aves, reptiles y peces y entre especies con determinación del sexo genética y ambiental (Morais da Silva *et al.*, 1996; Spotila *et al.*, 1998; Chiang *et al.*, 2001; Pask *et al.*, 2002).

En *Talpa occidentalis*, la expresión de *SOX9* se observa en la gónada temprana en machos (s4b y 4c). La expresión continúa en estadios posteriores identificándose en las células de Sertoli y llegando hasta la edad adulta. En hembras, no se observa expresión de este gen en ninguno de los estadios estudiados (Carmona *et al.*, 2009a,b). En gónadas de individuos adultos, la expresión de *SOX9* es dependiente del ciclo espermatogénico que presentan los túbulos seminíferos. Los túbulos en los que se encontraban en un estadio espermatogénico del I a VI mostraban mayores niveles de proteína que los que se encontraban en estadios de VII a X. Resultados similares se observaron en ratón. Además, la expresión de *SOX9* es mayor en los testículos de los machos capturados en el periodo de inactividad gonadal, dentro del ciclo reproductivo estacional de esta especie, abriendo la posibilidad de que esté implicado en el control de la actividad testicular estacional (Dadhich *et al.*, 2011).

Parece que para que *SOX9* pueda actuar en la determinación del sexo correctamente, son esenciales los dominios NLS y NES, ya que regulan la distribución subcelular de la proteína (Sudbeck and Scherer, 1997; Gasca *et al.*, 2002). La translocación de *SOX9* al núcleo de las células pre-Sertoli

3. Antecedentes

se lleva a cabo gracias a la formación de un complejo SOX9/Calmodulina que se forma a través del NLS situado en el extremo amino y que induce un cambio conformacional en la proteína. También la importina reconoce el NLS del extremo carboxilo y éste transporta la proteína al núcleo (Preiss *et al.*, 2001; Argentaro *et al.*, 2003). Este transporte al núcleo parece inducido por el sistema PGD2, que fosforilaría a la proteína SOX9 mediante activación de la *quinasa de proteína A dependiente de AMPc* (Malki *et al.*, 2005b). El paso de la proteína al núcleo es esencial para la ruta masculina (Argentaro *et al.*, 2003). Sin embargo, el dominio situado antes de la caja HMG que controla la dimerización de la proteína, parece que no es esencial para el determinismo del sexo sino para procesos de condrogénesis, lo que podría explicar los casos de CD sin reversión sexual (Bernard *et al.*, 2003; Sock *et al.*, 2003).

Se ha descubierto un enhancer específico de testículo en el gen *Sox9* de ratón de 3.2 Kb (TES) que es activado por SRY y SF1. Una vez que SOX9 alcanzan un nivel determinado se produce un feedback positivo mediante la interacción de SOX9 y SF1 con el TES, lo que es necesario para el mantenimiento de la expresión de *Sox9* (Sekido and Lovell-Badge, 2008). En humano no se ha podido demostrar que el homólogo de la región TES esté implicado en la regulación de SOX9. En 11.5, otros 2 bucles de retroalimentación positivos intervienen en la regulación de SOX9. Uno se establece con FGF9, que también es necesario para inhibir la ruta de señalización *WNT* implicada en el desarrollo ovárico (Kim *et al.*, 2006). El otro se produce cuando SOX9 activa al promotor de *PTGDS* para producir esta retroalimentación via PGD2, la cual origina una translocación de SOX9 al núcleo y dispara la diferenciación de células de Sertoli de manera autocrina y paracrina (Malki *et al.*, 2005a; Wilhelm *et al.*, 2007). Además se ha observado que PGD2 produce una masculinización parcial de las células epiteliales en la gónada XX en cultivo, haciendo que se diferencien como células de Sertoli (Adams and McLaren, 2002). Se ha detectado expresión de PGD2 en células germinales, lo que podría además retroalimentar este bucle de retroalimentación (Adams and McLaren, 2002). La detección de SOX9 sin la expresión previa de *SRY* apoya la posible activación de *SOX9* via PGD2 de manera autocrina y paracrina (Wilhelm *et al.*, 2005). Ratones XX deficientes en *Sox9* continúan expresando *Sry* en las gónadas, por lo que se ha sugerido que éste podría ser responsable de la desaparición de *Sry* en 12.5 dpc (Chaboissier *et al.*, 2004; Sekido *et al.*, 2004; Wilhelm *et al.*, 2005). El complejo transcripcional FOG2/GATA4 se encarga de regular los niveles de *Sox9* en la gónada temprana y cambios en la dosis de estos genes originan desregulaciones que conducen a la reversión sexual (Bouma *et al.*, 2007; Manuylov *et al.*, 2007).

Sox9 parece ser el principal factor en el proceso de diferenciación de células Sertoli y la formación de cordones. Se sabe que *Amh* y *Vanin-1* (*Vnn1*) son dianas directas de SOX9 (Wilson *et al.*, 2005), y ambas están correguladas por SF1 y CBLN4 (Bradford *et al.*, 2009). La función que tienen *Vanin-1* y *Cbln4* en el desarrollo testicular todavía no se conoce, pero se sabe que *Amh* codifica la hormona anti-mulleriana, que produce la regresión de los conductos de Müller y su expresión depende de *Sox9* (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

et al., 2006). La inactivación de *Sox9* en 14.0 produce una reducción en la expresión de *Amh*, pero los transcritos que quedan son suficientes para producir la regresión de los conductos de Müller (*Barrionuevo et al.*, 2009). Estudios *in vitro* han revelado la existencia de un lugar de unión de SOX9 en el promotor de *Amh* donde se une SOX9 y mediante interacción de SF1 se activa la expresión de *Amh* (*De Santa Barbara et al.*, 1998). Mutaciones en este lugar de unión producen pérdida de expresión de *Amh* (*Arango et al.*, 1999). En procesos de condrogénesis SOX9 es capaz de unirse a β CAT para inhibir la ruta *Wnt* activando la fosforilación de ésta y produciendo su degradación (*Topol et al.*, 2009).

El hecho de que la expresión de *Sox9* se mantenga tras la formación de los cordones sugiere que este puede tener otras funciones en el desarrollo testicular como la espermatogénesis. Esto se refuerza por el hecho de que al detener la expresión en 14.0 en ratón se produce esterilidad a los 5 meses de vida, aunque los ratones siguen su desarrollo testicular y alcanzan la pubertad (*Barrionuevo et al.*, 2009).

Recientemente se ha revelado que el gen *Sox8*, perteneciente al grupo E de genes *SOX* junto con *Sox9* y *Sox10* es también necesario para el desarrollo testicular y la fertilidad actuando conjuntamente con *Sox9*. La expresión de *Sox8* en células de Sertoli comienza en 12.5 dpc y es probablemente iniciada por *Sox9*, persistiendo hasta después del nacimiento (*Schepers et al.*, 2003; *Chaboissier et al.*, 2004). Ratones mutantes condicionales para *Sox8* muestran un fenotipo similar a que lo son para *Sox9*, sufriendo un fallo en la espermatogénesis a pesar de ser inicialmente fértiles (*O'Bryan et al.*, 2008). Ratones *knockout* incompletos para *Sox9* antes de 11.5 dpc en un fondo genético nulo para *Sox8* muestran reversión sexual XY (*Chaboissier et al.*, 2004). La inactivación de *Sox9* en 14.0 dpc en el mismo fondo genético origina degeneración de los cordones testiculares e infertilidad (*Barrionuevo et al.*, 2009). Se ha demostrado que SOX8 es capaz de activar el promotor de *Amh* pero con menor eficiencia que SOX9 (*Schepers et al.*, 2003). Cuando se elimina *Sox9* y *Sox8* en 14.0, solo quedan niveles residuales de *Amh* y se produce regresión parcial de los conductos müllerianos (*Barrionuevo et al.*, 2009). Además la expresión de *Fgf9* se mantiene, lo que indica que en este punto la función reguladora de *Sox9* no se lleva a cabo, ocurriendo lo contrario con *PTGDS* cuya expresión disminuye en ausencia de *Sox9* (*Moniot et al.*, 2009). Recientemente se ha sugerido que duplicaciones en la región cromosómica donde se encuentra *SOX10* en humanos son capaces de originar reversión sexual en individuos XX, lo que ha sido corroborado con el estudio de ratones con expresión transgénica de este gen (*Polanco et al.*, 2010).

Se ha encontrado expresión de *Wt1* en ausencia de *Sox9* y *Sox8* (*Barrionuevo et al.*, 2009). Este hecho, junto con que la expresión de *Wt1* es necesaria para la expresión de ambos genes, demuestra que *Wt1* ejerce su función aguas arriba de *Sox9* y *Sox8*. Tanto *Wt1* como ambos genes *Sox* son capaces de inhibir la ruta de señalización *Wnt* (*Barrionuevo et al.*, 2009; *Gao et al.*, 2006) necesaria para el desarrollo ovárico.

3. Antecedentes

Además de su influencia en el desarrollo testicular, se ha sugerido que *Sox9* puede tener un importante rol en el desarrollo del folículo en ratón adulto, al haberse encontrado la proteína en el núcleo de las células de la teca interna (Notarnicola *et al.*, 2006).

FGF9

El gen FGF9 se encuentra en la región cromosómica 13q11-12 del cromosoma 13 humano (Mattei *et al.*, 1995) y se compone de 3 exones, codificando una proteína de 208 aminoácidos (Miyamoto *et al.*, 1993). Forma parte de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (*FGF*, *fibroblast growth factors*). Estas proteínas se encuentran implicadas en diversos procesos biológicos como diferenciación, proliferación, migración y supervivencia celular, así como angiogénesis. Se unen a receptores de membrana específicos (FGFRs, fibroblast growth factor receptors), previa interacción con la heparina y originan una cascada de señales intracelulares para llevar a cabo su función (Ornitz and Itoh, 2001).

Fgf9 está involucrado en muchos procesos embriogénicos en el ratón, y por lo tanto se expresa en diferentes tejidos como el bulbo olfativo, la pleura, miocardio, mioblastos, neuronas motoras de la espina dorsal y mesodermo intermedio (Colvin *et al.*, 1999). En el primordio gonadal indiferenciado también se ha encontrado expresión de *Fgf9*, haciéndose específica de individuos XY a partir de 11.5 dpc, al poco tiempo de expresarse *Sry* y localizado en células somáticas de los cordones testiculares (Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).

Se han producido ratones transgénicos para un alelo nulo de este gen (Colvin *et al.*, 2001a,b), que morían durante el nacimiento. El número de hembras en estas camadas era muy superior al de machos, lo que se reveló como reversión sexual al proceder al análisis de gónadas XY y constatar que la mayoría presentaban un fenotipo femenino. Alrededor de 12.5 dpc no se llega a producir la proliferación y diferenciación de células pre-Sertoli, lo cual se deriva en la ausencia de migración celular y no se produce la formación de los cordones testiculares (Colvin *et al.*, 2001a; Schmahl *et al.*, 2004). Tras la activación de *Sry* y *Sox9* en la gónada de ratón, *Fgf9* incrementa en la gónada XY gracias a una retroalimentación positiva de SOX9 con FGF9 y PGD2. La pérdida de la expresión de *Sox9* origina un descenso en la expresión de *Fgf9*, sugiriendo que *Fgf9* se encuentra aguas abajo de *Sox9*. No obstante, a partir de 15.5 dpc, la expresión de *Fgf9* no depende de la de *Sox9* en la gónada masculina de ratón (Barrionuevo *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la ausencia de *Fgf9* no afecta a la expresión de *Sry* ni a la influencia de éste sobre *Sox9*, pero sí al mantenimiento de *Sox9* tras la determinación sexual. La expresión ectópica de *Fgf9* en gónadas XX *in vitro*, activa la expresión de *Sox9*, lo que lleva a suponer que esta proteína puede actuar promoviendo la diferenciación de células de Sertoli (Kim *et al.*, 2006). En estos mutantes se ha observado que prácticamente la totalidad de células germinales entran en apoptosis y aparece

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

expresión de marcadores ováricos en torno a 12.5 dpc (DiNapoli *et al.*, 2006). El análisis de gónadas XY de ratones *Fgf9*^{-/-} y *Ptgds*^{-/-} muestra que estas dos rutas de amplificación de *Sox9* actúan de manera independiente (Moniot *et al.*, 2009). También se ha detectado expresión de *Fgf9* en la gónada XX de ratones transgénicos homocigotos con un alelo nulo para *Wnt4*, lo que sugiere que *FGF9* y *WNT4* pueden actuar de manera antagonista en la determinación sexual (Kim *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito que *FGF9* podría actuar como un inhibidor de la meiosis a través de la activación de *Nanos2*, un gen cuya delección esta asociada a esterilidad en machos y pérdida de células germinales en la vida fetal (Barrios *et al.*, 2010). *FGF9*, por tanto, parece ser esencial para la proliferación y diferenciación de células de Sertoli, mantenimiento de los niveles de *SOX9* en estas células, supervivencia de células germinales XY y represión de genes de la ruta ovárica (Schmahl *et al.*, 2004; DiNapoli *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006).

FGF9 se ha revelado como un importante factor de crecimiento dentro del desarrollo testicular y actúa como mitógeno en la gónada XY temprana. *Fgf9* secretado por células pre-Sertoli estimula la proliferación de células *Sf1*-positivas en el epitelio celómico, lo que origina un aumento de los precursores de células que expresan *Sry* además de otros tipos celulares (Schmahl *et al.*, 2004). Por tanto, *Fgf9* tiene un papel fundamental tanto en la determinación como en la diferenciación sexual. En gónadas XX cultivadas con una alta concentración de *Fgf9* se detectan marcadores testiculares como *Sox9*, *Amh* y *Scx* (Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). Parece que *Fgf9* tiene un papel importante en la producción de esteroides por parte de células de Leydig en estadios postnatales en ratón. Se ha detectado expresión de *Fgf9* en estas células de ratón, además de que *FGF9* es capaz de estimular la producción de testosterona por parte de las mismas de una manera dependiente del momento y de dosis (Lin *et al.*, 2010). También *FGF9* podría tener un papel como regulador local de la función ovárica, como demuestra un reciente estudio donde se detectan niveles de *FGF9* en ovario de rata, además de demostrarse que *in vitro*, *FGF9* estimula la producción de progesterona en células de la granulosa (Drummond *et al.*, 2007).

Acerca del receptor de *FGF9*, *FGFR2*, se ha demostrado que su delección en ratones origina reversión sexual de macho a hembra (Kim *et al.*, 2007b; Bagheri-Fam *et al.*, 2008). Esto indica que la ruta de señalización de *FGF9*, a través de *FGFR2*, es esencial para la determinación sexual masculina, máxime cuando *Fgfr2* muestra un patrón de expresión dimórfico en ratón y se ha demostrado que forma parte de la proliferación específica de testículo y la diferenciación de células de Sertoli (Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007b). *FGF9* es crucial pero no suficiente para inducir la localización nuclear de *FGFR2* (Schmahl *et al.*, 2004). Se ha visto que la unión de *FGF9* a la matriz extracelular está inducida en las gónadas XY en diferenciación (Schmahl *et al.*, 2004). Los componentes glicoprotéico de la matriz extracelular, especialmente proteoglicanos heparina sulfato (HSPGs), actúan como receptores de baja afinidad para *FGF9* además de actuar como depósito para esta proteína.

3. Antecedentes

El grupo de proteínas FGF se encuentran muy conservadas entre los metazoos, encontrándose presentes en invertebrados y vertebrados (Itoh and Ornitz, 2004). Además se han descubierto ortólogos de *FGF9* en Rana rugosa, interviniendo en desarrollo gonadal (Yamamura *et al.*, 2005) y en pollo, con influencia sobre la función de las neuronas motoras (Garces *et al.*, 2000).

AMH

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

Jost (1953) propuso la existencia de una hormona fetal diferente de la testosterona, ya que observó que en embriones XY, el conducto de Müller sufría una regresión. Esta hormona se llamó MIS (mullerian inhibiting substance) o AMH (antimullerian hormone). Posteriormente, el análisis de casos de freemartinismo sugirió que quizás esta hormona estaba implicada en la diferenciación sexual. El freemartinismo es un fenómeno, mediante el cual animales bovinos XX reciben hormona AMH de sus gemelos XY debido a una anastomosis en la placenta, dando como resultado una carencia de conducto de Müller y una masculinización del ovario, con un número reducido de oocitos y unas estructuras que se asemejaban a cordones testiculares (Jost *et al.*, 1975). Las teorías de Jost se confirmaron posteriormente mediante el cultivo de ovarios fetales de rata en presencia de AMH bovina (Vigier *et al.*, 1987) y la generación de ratones transgénicos que sobreexpresaban *Amh* (Behringer *et al.*, 1990).

AMH parece ejercer su función únicamente en órganos reproductivos (Lee and Donahoe, 1993). El principal efecto que provoca AMH es inducir la regresión de los conductos de Müller, precursores de los órganos reproductivos femeninos internos. En ausencia de AMH, en ambos sexos estos conductos se desarrollan dando lugar al útero, trompas de Falopio y la parte alta de la vagina (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991). Pero AMH también se considera un regulador negativo en las etapas tempranas del desarrollo folicular, modulando el crecimiento de éstos e inhibiendo el reclutamiento de folículos no-dominantes (Josso *et al.*, 1998; Durlinger *et al.*, 2000, 2001; Themmen, 2005). Se describió que AMH era capaz de inhibir la primera división meiótica de oocitos en diplotene en ratas inmaduras (Ueno *et al.*, 1989), aunque este hecho no ha podido ser contrastado en otros estudios (Tsafriri *et al.*, 1988). AMH también es capaz de bloquear *in vitro* la proliferación de células granulosa-luteales humanas (Kim *et al.*, 1992), además de que su concentración en fluido folicular es inversamente proporcional al índice mitótico de células de la granulosa *in vivo* (Seifer *et al.*, 1993). AMH, por lo tanto, parece ejercer una regulación autocrina en la maduración de folículos normales. También esta hormona se ha

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

propuesto como un factor involucrado en la respuesta de los folículos ováricos a FSH durante el reclutamiento cíclico (Skinner, 2005). Estudios demuestran que los oocitos activan la expresión de *AMH* en células de la granulosa dependiente del estadio de desarrollo del oocito (Salmon *et al.*, 2004), lo que lleva a suponer que los oocitos del “pool” de folículos en crecimiento podrían controlar al “pool” de folículos primordiales mediante la modulación de la expresión de *AMH*.

En humanos, el gen *AMH* se expresa en la gónada XY alrededor de la séptima semana de gestación, cuando se diferencian las células de Sertoli y se forman los cordones testiculares. Su expresión se localiza en células de Sertoli y se mantienen estos niveles hasta la pubertad, cuando comienzan a descender. La acción de AMH provoca la regresión del conducto de Müller a la novena semana de gestación (Taguchi *et al.*, 1984; De Santa Barbara *et al.*, 2000). En individuos XX, también se detecta expresión tras el nacimiento en células de la granulosa de folículos primarios y en folículos grandes, su expresión se detecta cerca del oocito y en algunas células rodeando el antro. La expresión de *AMH* continúa detectándose en los folículos en crecimiento hasta que han alcanzado el tamaño y la diferenciación necesaria para ser dominantes (Marca *et al.*, 2007). En ratón, la expresión de *AMH* comienza a detectarse en individuos XY a partir de 12.5 dpc en las células de Sertoli, una vez comenzada la diferenciación testicular. Esta expresión se mantiene a lo largo de todo el desarrollo hasta que llega la pubertad, donde, coincidiendo con la primera ronda de espermatogonias que entran en meiosis, se produce una disminución de la transcripción, manteniéndose niveles basales. En individuos XX no se ha encontrado expresión durante el desarrollo embrionario, pero a partir de 6 dpp, se detectan niveles bajos de transcrito en células foliculares, que se mantienen durante toda la época fértil (Munsterberg and Lovell-Badge, 1991). Este gen se ha aislado en diversas especies como el topo (Zurita *et al.*, 2003), la rata (Haqq *et al.*, 1992), el cerdo (Lahbib-Mansais *et al.*, 1997), el pollo (Neeper *et al.*, 1996) y el caimán (Western *et al.*, 1999) y en todas ellas, los niveles de *AMH* se mantienen altos hasta la pubertad. En aves se detecta expresión de *AMH* en el desarrollo embrionario de ambos sexos (Oreal *et al.*, 1998) En el embrión XX de pollo, durante 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, mientras que el individuo XY, ambos conductos de Müller degeneran de forma normal.

Se ha planteado que quizás esta hormona podría ser tóxica para las células germinales meioticas, debido a que sus niveles disminuyen con la entrada en meiosis de espermatogonias en testículo, y que la detección de niveles en hembras se acompaña con una disminución en el número de oocitos (McLaren, 1990). También se ha propuesto que las células germinales junto con la acción de andrógenos podrían originar el descenso en la expresión de *AMH* en la pubertad (Al-Attar *et al.*, 1997).

El sistema de receptores de *AMH* consisten en receptores serina/treonina quinasa con un solo dominio transmembrana de tipo I y de tipo II, donde el tipo

3. Antecedentes

II es el que da la especificidad con el ligando y el tipo I actúa como mediador en la señalización cuando se activa por el tipo II. El receptor de tipo II (AMH-RII) se localiza alrededor del conducto de Müller en la cresta urogenital en ambos sexos en rata y ratón, además de en células de la granulosa y de la teca en ovario de ratas (Ingraham *et al.*, 2000). La pérdida de función de AMH-RII o de AMH son causas del síndrome de conducto de Müller persistente en humanos (Imbeaud *et al.*, 1994).

En la gónada XY de *Talpa occidentalis*, la expresión de AMH se detecta en un estadio tan temprano como s4b en unas pocas células de la región medular. En s5a se expresa en la mayoría de las células de los cordones testiculares en desarrollo. Esto se mantiene en estadios posteriores. En hembras no se ha detectado expresión en ningún estadio del desarrollo (Carmona *et al.*, 2009a,b). En individuos XY adultos no se detectó AMH en ninguno de los estadios estacionales (Dadhich *et al.*, 2011).

En cuanto a su regulación, SF1 activa directamente al promotor de *AMH* y podría además interactuar con otros factores como *SOX8*, *SOX9*, *GATA4* y *WT1* (Shen *et al.*, 1994; Giuli *et al.*, 1997; De Santa Barbara *et al.*, 1998; Nachtigal *et al.*, 1998; Arango *et al.*, 1999; Tremblay and Viger, 1999; Watanabe *et al.*, 2000; Schepers *et al.*, 2003; Chaboissier *et al.*, 2004). Aunque, en aves y caimanes, la expresión de *AMH* es anterior a la de *SOX9*, lo que plantea serias dudas sobre el posible papel regulador de *SOX9* sobre ésta (Oreal *et al.*, 1998; Western *et al.*, 1999). *DAX1* es capaz de reprimir estas interacciones, como lo demuestran experimentos realizados *in vitro* (Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay and Viger, 2001b). No obstante también se ha postulado que *DAX1* podría ser necesario para una expresión correcta de *AMH* (Park *et al.*, 2005). *FOG2* parece que origina la inhibición de la transcripción de *AMH* en la pubertad de individuos XY y durante el desarrollo ovárico (Tremblay *et al.*, 2001; Anttonen *et al.*, 2003).

DHH

DHH (*desert hedgehog gene*) codifica una señal celular de acción local homóloga a la proteína Hedgehog de *Drosophila* (Bitgood and McMahon, 1995). Se encuentra en el locus 12q13.1 del cromosoma 12 de humano y tiene un tamaño de unas 5 Kb. La proteína resultante pesa unos 43 KD y se compone de 396 aa. Este gen pertenece a la familia de genes *HEDGEHOG* (*HH*), clonada por primera vez en *Drosophila* (Hammerschmidt *et al.*, 1997). Esta ruta de señalización se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución (Ingham and McMahon, 2001; Lum and Beachy, 2004; Wang *et al.*, 2007) y se activa mediante la unión de un ligando de esta familia a su receptor *PATCHED* (*PTCH*) (Denef *et al.*, 2000). En ausencia de ligando, *PTCH1* suprime la actividad constitutiva de *SMOOTHENED* (*SMO*), correceptor asociado a proteína G, con lo que unión de *PTCH1* a su ligando elimina esta inhibición (Taipale *et al.*, 2002; Marcotullio *et al.*, 2007; Gulino *et al.*, 2007).

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

y permite la activación de *GLI1*, un factor de transcripción citoplasmático que induce expresión de diversos genes (Lum and Beachy, 2004; Ingham and McMahon, 2001). Esta ruta de señalización se encuentra implicada en numerosos procesos biológicos tanto embrionarios como en adultos (Zhao *et al.*, 2007; Jiang and Hui, 2008). En mamíferos, la familia *HH* esta formada por tres miembros, Desert (*DHH*), Sonic (*SHH*) e Indian (*IHH*) que se unen a los receptores *PTCH1* y *PTCH2*. En vertebrados, estos tres genes muestran muy poco solapamiento en su patron de expresión en tejidos, donde *DHH* es el único expresado en gónada (Bitgood and McMahon, 1995) siendo clave tanto en procesos de desarrollo gonadal como espermatogénesis (Walterhouse *et al.*, 2003).

Los ratones macho homocigotos para una mutación nula de *Dhh* carecen de células de Leydig que produzcan testosterona y presentan fibrosis intersticial, además de desarrollar una lamina basal anormal entre las células mioides peritubulares y las de Sertoli, que parece contribuir al desarrollo de túbulos seminíferos anastomóticos e irregulares (Clark *et al.*, 2000; Pierucci-Alves *et al.*, 2001). Además, estos ratones muestran carencia de espermatozoides maduros, ya que la espermatogénesis queda bloqueada en paquitene (Bitgood *et al.*, 1996). El hecho de que espermatozoides primarios y secundarios expresan *Ptch2*, indica que se encuentra reguladas por la ruta *Dhh* lo que concuerda con este fenotipo. No se sabe si los efectos que origina la ausencia de *Dhh* sobre la espermatogénesis es un efecto directo o es consecuencia de la falta de testosterona provocada por las alteraciones en las células de Leydig. Por lo tanto, se creía que la señalización de *Dhh* en espermatogénesis ocurría via *PTCH2*. No obstante, un reciente estudio (Morales *et al.*, 2009) describió que *Ptch1* también se expresa en espermatozoides primarios en diplotene de la profase de la primera división meiótica y aumentando en espermatozoides redondas postmeióticas procediendo a disminuir gradualmente hasta desaparecer en espermatozoides condensadas maduras. También se ha descrito un tercer receptor de la ruta *Hh*, *Ptc3*, el cual se detecta específicamente en células germinales y masculinas y también podría estar implicado en espermatogénesis.

En células de Leydig, células mioides peritubulares y células endoteliales se detecta expresión de *Ptch1*, lo que indica que en estas células la ruta de señalización *Dhh* ejerce su acción vía células de Sertoli (Bitgood *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2002). El uso de ciclopamina para inhibir la ruta de señalización de *Dhh* hace que la expresión de *Ptch1* disminuya en células intersticiales y que las células de Leydig fetales no se diferencien correctamente, muy parecido al fenotipo que muestran las gónadas XY de ratones *knockout* para *Dhh* (Bitgood *et al.*, 1996; Clark *et al.*, 2000; Yao *et al.*, 2002). También las células de Sertoli podrían tener una regulación paracrina, ya que se ha detectado la presencia de *Gli1* en estas células, aunque la inhibición de la ruta no impide la diferenciación de células de Sertoli (Kroft *et al.*, 2001; Yao and Capel, 2002)).

Ciertas 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 (Umehara *et al.*, 2000; Canto

3. Antecedentes

et al., 2004, 2005). Estos datos indican que DHH es una proteína necesaria para la espermatogénesis y la diferenciación de las células de Leydig, tanto fetales como adultas.

A pesar de que los ratones XX *knockout* para *Dhh* son totalmente fértiles, recientemente, se ha demostrado que la ruta *Hh* se encuentra activa en el ovario de ratón, detectándose transcritos de *Ptch1* y *Gli1* en células de la teca y *Dhh*, *Ihh* en células de la granulosa, mientras que se detecta proteína PTCH1 en células de la teca y de la granulosa (Wijgerde *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2007). Se ha visto que la ruta *Hh* es funcional en células de la granulosa y se encuentra implicada en la formación del folículo. Esto hace pensar que aunque *Dhh* no parece esencial para la función ovárica, quizás *Ihh* y *Shh*, que también se expresan en ovario, podrían ejercer la función de *Dhh*, compensando así su ausencia en estos ratones. Sin embargo, es muy probable que esta ruta se active en el ovario tras el nacimiento, ya que la activación ectópica de ésta durante la vida fetal en células somáticas SF1-positivas, lo que origina una diferenciación de células de Leydig independiente de células de Sertoli que provoca una masculinización del embrión o pseudohermafroditismo, a pesar de que estos ovarios continúan expresando marcadores ováricos como *Wnt4* y *Fst* (Barsoum *et al.*, 2009).

En ratón, *Dhh* se expresa en las células de Sertoli poco después de que lo haga *Sry*, siendo uno de los genes de la ruta masculina que antes comienza a expresarse (Bitgood *et al.*, 1996). Esta expresión continúa hasta la edad adulta. En hembras, se detecta el transcrito de *Dhh* con bajos niveles en el momento del nacimiento, pasando a incrementarse en torno al 4 día de vida y manteniéndose con unos niveles elevados en prepubertales y adultos (Russell *et al.*, 2007). En torno al día 4, algunos folículos primordiales comienzan a crecer, lo que podría contribuir al incremento de la expresión de *Dhh*.

PTGDS

El gen que codifica la enzima prostaglandin D2 sintetasa se encarga de convertir prostaglandin H2 en prostaglandin D2 (PGD2), que tiene un efecto masculinizante en explantes cultivados de gónada XX (Adams and McLaren, 2002). Este efecto se produce debido a que PGD2 es capaz de estimular la transcripción de *Sox9* y tiene un efecto sobre el paso al núcleo via cAMP/PKA de la proteína que este gen origina (Wilhelm *et al.*, 2005; Malki *et al.*, 2005b). Este gen se encuentra en el cromosoma 9 en el locus 9q34.3 y tiene un tamaño de unas 8 Kb. Codifica una proteína de 21 Kd y 190 aminoácidos.

Los ratones XY mutantes *Ptgds*^{-/-} mostraban un retraso en la diferenciación de las células de Sertoli hasta 13.5 dpc, probablemente debido a que se retarda la translocación nuclear de SOX9, además de niveles de expresión reducidos de *Sox9* y *Amh* y alteraciones en la morfología de los cordones testiculares, que aparecían frecuentemente anastomosados (Moniot *et al.*, 2009). Esto prueba la existencia de un bucle de amplificación entre *Sox9* y *Ptgds*. Tras

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

la translocación nuclear de SOX9, éste está implicado en los bucles regulatorios *Ptgds/Sox9* y *Fgf9/Sox9*. No obstante, en las gónadas de mutantes XY *Fgf9*^{-/-}, el comienzo la expresión de *Ptgds* no se veía afectada, lo que muestra que FGF9 no se requiere para la activación de este gen y que ambos genes actúan por vías diferentes y cooperan en la regulación positiva de *Sox9* (Moniot *et al.*, 2009).

Wilhelm *et al.* (2007) describieron que el gen *Ptgds* se expresa en células de Sertoli justo después de que comience a hacerlo *Sox9*. El análisis *in silico* en *in vitro* del promotor de este gen mostró que tanto SRY como SOX9 podían unírsele, no obstante, el análisis *in vitro* demostró que únicamente SOX9 era capaz de hacerlo. Además, la activación ectópica de *Sry* en ratones transgénicos no afectaba la expresión de *Ptgds*. Se generaron ratones *Ck19-Cre; Sox9*^{flox/flox}, que eran mutantes que portaban un alelo nulo condicional para *Sox9*, con la recombinasa Cre bajo el control de *Ck19* que se expresa tras la implantación del embrión en ratón (Moniot *et al.*, 2009; Barrionuevo *et al.*, 2009). El análisis de gónadas XY en 11.5 dpc mostraba niveles de *Ptgds* comparables a los de gónadas XX sugiriendo que éste se encuentra bajo el control de SOX9 y no de SRY.

El análisis de gónadas ratones XY mutantes *Amh-Cre; Sox9*^{flox/flox} donde *Sox9* se encuentra totalmente suprimido en 14.5 dpc muestra que los niveles de *Ptgds* disminuyen considerablemente (Moniot *et al.*, 2009). Este hecho demuestra que SOX9 es esencial para el mantenimiento de la expresión de *Ptgds*.

El cruce de ratones *Dax1*^{-/-} con la cepa C57BL/6J originaba algunos individuos XY que presentaban reversión sexual con unos niveles reducidos de *Ptgds*, lo que ayudaría a explicar estos casos. Esto induce a pensar que quizás *Dax1* es necesario para la expresión adecuada de *Ptgds* (Park *et al.*, 2008).

En algunos casos de cáncer ovárico se han detectado niveles tanto de mRNA como de mensajero de la ruta *Ptgds/Sox9*, proponiendo un posible uso de ambos como marcadores tumorales tempranos (Malki *et al.*, 2007).

En ratón, se ha descrito expresión en la gónada bipotencial XY y XX antes de 11.5 dpc, haciéndose específica de la gónada XY posteriormente. Este patrón de expresión es en forma de ola, al igual que presentan *Sry* y *Sox9* en el testículo embrionario (Wilhelm *et al.*, 2007). En torno a 11.5 dpc se detectan transcritos de *Ptgds* en el centro de la gónada, justo después de que comience la expresión de *Sox9*. Entre 11.5 y 14.5 dpc se observa expresión en células de Sertoli y en 13.5 además en proespermátogonias (Adams and McLaren, 2002). Expresión de ambos tipos celulares también se ha detectado en testículo de rata adulto (Samy *et al.*, 2000). De igual manera, en células de Leydig de testículo adulto se ha encontrado la proteína (Gerena *et al.*, 2000). Esto hace pensar en que esta proteína podría jugar un papel en la función y desarrollo testicular adulto.

AR

El gen del *receptor de andrógenos* (AR) se localiza en humanos en el cromosoma X en la posición Xq11-q12 (Lubahn *et al.*, 1988). Ocupa unas 90 kb

3. Antecedentes

y se compone de 8 exones, codificando una proteína de 919 aminoácidos, cuya masa molecular es de 110 kDa.

Pertenece a la superfamilia de receptores nucleares para hormonas esteroides junto con los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona y estrógenos. Al igual que los miembros de esta familia, contiene un dominio N-terminal (NTD), otro de unión al DNA (DBD) y un dominio de unión a la hormona (LBD). El dominio NTD es el que muestra más variabilidad, mientras que los otros se encuentran muy conservados entre especies, y además contiene el dominio de activación (AF1), el cual se vuelve constitutivamente activo al eliminar el dominio LBD (Simental *et al.*, 1991). El dominio DBD contiene dos motivos de dedos de zinc implicados en el reconocimiento del DNA y estabilización de la unión a éste y en la homodimerización del receptor (Gelman, 2002). Este gen sufre *splicing* alternativo en la región 3', originándose dos transcritos diferentes (Faber *et al.*, 1991). La región promotora del receptor de andrógenos contiene una región rica en CG, la cual interviene en la transcripción del gen, además de unirse al factor de transcripción SP1 (Tilley *et al.*, 1990).

En el interior de la célula, el AR se encuentra en el citoplasma formando parte de un complejo multiproteínico (Heemers and Tindall, 2007). Al difundir la testosterona al interior de la célula e interactuar con el AR, éste se libera del complejo, originándose la fosforilación del receptor y produciéndose su migración hacia el núcleo. Mediante la unión a elementos de respuesta androgénica (AREs) que se encuentran presentes en la región promotora de diversos genes, AR regula la expresión de éstos. Para la unión de AR al DNA es indispensable que se produzca la homodimerización del mismo (Wong *et al.*, 1993). Tras la unión a AREs y su homodimerización, AR actúa directamente con componentes de la ruta de transcripción general o recluta otros componentes como proteínas correguladoras y factores de transcripción. Se ha demostrado que AR es capaz de promover la expresión de genes como *SRY*, *DAX1* o *AP1* (Kallio *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 2001).

La testosterona y dihidrotestosterona, además de los andrógenos sintéticos son capaces de disminuir los niveles de transcrito de AR (Krongrad *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1993; Yeap *et al.*, 1999). Por otra parte, los andrógenos también son capaces de aumentar los niveles de AR gracias a la estabilización de la proteína (Kempainen *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1995).

Durante la vida fetal, los andrógenos son responsables del desarrollo testicular y la estabilización del conducto de Wolff y el desarrollo de los genitales externos (revisado por Patrão *et al.*, 2009). Las células de Leydig fetales son las que se encargan de producir testosterona en torno a la octava semana de gestación en humanos y 13 dpc en ratón. La testosterona estimula la expresión de *AR*, observándose una expresión del mismo en células intersticiales. En torno al nacimiento también se comienza a detectar la presencia del mismo en el interior de los cordones, concretamente en células de Sertoli (You and Sar, 1998; Rey *et al.*, 2009). En ratones adultos, AR se detecta en células de Sertoli, células

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

mioides peritubulares, células de Leydig y células musculares perivasculares (Sar *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002). En algunas especies también se ha descrito expresión en células germinales (revisado por Wang *et al.*, 2009).

Parece ser que *AR* también tiene funciones en el ovario. En vertebrados como en rana y peces se ha demostrado que los andrógenos actúan promoviendo la maduración de los oocitos (Smith and Ecker, 1971; Maller and Krebs, 1980; Smith and Tenney, 1980; Lutz *et al.*, 2001; Gill *et al.*, 2004; Hammes, 2004). En ratones, sin embargo, parece que los andrógenos no tienen tanto peso en estos procesos y son las gonadotropinas las que tienen un papel fundamental en la maduración meiótica (Eppig, 1991; Fan and Sun, 2004). A pesar de esto, se ha demostrado que los andrógenos promueven la maduración de los complejos oocitos-células de la granulosa y oocitos-células del cúmulo folicular en ratón (Jamnongjit *et al.*, 2005). Parece ser que conforme subimos en la escala evolutiva, el papel de *AR* y de los andrógenos va perdiendo su función en folículos ováricos ((revisado por Li *et al.*, 2009). Se ha detectado presencia de mensajeros o proteína de AR en células de la granulosa, de la teca y del estroma, además de en oocitos en el ovario de ratón (Cheng *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2004). Este patrón de expresión celular cambia según la especie estudiada ((revisado por Li *et al.*, 2009).

DMRT1

El gen *DMRT1* pertenece a la familia de genes *DMRT* (*DSX- and MAB3-related transcription factors*), los cuales se encuentran implicados en procesos de determinación sexual y desarrollo gonadal en vertebrados e invertebrados (Zarkower, 2001; Volff *et al.*, 2003). EN concreto, *DMRT1* pertenece a un grupo, junto con *DMRT2* y *DMRT3*, que se encuentra conservado en aves, peces y ratón (Nanda *et al.*, 1999, 2000; Brunner *et al.*, 2001; Ottolenghi *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). Este gen se encuentra localizado en el cromosoma 9 humano, en el locus 9p24.3. Su tamaño es de aproximadamente 27 kb y está formado por 5 exones que codifican una proteína de 374 aminoácidos. La familia génica a la que pertenece son factores de transcripción que presentan un dominio de unión al DNA que se llama dominio DM y que es similar a los dedos de zinc. Este dominio se describió por vez primera en las proteínas MAB-3 de *C. elegans* y doublesex (DSX) de *D. melanogaster* (Raymond *et al.*, 1998). En la proteína DMRT1 el dominio DM se localiza cerca del extremo amino y presenta una homología del 67% y 50% con el de DSX y MAB-3 respectivamente (Raymond *et al.*, 1999b). En el resto de la proteína, la región rica en prolina y serina, localizada en el extremo carboxi-terminal, es la única que tienen en común las 3 especies (Ottolenghi *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 1999b). Se han identificado dos isoformas de DMRT1 en humanos, DMRT1b de 275 aminoácidos y DMRT1c de 175 aminoácidos, ambas originadas por maduración alternativa.

Se han descrito casos de reversión sexual y disgenesia gonadal en sujetos XY, cuyo análisis reveló que la causa eran deleciones subtelo méricas en el brazo

3. Antecedentes

p del cromosoma 9 (Huret *et al.*, 1988; Bennett *et al.*, 1993; Ogata *et al.*, 1997; Veitia *et al.*, 1997; McDonald *et al.*, 1997; Flejter *et al.*, 1998; Guioli *et al.*, 1998; Raymond *et al.*, 1999b; Pfeiffer *et al.*, 1999; Shan *et al.*, 2000; Muroya *et al.*, 2000; Vialard *et al.*, 2002; Ounap *et al.*, 2004; Privitera *et al.*, 2005). Posteriormente se identificó la region cromosómica mínima que era capaz de originar reversión sexual, a la que se denominó TD9 (Hoo *et al.*, 1989). Aunque no se consiguió aislar ningún gen en este locus, finalmente el gen *DMRT* se localizó a 30 Kb de esta región, ya que se encontraba deletado en estos casos de reversión sexual (Ottolenghi and McElreavey, 2000; Raymond *et al.*, 1999b, 1998).

Los ratones *knockout* para *Dmrt1*, no mostraban alteraciones en los procesos de determinación sexual o desarrollo de la gónada, lo que en un principio descartó su implicación en estos procesos. Estos mismos ratones sí presentaban graves defectos en la diferenciación masculina tras su nacimiento, donde las células de Sertoli fracasaban en su diferenciación y proliferaban excesivamente llenando la luz de los cordones testiculares, y las células germinales no llegaban a migrar a los túbulos, muriendo prematuramente. Estos datos descartaron en un principio la implicación de *DMRT1* en la gonadogénesis temprana, pero sí durante el desarrollo testicular después del nacimiento (Raymond *et al.*, 2000). Kim *et al.* (2007b), inactivaron condicionalmente *DMRT1* en líneas de células de Sertoli y células germinales mediante transgenes Cre específicos de cada tipo celular para comprobar si la pérdida de células germinales en los mutantes anteriores era un defecto celular autónomo o una consecuencia indirecta de la alteración de las células de Sertoli. Este estudio mostró que *DMRT1* en células de Sertoli es requerido autónomamente para su correcta diferenciación, y no autónomamente para la supervivencia de células germinales tras la segunda semana después del nacimiento.

La expresión de *Dmrt1* en ratón comienza a detectarse a partir de 10.5 dpc en la gónada indiferenciada de ambos sexos. En torno a 12.5 dpc, la expresión comienza a desaparecer en ovarios y aumenta en las células germinales premeioticas y en las de Sertoli dentro del testículo, donde se mantiene unos niveles altos hasta alcanzar la edad adulta (Raymond *et al.*, 1999a, 2000; De Grandi *et al.*, 2000). En humanos, su expresión se detecta por primera vez en la sexta semana de gestación en la gónada indiferenciada XY y en la séptima semana se localiza en las células pre-Sertoli de los cordones testiculares. En la gónada femenina, por el contrario, no se detecta expresión (Moniot *et al.*, 2000).

En topo, *DMRT1* se localiza en el núcleo de las células de la médula del primordio gonadal XY. En e5a, las células positivas son las que se encuentran en los cordones y en estadios posteriores se observa que las células positivas son las de Sertoli. En la gónada XX temprana (s4b), *DMRT1* se observa en núcleos de células corticales. Esta expresión disminuye en células somáticas en estadios posteriores y se mantiene en PGCs. Las células somáticas de la región medular presentan una débil expresión hasta el estadio s5c, a partir del cual, ésta desaparece (Carmona *et al.*, 2009b). En individuos adultos, la expresión de *DMRT1* varía dependiendo del ciclo espermatogénico y estacional. Las gónadas

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

de individuos inactivos mostraban una gran reducción en los niveles de *DMRT1* comparados con los detectados en individuos activos. En los túbulos que se encontraban en los estadios espermatogénico I-VI, la mayoría de células que expresan *DMRT1* eran las de Sertoli, mientras que en los que se encontraban en los estadios VII-X, la expresión provenía mayoritariamente de células germinales (Dadhich *et al.*, 2011).

Se ha clonado *DMRT1* en muchas especies y revelándose éste como un gen con mucha importancia en los procesos de gonadogénesis. *DMRT1* se encuentra ligado al sexo en aves, localizándose en el cromosoma Z y siendo necesarias 2 copias activas de este gen para que se produzca un desarrollo testicular normal (ZZ) y una para el ovárico (ZW) (Raymond *et al.*, 1999a; Nanda *et al.*, 1999, 2000). Mediante el uso de RNA interferente (RNAi), Smith *et al.* (2009) eliminaron la expresión de *DMRT1* en embriones tempranos de pollo, lo que produjo feminización de las gónadas de embriones macho (ZZ). Esta feminización era parcial y mostraba una sensibilidad diferencial a *DMRT1* entre la gónada derecha y la izquierda.

En reptiles, se encuentra expresión de este gen en la gónada temprana de ambos sexos, pero la expresión es mucho mayor en los embriones que se incuban a las temperaturas adecuadas para originar machos (Smith *et al.*, 1999a; Kettlewell *et al.*, 2000; Torres Maldonado *et al.*, 2002; Murdock and Wibbels, 2003). *DMRT1* también ha sido detectado en células intersticiales y de Sertoli en testículos de anfibios un mes después de la metamorfosis y también en células germinales de adulto, pero no durante el desarrollo ovárico (Shibata *et al.*, 2002; Aoyama *et al.*, 2003). En peces teleosteos, se ha descrito expresión en testículos (Marchand *et al.*, 2000; Brunner *et al.*, 2001; Veith *et al.*, 2003) y en el pez medaka, se ha encontrado una copia funcional de *DMRT1* dentro del cromosoma Y (Nanda *et al.*, 2002; Matsuda *et al.*, 2002). También se han identificado genes que comparten el dominio DM, como *MAB-3*, necesario para la diferenciación sexual masculina de *C. elegans* (Shen and Hodgkin, 1988) o *DSX*, cuya proteína resultante se encarga de la diferenciación sexual somática tanto en machos como en hembras mediante maduración alternativa en *D. melanogaster* (Burtis and Baker, 1989).

En *C. elegans* y *D. melanogaster*, *DMRT1* se encuentra regulado por la proteína YOLK (Yi *et al.*, 2000; Yi and Zarkower, 1999). Se ha descubierto que en rata, los factores de transcripción GATA4, EGR1 y SP1 pueden estar implicados en la regulación de *DMRT1* (Lei and Heckert, 2002, 2004). En anfibios, un exceso de andrógenos, que origina casos de reversión sexual, provoca un aumento en la expresión de *DMRT1* (Shibata *et al.*, 2002). En peces y reptiles, la presencia de estrógenos, cuyo exceso provoca feminización origina una inhibición de *DMRT1* (Marchand *et al.*, 2000; Murdock and Wibbels, 2006). En pez Zebra, se ha descubierto que en estadios tempranos del desarrollo, *DMRT1* se inhibe por la acción de SOX5 (Gao *et al.*, 2005).

Finalmente, otras proteínas de la misma familia se encuentran implicadas en procesos de gonadogénesis al igual que *DMRT1*. En ratón, se ha detectado expresión de *Dmrt3*, *Dmrt4* y *Dmrt7*. Ratones mutantes para *Dmrt4*, mostraban

3. Antecedentes

foliculos poliovulares en la hembra y machos con tendencias copulatorias hacia otros machos (Balciuniene *et al.*, 2006), y los *knockout* para *Dmrt7*, presentaban infertilidad con arresto espermatogénico en paquitene y modificaciones anormales de la cromatina sexual (Kawamata and Nishimori, 2006; Kim *et al.*, 2007a). En humanos, mutaciones en *DMRT2* se han asociado con disgénesis gonadal y reversión sexual XY y con presencia de ovotestes en machos (Raymond *et al.*, 1999b; Muroya *et al.*, 2000; Ounap *et al.*, 2004). En medaka, *DMRT3* muestra expresión diferencial en el testículo, mientras que *DMRT2* se expresa de forma similar en gónadas de ambos sexos (Brunner *et al.*, 2001). También *DMRT4* se ha descrito en el pez teleosteo *Tilapia* como un gen específico de ovario (Guan *et al.*, 2000), sin embargo, en medaka se expresa también en testículo (Kondo *et al.*, 2002).

DAX1

El gen *DAX1* (*DSS-AHC critical region on the X chromosome, gene 1*), también conocido como *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily type 0, group B, member 1 gene*), se localiza en la banda Xp21 del cromosoma X, y consta de 2021 nucleótidos. Este gen se encuentra ligado al sexo y se compone de 2 exones, originando una proteína de 470 aminoácidos. Es un receptor huérfano que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares (Bae *et al.*, 1996). El extremo C-terminal presenta un dominio de unión a ligando (ligand-binding domain, LBD), con 2 dominios silenciadores de la transcripción a ambos lados de éste (Lalli *et al.*, 1997). El extremo N-terminal presenta un dominio de unión al DNA (DNA-binding domain, DBD), con 3.5 repeticiones de una secuencia de 65-67 aminoácidos, en la que se encuentran 2 motivos de dedos de cinc (Guo *et al.*, 1996; Lalli *et al.*, 1997).

Las mutaciones en *DAX1* pueden originar hipoplasia adrenal congénita (AHC), que presenta insuficiencia adrenal con deficiencia en glucocorticoides y mineralocorticoides (Phelan and McCabe, 2001) e hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) en individuos XY (Zanaria *et al.*, 1994). Las duplicaciones en la región del cromosoma X que contiene a *DAX1* originan reversión sexual sensible a la dosis (DSS, dosage-sensitive sex-reversal) (Bardoni *et al.*, 1994; McCabe, 1996). Esta patología se caracteriza por disgenesia gonadal y el desarrollo de genitales externos ambiguos o femeninos en individuos XY.

Los ratones transgénicos XY con copias adicionales del ortólogo de *DAX1* de ratón expresado a niveles altos no presentan reversión sexual de macho a hembra, pero mostraban un desarrollo testicular retrasado, con disminución de los niveles de *Sry* en 11.5 dpc. El cruce de estas hembras transgénicas con machos *poschiavinus* que tiene un alelo débil del gen *Sry*, originaba una descendencia con reversión sexual completa (Swain *et al.*, 1998).

Los experimentos *in vitro* han constatado que *DAX1* antagoniza la función activadora de SF1 sobre diversos genes implicados en la esteroidogénesis (Gurates *et al.*, 2003). Por tanto, no es descabellado suponer que los casos de

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

ACH pueden estar causados por mutaciones en el dominio LBD, que reduciría su efecto antagonista (Ito *et al.*, 1997; Achermann *et al.*, 2001). Igualmente, la interacción entre SF1 y DAX1 podría ser similar en el desarrollo gonadal, como demuestran experimentos de cultivo celular que muestran que DAX1 es capaz de reprimir la cooperación de SF1 con GATA4 y WT1 a la hora de activar el promotor de *AMH* (Nachtigal *et al.*, 1998; Tremblay and Viger, 2001b). No obstante, esta interacción se ha puesto en duda por estudios que muestran que ambas proteínas cooperan para activar genes de la ruta masculina en células somáticas de la gónada XY (Park *et al.*, 2005). DAX1 también podría tener un papel en la regulación post-transcripcional, mediante unión directa al RNAm y a los polirribosomas (Lalli *et al.*, 2000).

El rol de *DAX1* en los procesos de desarrollo gonadal ha sido objeto de estudio debido a resultados contradictorios. El estudio de pacientes con DSS, los cuales presentan cariotipo 46XY y no desarrollan testículos, desveló que tenían duplicada una región de 160 kb en el cromosoma X que contenía el gen *DAX1* además de genes de la familia *DAM* (*DSS-AHC critical interval MAGE*), los cuales se encuentran relacionados con la familia *MAGE* (*melanoma antigen gene family*), cuyos miembros codifican antígenos asociados a tumores (Bardoni *et al.*, 1994). Se propuso una hipótesis por la cual *DAX1* tendría una función anti-testículo, antagonizando la función de *SRY* de manera dosis-dependiente (Jiménez *et al.*, 1996). Estudios posteriores apoyaron esta teoría, mostrando que ratones que expresaban *Dax1* en niveles bastante superiores a los normales presentaban un retraso en el desarrollo sexual y reversión sexual de macho a hembra (Swain *et al.*, 1998). Aunque los casos de AHC, donde los individuos tenían delecionada una copia de *DAX1* y presentaban anomalías testiculares aunque no reversión sexual, ponían en entredicho estas teorías (Muscatelli *et al.*, 1994).

Posteriormente, se sugirió que quizás *DAX1* es necesario para una correcta diferenciación testicular, basado en diferentes trabajos como el estudio de ratones con una deleción en el exón 2 de *Dax1*, que codifica el dominio LBD, donde los machos adultos *Dax1*-/Y mostraban testículos más pequeños con un desarrollo deficiente del epitelio germinativo y pérdida de células germinales, y las hembras (*Dax* -/-) mostraban un aparato reproductor normal y eran fértiles (Yu *et al.*, 1998). Mas tarde se procedió al análisis del desarrollo gonadal en estos ratones, descubriendo que el desarrollo testicular era normal hasta 13.5 dpc donde algunos cordones testiculares se mostraban desorganizados e incompletos (Meeks *et al.*, 2003a). Los mismos autores evaluaron los posibles efectos del alelo con la deleción en ratones *poschiavinus* que tiene un alelo débil del gen *Sry*, lo cual originaba una descendencia con reversión sexual completa (Meeks *et al.*, 2003b). La expresión de *Sry* en estos ratones no se veía afectada, haciendo pensar que *DAX1* puede influenciar en la activación de *Sox9*. Más tarde, Bouma *et al.* (2005) evaluaron las posibles consecuencias de este alelo en la cepa de ratones B6, que muestra sensibilidad a cambios en determinismo del sexo (Eicher *et al.*, 1982; Eicher and Washburn, 1986; Eicher *et al.*, 1996)) y también en la cepa D2, donde los ratones XY desarrollan testículos en las

3. Antecedentes

condiciones en que los B6 desarrollan ovarios u ovotestes (Eicher *et al.*, 1996). Este estudio reveló que ratones $Dax1^{-}/Y$ B6 sufren reversión sexual completa, mientras que los $Dax1^{-}/Y$ D2 desarrollan testículos anormales. Además, no se activa la expresión de *Sox9* en los ratones $Dax1^{-}/Y$ B6, a pesar de que presentan niveles normales de *Sry*. Al aumentar la expresión de *Sry* mediante la adición de un constructo con múltiples copias en los embriones $Dax1^{-}/Y$ B6, el desarrollo ovárico es bloqueado. Estos investigadores identificaron un gen localizado en el cromosoma 4 implicado en la reversión sexual de los ratones B6 XY, al que denominaron *Tda1* (*testis-determining autosomal 1*), lo que les llevó a sugerir que la proteína que éste origina, junto con DAX1 y SRY, regulan la expresión de *Sox9*. También el análisis de ratones transgénicos con un copia nula para *Dax1* y otra para *Sf1* reforzó la idea de que DAX1 actúa en la gonadogénesis masculina cooperando de manera sinérgica con SF1 (Park *et al.*, 2005). La pérdida de una copia activa de *Sf1* origina una disminución de marcadores sertolianos y de células de Leydig fetales durante la diferenciación testicular. La pérdida de un alelo activo de *Dax1* aumentaba estos efectos en lugar de contrarrestarlos lo cual respaldaba esta idea.

Parece claro, por tanto, que los niveles de *DAX1* son críticos a la hora de ejercer su función, puesto que una sobreexpresión origina unos efectos similares a una baja expresión. Estos valores superiores e inferiores en la ventana de expresión óptima de *DAX1* parecen alterar la función de éste en el desarrollo testicular (Ludbrook and Harley, 2004) El hecho de que las duplicaciones en este gen originen reversión sexual en humanos y en ratón solamente defectos en el desarrollo del testículo indican que probablemente este rango debe diferir entre especies (Swain *et al.*, 1998).

Se ha observado que la expresión de *DAX1* está ligada a la de *SF1*, tal y como lo demuestran estudios en los que se observa expresión conjunta de ambos genes en tejidos embrionarios y adultos de ratón como las glándulas adrenales y la pituitaria, el hipotálamo y las gónadas (Ikeda *et al.*, 1996), sugiriendo que *DAX1* se encuentra involucrado en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En ratón, *Dax1* se expresa en el primordio gonadal de ambos sexos justo después de que se exprese *Sf1*. En gónada XY, esta expresión se ve incrementada en células de Sertoli en 12.5 dpc disminuyendo poco después. En células intersticiales entre 13.5 y 17.5 dpc aumenta la expresión de *Dax1*. En gónadas XX, la expresión de *Dax1* aumenta en torno a 12.5 dpc hasta 14.5 dpc, cuando comienza a disminuir (Ikeda *et al.*, 2001). En humanos, *DAX1* se detecta en la gónada indiferenciada en ambos sexos, localizándose más tarde en células de Sertoli en el testículo y en células somáticas en ovario en desarrollo (Hanley *et al.*, 2000).

En el primordio gonadal XY de *Talpa occidentalis* se observa expresión de DAX1 tanto en la médula como en la corteza, mostrando una gran intensidad en el estadio s5a. En s5b y 5c, esta expresión disminuye y se localiza en células de Sertoli, y PGCs. A partir de s5c también se observa expresión en células de Leydig. En la gónada temprana XX, la expresión de DAX1 es muy parecida a la de la gónada XY. En s5a, sólo se detecta la proteína en la región medular. En el estadio s5b se observa expresión en la corteza, pero más débil que en la médula.

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

En s5c, esta expresión disminuye en toda la gónada, pero manteniéndose en PGCs.

Este gen se encuentra muy conservado entre especies. Se han identificado ortólogos de *DAX1* tanto en invertebrados (Alonso *et al.*, 2001), como en aves (Smith *et al.*, 2000), reptiles (Western *et al.*, 2000), anfibios (Sugita *et al.*, 2001), peces (Wang *et al.*, 2002) y primates (Patel *et al.*, 2001).

Las secuencias silenciadores que se encuentran a ambos lados del LBD podrían ser diana para dos correpresores, NCoR (nuclear correpressor) y Alien, mediante la formación de complejos implicados en la inactivación de promotores (Crawford *et al.*, 1998; Altincicek *et al.*, 2000). Alien presenta una localización testicular (Schaefer *et al.*, 1999).

Algunas isoformas -KTS de WT1 podrían activar al promotor de *DAX1* en las primeras etapas de la gonadogénesis (Kim *et al.*, 1999). También el análisis de individuos con duplicación de *WNT4* presentan sobreexpresión de *DAX1*, lo cual hace pensar que WNT4 puede activar directa o indirectamente a *DAX1* (Jordan *et al.*, 2001; Mizusaki *et al.*, 2003).

RSPO1

Este gen se encuentra localizado en el locus 1p34.3 del cromosoma 1 humano y tiene un tamaño de aproximadamente 23 Kb. Codifica una proteína de 263 aminoácidos de unos 28 959 Da. *R-SPONDIN1*. (*RSPO1*) pertenece a una familia de factores de crecimiento compuesta por cuatro miembros que codifican proteínas de secreción ricas en cisteína que comparten un péptido de señalización N-terminal (SP), dos dominios furina (FU), un dominio trombospondina (TSP1) y una señal de putativa localización nuclear (NLS) (Kazanskaya *et al.*, 2004; Kamata *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2002). Los dominios FU son necesarios para la interacción con la ruta de señalización *WNT/βCAT* que puede ser activada por cualquiera de los miembros de la familia *R-SPONDIN*, al menos *in vitro*. Todos los miembros de esta familia desempeñan un importante rol en multitud de procesos del desarrollo, y mutaciones en los mismos originan fenotipos con graves alteraciones, siendo *RSPO1* esencial en la determinación sexual en humanos (Parma *et al.*, 2006) o el desarrollo de la glándula mamaria (Chadi *et al.*, 2009), además de presentar efectos mitogénicos en el epitelio intestinal (Kim *et al.*, 2005).

El estudio de hombres XX (*SRY* negativos), de una familia italiana consanguínea, que presentaban graves alteraciones como hiperqueratosis palmoplantar y predisposición a carcinoma de células escamosas, permitió asociar una mutación en el gen *RSPO1* a este cuadro clínico (Parma *et al.*, 2006). Los pacientes presentaban genitales externos masculinos con hipospadia, grave hipogenitalismo o ambigüedad en los genitales externos. Además, el análisis de sus genitales mostraba estructuras testiculares con hiperplasia nodular de células de Leydig en el *propositus* mientras que en otros mostraban ovotestes con tejido ovárico

3. Antecedentes

(Micali *et al.*, 2005; Radi *et al.*, 2005; Tomaselli *et al.*, 2008). Estos fenotipos sugieren una insuficiencia de hormonas masculinas esteroideogénicas

Los Ratones XX *Rspo1*^{-/-} mostraban reversión sexual variable que iba desde gónadas hipoplásicas a ovotestes (Chassot *et al.*, 2008b; Tomizuka *et al.*, 2008). Estas gónadas presentaban partes con cordones testiculares y otras con grupos de oocitos en paquitene. En el adulto, la porción donde se encontraban los túbulos seminíferos no mostraba células germinales, que mueren masivamente tras el nacimiento (Isotani *et al.*, 2005). Además, se produce una fuerte activación de *Sox9* en células somáticas y una diferenciación a células de Sertoli alrededor del nacimiento. En todos los casos, la gónada izquierda mostraba una mayor afectación, lo que induce a pensar que podría haber un efecto en la asimetría izquierda/derecha. Este fenotipo es muy parecido al que presentan ratones *knockout* para *Wnt4*, lo que sugiere una misma ruta molecular. Como resultado de alteraciones en la vasculogénesis de la gónada, además de la presencia de células esteroideogénicas funcionales, se produce la formación de un vaso celómico. Esto concuerda con la observación de una gran disminución en la expresión de *Wnt4* a partir 11.5 dpc, debido a la ausencia de su activación por parte de *Rspo1*, por lo que se detectan sólo unos niveles basales de expresión. También *Wnt9a* parece hallarse bajo control de RSPO1, habiéndose demostrado interacción entre WNT4 y WNT9a y un posible papel similar en el desarrollo ovárico (Später *et al.*, 2006). Sin embargo, individuos XX *Rspo1*^{-/-} muestran hermafroditismo en los genitales, mientras que los ratones XX *Wnt4*^{-/-} presentan una ausencia completa de genitales externos femeninos. Debido a que no se detecta expresión de *Rspo1* en este órgano, es de suponer que la activación de *Wnt4* en mesonefros es independiente de *Rspo1*. En contadas ocasiones, los ratones *knockout* XX para *Rspo1* son fértiles aunque no pueden alimentar a sus camadas debido a problemas en el desarrollo de las glándulas mamarias. El análisis de estos animales revela la presencia de ovotestes y hermafroditismo de los conductos sexuales.

El fenotipo somático que presentan los ratones *knockout* para *Rspo1* y *Wnt4* es parecido, pero las alteraciones que presentan las células germinales son totalmente diferentes (para una revisión ver Chassot *et al.*, 2008a). Mientras que en los individuos XX *Rspo1*^{-/-}, la mayoría de las células germinales sobreviven hasta el nacimiento, en ratones XX *Wnt4*^{-/-}, sólo el 10% de éstas no llega a desaparecer. Esto resulta cuanto menos intrigante debido a que RSPO1 se encarga de activar a *Wnt4*, pero se ha demostrado que en estos mutantes quedan, en ambos sexos, unos niveles basales de *Wnt4* que podrían ser suficientes para permitir su supervivencia. Esto indicaría una posible función de *Wnt4* independiente de *Rspo1*. Las células germinales de los ratones XX *Rspo1*^{-/-} no llegan a entrar en meiosis, a pesar de mostrar niveles similares de *Stra8* que los que se observan en ratones normales, siendo este gen requerido para la entrada en meiosis de células germinales. No se descarta que este bloqueo en la meiosis pueda provenir de algún factor secretado por las células somáticas resultantes.

RSPO1 actúa como activador de la ruta de señalización canónica de β CAT

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

en ovario, como demuestra que una activación ectópica de β *Cat* se capaz de de rescatar fenotipo en gónadas XX *Rspo1*^{-/-}, originando en hembras fértiles con ovarios funcionales (Chassot *et al.*, 2008b).

Su expresión en ratón comienza en 10.5 dpc en la cresta urogenital de ambos sexos. En 12.5 dpc, la expresión se localiza en células somáticas de la gónada XX. En gónadas XY, se detecta expresión en el epitelio celómico, y una débil expresión en algunas células intersticiales a partir de 12.5 dpc (Parma *et al.*, 2006; Chassot *et al.*, 2008b). También se ha detectado expresión diferencial en gónadas de pez Zebra (Zhang *et al.*, 2011).

WNT4

El gen conocido como *Wingless-related MMTV integration site 4* o *WNT4* está formado por cinco exones y cuatro intrones y se localiza en el locus 1p36.12 del cromosoma 1 humano. Codifica una proteína de aproximadamente 50 aminoácidos (Jordan *et al.*, 2001; Peltoketo *et al.*, 2004). Pertenece a la familia de genes *WNT* que codifican proteínas de acción local que desencadenan cascadas de señalización que derivan en la activación transcripcional de diversos genes, interviniendo en procesos del desarrollo como el establecimiento de los ejes del embrión y polaridad celular, gastrulación, mantenimiento y diferenciación de células madre y desarrollo de órganos (Cadigan and Nusse, 1997; Dale, 1998).

Han sido asociados diferentes tipos de tumores a mutaciones en esta región cromosómica (Yang *et al.*, 2001). Duplicaciones en este locus originan defectos en el desarrollo sexual como criptorquidia o reversión sexual de macho a hembra (Wieacker *et al.*, 1996; Elejalde *et al.*, 1984; Jordan *et al.*, 2001). Cuando ambas copias del gen se encuentran inactivas, se produce un síndrome conocido como SERKAL, caracterizado por reversión sexual de hembra a macho con genitales ambiguos, morfología genital que va desde ovotestes hasta testículos normales, anagénesis renal, hipoplasia adrenal y pulmonar y anomalías cardíacas (Mandel *et al.*, 2008). Puesto que niveles altos de *WNT4* originan la feminización de machos y ocurre lo contrario con niveles bajos, las situaciones entre ambos extremos se caracterizan por diferentes grados de masculinización de la hembra, mostrándose como un proceso del determinismo del sexo dependiente de dosis (Philibert *et al.*, 2008; Biason-Lauber *et al.*, 2004; Biason-Lauber and Konrad, 2008).

Se generaron ratones transgénicos que sobreexpresaban *Wnt4* para realizar un análisis de la función de este gen durante el desarrollo gonadal. El resultado fue que los ratones mostraban unos niveles de testosterona reducidos y anomalías en la formación de la vasculatura del testículo, pero sin llegar a sufrir reversión sexual, lo que sugiere que *WNT4* podría suprimir la migración de células endoteliales al interior de la gónada XX e inhibir la esteroidogénesis, ya sea reprimiendo a *SF1* o inhibiendo la migración de precursores esteroidogénicos (Jordan *et al.*, 2003; Jeays-Ward *et al.*, 2003). También se obtuvieron ratones transgénicos homocigotos para un alelo nulo de *Wnt4*, que morían después del

3. Antecedentes

nacimiento debido a insuficiencia renal y presentaban múltiples defectos en el desarrollo ovárico. Los individuos XX muestran unos ovarios redondeados sin cubierta y con pocos oocitos, ya que éstos degeneran. El conducto de Wolff continúa con su desarrollo, mientras que el de Müller degenera completamente (Vainio *et al.*, 1999). También se observa la formación ectópica del vaso celómico, que es normalmente específico de testículo debido a la migración de células endoteliales desde el mesonefros (Jeays-Ward *et al.*, 2003). Aunque la inactivación de Inhibin- β en estos ratones *knockout*, provoca que el vaso no se forme (Yao *et al.*, 2006). Presentan por tanto un fenotipo masculinizado tanto en gónadas como en conductos sexuales, acompañado de la expresión de *Sox9* y *Fgf9* (Kim *et al.*, 2006). El análisis de ratones homocigotos para un alelo nulo de *Sox9* (Barrionuevo *et al.*, 2006) y *Fgf9* (Kim *et al.*, 2006), revelan que se produce un aumento en la expresión de *Wnt4*, lo que sugiere que FGF9 y WNT4 podrían actuar como señales antagónicas durante la determinación sexual (Kim *et al.*, 2006). También se ha observado que los ratones donde se han inactivado *Wnt4* y *Foxl2* presentan reversión sexual de hembra a macho (Ottolenghi *et al.*, 2007). Estos estudios, junto con el hecho de que *WNT* es reprimido en la gónada XY durante la determinación sexual, sugieren que este gen es clave en la ruta de diferenciación ovárica y/o en la inhibición de la testicular. Aunque algunos trabajos muestran que podría estar implicado en la diferenciación de las células de Sertoli (Jeays-Ward *et al.*, 2004). Pacientes con duplicaciones de una región que contiene *WNT4* muestran niveles elevados de *DAX1*, lo que indica que WNT4 podría ser capaz de activar el promotor de *DAX1*, ya sea de manera directa o indirecta (Mizusaki *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que *WNT4* está implicado en diversos procesos de diferenciación y desarrollo de órganos como los riñones, glándula pituitaria, glándulas mamarias y sistema genitourinario. En relación con esto, *WNT4* es esencial para la formación de los conductos de Müller y el desarrollo ovárico y también para la nefrogénesis del riñón metanéfrico (Stark *et al.*, 1994; Vainio *et al.*, 1999).

Durante el desarrollo gonadal de ratón, se detecta expresión de *Wnt4* antes de que la cresta genital haga su aparición en el mesénquima mesonéfrico. Esta expresión pasa a localizarse en torno a 11.5 dpc en las células somáticas del primordio gonadal en ambos sexos. Esta expresión aumenta en la gónada XX y disminuye en la XY. Durante el desarrollo fetal, también se detecta expresión de *Wnt4* en el conducto de Müller (Vainio *et al.*, 1999). Se han identificado ortólogos de *WNT4* en especies como en el pollo, la rana africana y el pez cebra, donde este gen se expresa en el cerebro en desarrollo y parece tomar parte en la inhibición del movimiento celular durante la embriogénesis (Hollyday *et al.*, 1995; Ungar *et al.*, 1995)). Además, WNT4 es homólogo del gen *WINGLESS* de *Drosophila*, que se encuentra implicado en la regulación de la motilidad celular durante el desarrollo ovárico (Cohen *et al.*, 2002).

En la gónada XY de *Talpa occidentalis*, la proteína WNT4 se detecta en la médula de la cresta genital y en la gónada e5a. En el estadio siguiente (e5b) se localiza en los cordones, desapareciendo un día después (e5c) (Carmona *et al.*,

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

2009a). En la gónada XX también se detecta expresión en e4c y 5a, aunque de forma más intensa en la corteza. En e5b, los cordones medulares son positivos y la corteza presenta una menor intensidad. La presencia de la proteína disminuye en estadios posteriores sin llegar a desaparecer. Justo antes del nacimiento se produce un aumento en el número de células positivas en la corteza del ovoteste, alcanzando su máximo en los primeros días tras el nacimiento (e9) y declinando progresivamente en estadios posteriores. En la médula ocurre algo similar (Carmona *et al.*, 2009b).

WNT es una familia de moléculas que se secretan y que actúan de manera paracrina induciendo cambios en procesos implicados en el desarrollo. Estas proteínas se unen a miembros de la familia de receptores de membrana FRIZZLED (FZ) y a las proteínas relacionadas con el receptor LDL 5 y 6 (LRP5 and LRP6) (He *et al.*, 2004). La unión entre WNT4 y FZ desencadena una cascada de señalización que disminuye la degradación de β CAT y que permite su transporte al núcleo celular, lo que conlleva a una activación de genes dependientes de WNT (Nusse, 2003). Las proteínas WNT también son capaces de actuar mediante una vía no-canónica independiente de β CAT que involucra a la proteína quinasa C (PKC) y la quinasa c-Jun NH2-terminal (JNK) (Pandur *et al.*, 2002).

WNT4 es capaz de activar la expresión de *Dax1*, lo que conlleva una inhibición de las enzimas esteroidogénicas, como muestran los ratones deficientes en *Wnt4*, que presentaban, únicamente en hembras, alteraciones de la esteroidogénesis y el desarrollo gonadal, aunque había defectos adrenales y renales en ambos sexos (Vainio *et al.*, 1999). Abajo de *WNT4* se encuentran dos factores de transcripción específicos del oocito, como son el factor de la línea germinal (FIGLA) o la proteína originada por el gen homeobox de ovario recién nacido (*NOBOX*) (Liang *et al.*, 1997; Rajkovic *et al.*, 2004). La ausencia de estos genes deriva en la muerte de los oocitos y la ausencia de formación de folículos primordiales debido a que los cordones ovígeros fracasan en su transformación a folículos (Soyal *et al.*, 2000). También abajo en la cascada de señalización de WNT4 se encuentra el gen *FST* que codifica una proteína de unión a activina. Los ratones nulos para este gen muestran un fenotipo similar a los nulos para *Wnt4*, con defectos en la regulación de la vascularización y en el mantenimiento de las células germinales en el ovario (Yao *et al.*, 2004).

Por último, con respecto a la regulación de *WNT4*, éste podría ser activado por isoformas -KTS de WT1 y algunos miembros de la familia de proteínas supresoras de tumores P53 (Osada *et al.*, 2006; Sim *et al.*, 2002). Los ratones transgénicos condicionados que carecen de *Sox9* presentan expresión de *Wnt4* a los 12.5 y 15.5 dpc en la gónada XY, lo que hace pensar que *SOX9* inhibe a *WNT4* (Barriomuevo *et al.*, 2006). Esto se refuerza con el hecho de que una expresión ectópica de *Sox9* en la gónada XX origina un descenso de los niveles de *Wnt4* (Qin and Bishop, 2005).

3. Antecedentes

FOXL2

FOXL2 (Forkhead box L2) se encuentra localizado en el locus 3q22.3 del cromosoma 3 de humanos. Este gen tiene un único exón que codifica una proteína de 38 772 KDa compuesta por 376 aminoácidos. Pertenece a la familia de factores de transcripción *family winged helix/forkhead* cuyas mutaciones son causa de numerosas enfermedades que afectan al desarrollo mostrando fenotipos pleiotrópicos con defectos oculares, craneofaciales, circulares, esqueléticos, inmunes y gonadales. Los estudios de mapeo cromosómico en individuos que presentaban síndromes de blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus (BPES) tipo I (que lleva asociado fallo ovárico prematuro) y tipo II permitieron identificar mutaciones en este gen (Crisponi *et al.*, 2001).

Entre las posiciones de los aminoácidos 52 y 152 de *FOXL2* se encuentra el dominio *forkhead* de unión a DNA. Aguas abajo de este dominio se encuentra otro rico en alanina, con 14 repeticiones de este aminoácido. La secuencia codificante está altamente conservada (Cocquet *et al.*, 2003, 2002), además del número de alaninas que contiene, lo que sugiere que este dominio puede ser importante para la proteína desde el punto de vista estructural o funcional. En el extremo carboxilo del dominio *forkhead* se encuentra localizada una secuencia rica en arginina y lisina que podría actuar como una secuencia de localización nuclear (NLS) y que se encuentra conservada en diversos dominios de este tipo. Se han hecho estudios utilizando dos constructos con el extremo amino de la proteína, uno incluyendo la secuencia NLS y otro sin incluirla, fusionados a una proteína fluorescente verde (GFP). Transfecciones con estos constructos han revelado que la proteína NLS+ presenta una localización nuclear, mientras que la NLS- se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, lo que demuestra que esta secuencia tiene una marcada actividad NLS. Sin embargo, parece que dentro de la proteína debe haber otra secuencia con esta actividad que, mediante la elaboración de series de constructos de delección, se ha descubierto que probablemente se encuentre entre los residuos 125 y 144 (para una revisión ver Moumné *et al.*, 2008).

Este gen juega un papel importante durante el desarrollo ovárico. En ovarios mutantes homocigotos *Foxl2*^{-/-} las células de la granulosa no llegan a completar la transición de escamosas hasta cuboidales, lo que ocasiona la ausencia de folículos y atresia de oocitos. Dos semanas después del nacimiento, casi todos los folículos primordiales han iniciado la foliculogénesis. La activación de la foliculogénesis en ausencia de células de la granulosa funcionales conduce a atresia de los oocitos y depleción folicular (Schmidt *et al.*, 2004b). La pérdida combinada de *Wnt4* y *Foxl2* origina reversión sexual de hembra a macho en ratón, donde la expresión transgénica de *Foxl2* impide la diferenciación de los túbulos en el testículo de individuos XY (Ottolenghi *et al.*, 2007). Uda *et al.* (2004) elaboraron ratones *Foxl2*^{-/-} que mostraban un fenotipo parecido al síndrome blepharophimosis-ptosis-epicanthus-inversus humano (BPES o BPEIS), donde los machos y hembras presentaban un tamaño pequeño, con una morfología craneofacial distintiva y ausencia de párpados superiores. Además, las células

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

somáticas no eran capaces de desarrollarse alrededor de los oocitos en el momento de la formación de los folículos primordiales (Uda *et al.*, 2004). En cabras, una delección del genoma de 11.7Kb que causaba la pérdida de expresión de *FOXL2* originaba un síndrome que incluía reversión sexual (Pailhoux *et al.*, 2001).

FOXL2 parece jugar un papel importante en la regulación de la secreción de gonadotropinas. Se han descrito 2 dianas para *FOXL2* en pituitaria, el receptor de la hormona secretora de gonadotropinas (*GNRH*) (Ellsworth *et al.*, 2003) y la subunidad α de la hormona glicoproteína (*A-GSU*) (Ellsworth *et al.*, 2006). La regulación de la expresión de *GNRH* se lleva a cabo a través de una secuencia reguladora llamada *secuencia activadora de GNRH* (GRAS, que contiene lugares de unión para *FOXL2*, *SMAD3* y *AP-1*) (Ellsworth *et al.*, 2003). *FOXL2* también podría actuar como regulador transcripcional de *SMAD3*, ya que estudios de coprecipitación muestran que *FOXL2* se asocia con el dominio MH2 de la proteína codificada por este gen. Otros estudios han desvelado que *FOXL2* y *SMAD3* podrían regular la transcripción del gen *FST* (Blount *et al.*, 2009). *FOXL2* también controla la expresión del gen de la AROMATASA (*CYP19A1*) que produce la aromatización de esteroides, proceso fundamental para la función ovárica. Se ha demostrado que esta regulación se encuentra conservada en numerosas especies de vertebrados como cabra, pollo y peces (Govoroun *et al.*, 2004; Pailhoux *et al.*, 2002; Nakamoto *et al.*, 2006; Baron *et al.*, 2004). La respuesta aguda a esteroidogénesis (StAR) cataliza la translocación del colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna donde se produce su transformación en pregnolona y otros esteroides. Se ha demostrado que *FOXL2* es capaz de reprimir la actividad transcripcional del promotor de *STAR*, y se ha propuesto que esta inhibición mantiene los folículos inmaduros en un estado quiescente (Pisarska *et al.*, 2004). Por tanto *FOXL2* es un gen clave para la regulación de esteroides, lo que se ha corroborado mediante estudios de transcriptomas, comparando células KGN *granulosa-like* que expresan o no *FOXL2* (Batista *et al.*, 2007), revelando además que *FOXL2* regula positivamente otros genes implicados en estos procesos como *PPARGC1A*, *NR5A2* y *CH25H*. También se ha relacionado *FOXL2* con otros procesos celulares como apoptosis, donde su sobreexpresión activa factores pro- y anti-apoptóticos. *FOXL2* activa también la transcripción de factores pro-inflamatorios, activando en concreto a la enzima ciclooxigenasa 2 (*COX2*). Los ratones deficientes en *COX2* son infértiles, además de presentar fallos en la ovulación, lo que apunta a que *FOXL2* podría tener un papel importante durante el desarrollo ovárico temprano y durante la ovulación. *FOXL2* también parece regular el metabolismo de los radicales libres ya que coactiva la superóxido dismutasa mitocondrial (*MNSOD*) y el receptor gamma activado por proliferación de peroxisomas (*PPARG*), siendo por tanto determinante en procesos de envejecimiento ovárico (Benayoun *et al.*, 2009; Batista *et al.*, 2007). El estudio de ratones *knockout* para *Wnt4* y *Foxl2* muestra que en los ovotestes de individuos XY, *Amh* se encuentra reprimido lo que sugiere que quizás *FOXL2* reprime directa o indirectamente la expresión de *SOX9* y *AMH* en gónadas XX (Ottolenghi *et al.*, 2007).

3. Antecedentes

En humanos, *FOXL2* se detecta en el ovario de la gónada inmadura, mostrando una fuerte expresión en el núcleo de células de la granulosa y una expresión menor en las células del estroma durante el desarrollo fetal. Este patrón de expresión continúa en el adulto. *Foxl2* no se detecta en la gónada XY. En ratones muestra un patrón de expresión similar, no se detecta en la gónada XY y se expresa en ovario alrededor de 12.5 dpc en células somáticas. En adultos, esta expresión se localiza en células de la granulosa, con altos niveles en folículos tempranos, pero disminuye en estadios tardíos de la foliculogénesis (Schmidt *et al.*, 2004b; Uda *et al.*, 2004). En pollo, la proteína FOXL2 se expresa con un patrón dimórfico, principalmente en células de la granulosa y en menor medida en células aromatasa-positivas de la teca (Govoroun *et al.*, 2004). En tortuga, que presenta determinación sexual basada en la temperatura, *Foxl2* se expresa abundantemente en las gónadas en desarrollo a temperaturas que promueven la aparición de hembras (Loffler *et al.*, 2003). Se han detectado bajos niveles de mRNA de *FOXL2* en testículos de cabra, ratón y pollo, pero no se ha detectado la proteína, lo que podría indicar que, o bien los niveles de mRNA son muy bajos, o la expresión de *FOXL2* sufre una regulación traduccional negativa (Cocquet *et al.*, 2002; Govoroun *et al.*, 2004; Pailhoux *et al.*, 2001; Pannetier *et al.*, 2003).

No se tiene mucha información acerca de la regulación de *FOXL2*, aunque parece que existe una conexión entre *FOXL2* y la *AROMATASA*, ya que los embriones de pollo con reversión sexual a machos producida por inhibidores de la *AROMATASA*, se observan niveles reducidos de *FOXL2*. Esto podría ser resultado de la interrupción de una retroalimentación positiva de los niveles de estrógenos, o la represión de factores pro-testiculares tales como *SOX9* y *DMRT1* (Hudson *et al.*, 2005). Se han observado resultados similares en la trucha arcoiris (Baron *et al.*, 2004). Tampoco se sabe qué señal activa la expresión de FOXL2 durante la determinación gonadal, aunque se ha observado que es capaz de activar su propio promotor (Moumné *et al.*, 2008), lo que concuerda con el hecho de que, una vez activado, su expresión se mantiene en el ovario a lo largo de toda la vida. En el pez *Paralichthys olivaceus*, que tiene determinación sexual basada en la temperatura, se ha observado que los niveles de mensajero de *FOXL2* se reducen como respuesta al tratamiento con agua a alta temperatura. También se ha observado en esta misma especie mediante experimentos de transfección que *FOXL2* y el análogo de cAMP son capaces de activar la transcripción del gen de la *AROMATASA in vitro* (Yamaguchi *et al.*, 2007). Este hecho sugiere que tanto *FOXL2* como la señalización de FSH se encuentran implicados en la regulación transcripcional de la *AROMATASA*.

Se han encontrado evidencias de que *FOXL2* sufre muchas modificaciones post-transcripcionales como fosforilación, metilación y acetilación tanto en células en cultivo como *in vivo* (Benayoun *et al.*, 2009, 2008). Estas modificaciones parece tener una gran influencia sobre la proteína, alterando su actividad (Benayoun *et al.*, 2008). FOXL2 es capaz de reconocer y activar su propio promotor pFOXL2 o pDK3 (Moumné *et al.*, 2008). Como hemos mencionado, esto podría ser una explicación al hecho de que una vez que su expresión ha comenzado, se

3.3. Control genético de la determinación y diferenciación sexual

mantiene durante toda la vida fértil. La actividad de FOXL2 se reprime por la deacetilasa SIRT1, cuya transcripción está directamente activada por FOXL2, lo que cierra una retroalimentación negativa (Benayoun *et al.*, 2009).

FST

El gen de la follistatina (*FST*) codifica una proteína de unión a activina que regula el eje hipotálamo-pituitaria-gónada. Los primeros estudios acerca de esta proteína revelaron que se encontraba presente en el fluido folicular (Robertson *et al.*, 1987; Ueno *et al.*, 1987). Es un gen pequeño localizado en el locus 5q11.2 que consta de 6 exones con un sitio de *splicing* alternativo que origina dos isoformas diferentes que, tras sufrir la maduración, presentan 288 y 315 aminoácidos respectivamente (Shimasaki *et al.*, 1988). La isoforma 315 puede ser procesada proteolíticamente para originar otra forma de 303 aminoácidos. Cada una de las tres presenta una distribución diferente. La isoforma 315 se encuentra en circulación, la 288 en células y tejidos, y la isoforma 303 se detecta en gónadas. Se ha demostrado que la pérdida de las isoformas 303 y 315 origina defectos en la fertilidad incluyendo fallo ovárico prematuro (Kimura *et al.*, 2010).

Las diferentes isoformas de *FST* son capaces de suprimir específicamente a la hormona estimulante de foliculo (FSH) *in vitro* e *in vivo*, regulando la acción de ésta junto con inhibina y activina. El mecanismo de acción por el que ejerce esta acción se basa en la alta afinidad que presenta para unirse a activina, neutralizando así el efecto estimulatorio que ésta tiene sobre FSH (Nakamura *et al.*, 1990). FSH se encuentra implicada en crecimiento y reclutamiento de folículos inmaduros en ovario y en maduración de túbulos seminíferos y espermatogénesis en testículos.

Los ratones *knockout* para este gen llegan a sobrevivir al nacimiento pero mueren a las pocas horas, mostrando un retraso en el crecimiento y cianosis (Matzuk *et al.*, 1995). El análisis de estos individuos muestra anomalías en los músculos intercostales y diafragmáticos, deformidades en las costillas y en la piel entre otras, mostrando que *Fst* se encuentra involucrado en muchos procesos del desarrollo. En estos ratones *knockout* para follistatina se observa la formación del vaso celómico, un vaso sanguíneo específico de desarrollo testicular temprano, que aparece en la superficie de los ovarios de estos ratones (Yao *et al.*, 2004; Jeays-Ward *et al.*, 2003). No obstante, cuando se inactiva *Inhibin-β* en estos ratones *knockout*, este vaso no se forma (Yao *et al.*, 2006). Además se observa una pérdida masiva de células germinales en torno a 16.5 dpc, a pesar de que llegan a entrar en meiosis normalmente. Toda la población de células germinales se pierde alrededor del nacimiento. La apoptosis ocurre en el córtex y la médula de los ovarios mientras que, en ovarios normales, las células germinales sufren apoptosis únicamente en la región medular (Yao *et al.*, 2004). Esto parece ser debido a que *Fst* promueve la supervivencia de las células germinales en la corteza ovárica. El fenotipo de estos ratones concuerda con el que presentan también los *knockout* para *Wnt4*, aunque los *Fst*^{-/-} siguen manteniendo expresión de *Wnt4* lo que

3. Antecedentes

indica que *Fst* se activa aguas abajo de *Wnt4* (Matzuk *et al.*, 1995; Vainio *et al.*, 1999). Por lo tanto, este gen (al igual que *Wnt4*) tiene efectos anti-testiculares y pro-ováricos, aunque las gónadas XX *Fst*^{-/-} no presentan células de Leydig, algo que sí se observa en los *knockout* para *Wnt4*, sugiriendo que éste es capaz de activar diferentes rutas además de la de *Fst*.

Los ratones transgénicos que sobreexpresan *Fst* sobreviven llegando a adultos y sólo muestran defectos en la piel y en gónadas, ya que los testículos son más pequeños de lo habitual, mostrando algunos una hiperplasia de células de Leydig y degeneración de túbulos seminíferos que origina infertilidad (Guo *et al.*, 1998). En la hembras los ovarios y el útero muestran un desarrollo anormal y hay alteraciones en el desarrollo folicular. Curiosamente, sólo una de las cinco líneas que se generaron presentaba baja concentración de FSH.

Fst se comienza a detectar en la gónada XX de ratón a partir de 11.5 dpc, alcanzando su máxima expresión en 12.5 y disminuyendo a partir de 14.5 (Yao *et al.*, 2004; Menke and Page, 2002). Su expresión se observa en células somáticas varias capas por debajo del epitelio celómico. Esta expresión es específica de ovario, no habiéndose encontrado en testículo en esta ventana temporal. No obstante se ha demostrado expresión de *Fst* en células de Sertoli y células germinales de testículo adulto de diferentes especies a pesar de no haberse detectado en estadios tempranos del desarrollo (Meinhardt *et al.*, 1998; Roberts, 1997; Kaipia *et al.*, 1992; Majdic *et al.*, 1997), y también en células de la granulosa en ovario (Nakatani *et al.*, 1991; Shimasaki *et al.*, 1989).

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina utilizando proteínas de células gonadotróficas α T3-1 han mostrado que *FOXL2* y *SMAD3* son reclutados por el *enhancer* intrónico del gen de la follistatina y son capaces por tanto de regular su expresión (Blount *et al.*, 2009).

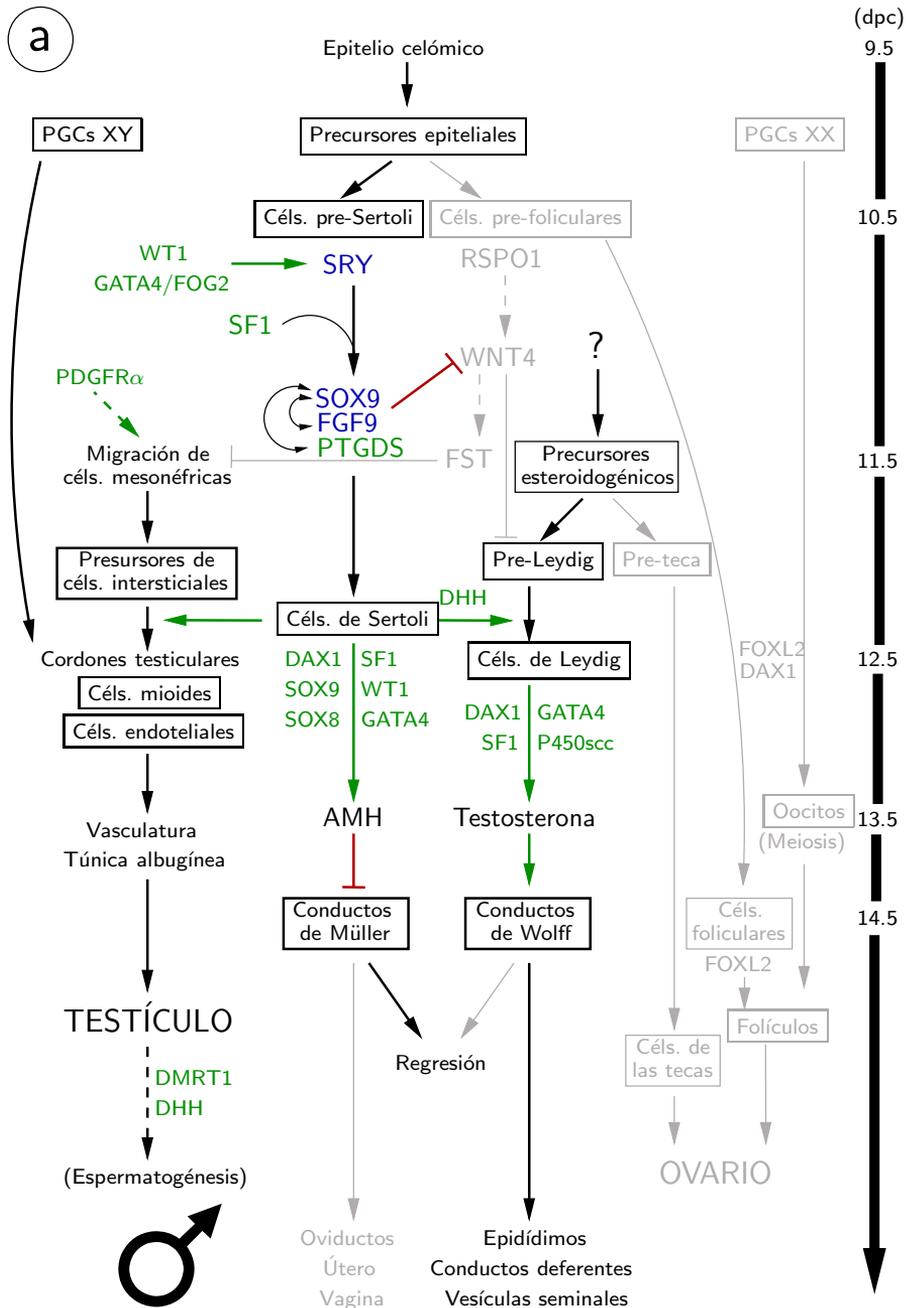
3.4. Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal

En la figura 3.1 se muestra un esquema general de las interacciones que ocurren entre los diferentes genes y procesos que tienen lugar durante la determinación y diferenciación sexual en ratón. Como se ha comentado anteriormente, la expresión del gen *Sry* en células pre-Sertoli alrededor de los 10.5 dpc desencadena la activación de la ruta masculina, produciéndose la inhibición de la femenina. Como consecuencia de esta expresión, las células pre-Sertoli se diferencian como células de Sertoli, expresando *Sox9* lo que origina la inhibición de *Wnt4*, gen específico de la ruta ovárica. Este tipo celular será responsable de la consecución de numerosos eventos clave durante la diferenciación masculina. Por el contrario, la ausencia de *Sry* evita que genes específicos de ovario como sufran represión alguna, activándose la ruta ovárica.

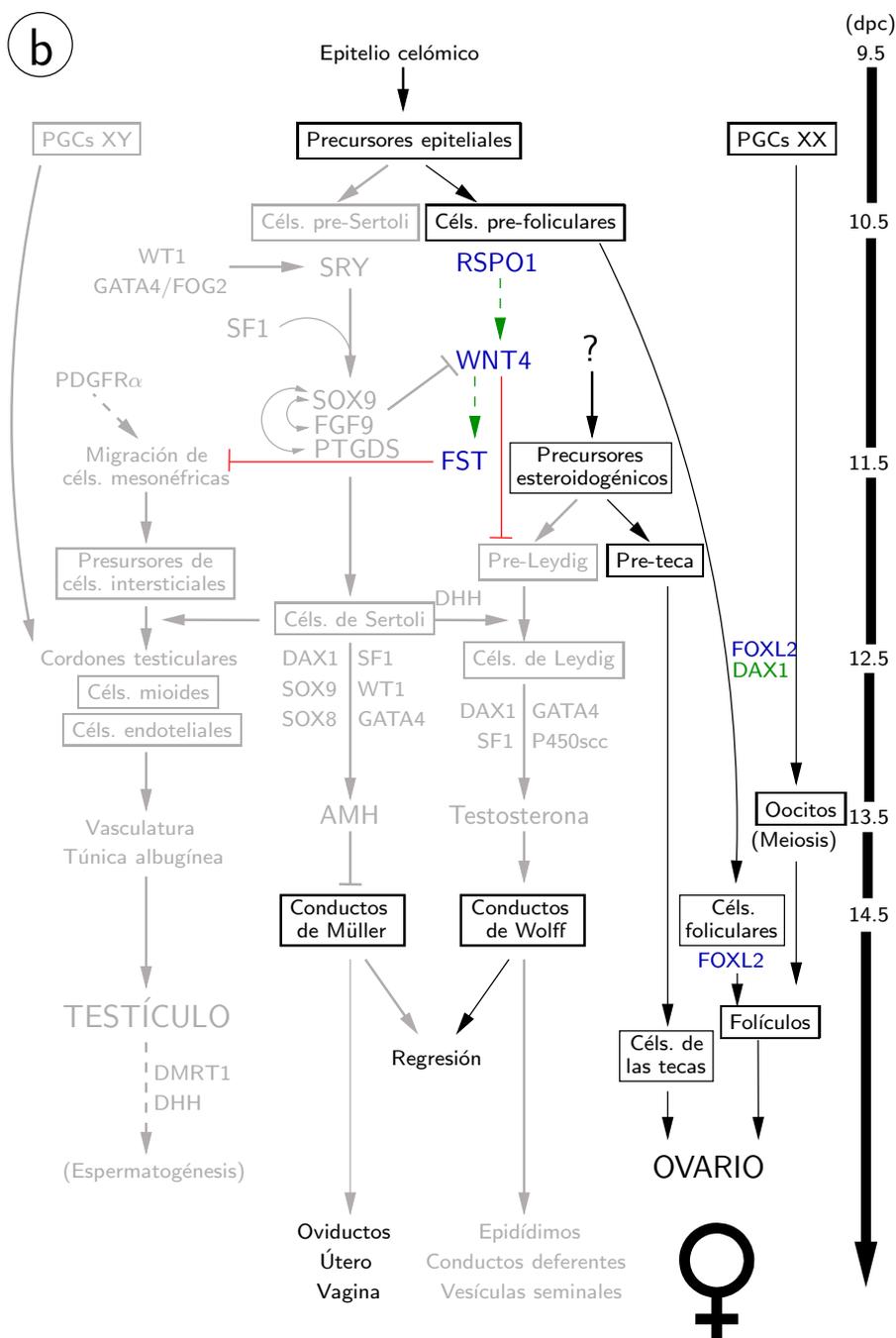
3.4. Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal

Figura 3.1: (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*).

3. Antecedentes



3.4. Interacciones génicas durante el desarrollo gonadal



3.5. Reversión sexual en mamíferos

Como hemos comentado anteriormente, pueden considerarse dos etapas en la diferenciación del sexo en mamíferos. La primera es la formación de las gónadas y está controlada por los genes implicados en la determinación del sexo. La segunda es la aparición del fenotipo acorde a la gónada formada, proceso que es dirigido por la producción de hormonas. Las hormonas no son imprescindibles para la diferenciación femenina pero sí lo son para la masculina, ya que tras formarse el testículo, los andrógenos producidos por las células de Leydig inducen la diferenciación del tracto genital masculino a partir de los conductos de Wolff y la hormona antimülleriana, producida por células de Sertoli, inhibe el desarrollo de los conductos de Müller.

En consecuencia, distinguimos tres tipos de sexo en mamíferos. El sexo genético se determina por la dotación cromosómica del individuo. Un individuo con cromosomas XX será hembra y uno con XY será macho. El sexo gonadal viene dado por el desarrollo de ovarios o testículos en hembras o machos respectivamente. La producción de hormonas, por parte de las gónada, dirigen el desarrollo de un fenotipo masculino o femenino dando lugar a lo que conocemos como sexo fenotípico. Cuando no hay correspondencia entre el sexo gonadal o el fenotípico con el sexo genético, ya sea por alteraciones en las rutas genéticas o porque las hormonas no llegan a realizar su función, se produce una reversión sexual.

3.5.1. Factores asociados a casos de reversión sexual y disgenesia gonadal

Las reversiones sexuales XX originan machos que genéticamente son hembras y suelen producirse por translocaciones del gen *SRY* a autosomas o al cromosoma X (Camerino *et al.*, 2006). Las reversiones sexuales XX independientes de *SRY* son muy raras en humanos y difíciles de identificar. No obstante, se ha descrito la regresión de los conductos de Müller y la virilización en pacientes XX en asociación con mutaciones en heterocigosis del gen *WNT4*. Las mutaciones en el gen *RSP01* también originan individuos XX con genitales externos masculinos con hipospadia, grave hipogenitalismo o ambigüedad en los genitales externos, probablemente como consecuencia de una falta de hormonas masculinas (Parma *et al.*, 2006). Recientemente se ha descrito que las duplicaciones en la región cromosómica donde se encuentra el gen *SOX9* están asociadas a reversiones sexuales XX en humanos, lo que se ha corroborado utilizando ratones transgénicos (Polanco *et al.*, 2010).

En ratones se han conseguido casos de reversión sexual mediante expresión ectópica de los genes *Sry* y *Sox9* durante el desarrollo (Bishop *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 2004; Koopman *et al.*, 1991). Sin embargo no se ha podido asociar este fenotipo a mutaciones individuales en genes de la ruta femenina como *Foxl2*, *Fst*, *Wnt4* o *Rspo1* (Tomizuka *et al.*, 2008; Chassot *et al.*, 2008b; Uda *et al.*,

3.5. Reversión sexual en mamíferos

2004; Vainio *et al.*, 1999). En estos casos se obtienen fenotipos masculinizados en gónadas XX pero sin llegar a una reversión sexual completa. No obstante, la pérdida combinada de *Wnt4* y *Foxl2* en ratones mutantes sí origina reversión sexual XX con la formación de cordones testiculares y espermatogonias, lo que indica que ambos genes forman parte de rutas independientes y complementarias durante la organogénesis femenina (Ottolenghi *et al.*, 2007).

La activación ectópica de *Dhh*, otro de los genes implicado en el desarrollo testicular temprano, en gónadas XX fetales de ratón, origina masculinización del embrión o pseudohermafroditismo a pesar de seguir expresando marcadores ováricos tales como *Wnt4* o *Fst* (Barsoum *et al.*, 2009).

Las reversiones sexuales que originan hembras XY son bastante más frecuentes que las anteriores y pueden producirse por alteraciones en el gen *SRY*. Pueden ocurrir deleciones en este gen por intercambio desigual entre los cromosomas X e Y durante la meiosis o mediante translocaciones Y-autosomas (Page *et al.*, 1990). También se pueden originar hembras XY por mutaciones puntuales en *SRY*. Los individuos afectados presentan disgenesia gonadal y mayor altura que la media de las hembras (Hawkins, 1993).

Hay otros genes que también pueden originar este tipo de reversión sexual, como es el caso de *SOX9*, situado inmediatamente debajo de *SRY* en la cascada génica. Estos individuos muestran casos de fenotipos sexuales variados y displasia campomélica. Los fenotipos en individuos XY abarcan desde machos normales, hasta hembras que presentan tejido testicular o con disgenesia testicular e incluso hembras normales con ovarios que contienen oocitos (Tommerup *et al.*, 1993). La inactivación condicional en homocigosis de este gen en ratones origina reversión sexual (Barrionuevo *et al.*, 2006). Curiosamente la inactivación mutacional de un alelo de *Sox9* origina reversión sexual en ratones pero no en humanos.

Las mutaciones en heterocigosis del gen *DHH* en humanos son capaces de originar casos de disgenesia parcial y total (Umehara *et al.*, 2000; Canto *et al.*, 2005).

Alteraciones en el gen *WT1* también originan un síndrome conocido como Denys-Drash además del tumor de Wilms (Mueller, 1994). Estos individuos XY muestran genitales ambiguos o femeninos.

Se han descrito casos originados como consecuencia de una duplicación en algún gen implicado en la organogénesis femenina como es el caso de *DAX1* donde los pacientes XY mostraban unos genitales externos ambiguos (Bardoni *et al.*, 1994). Este gen es un caso curioso, ya que ratones XY *knockout* para *Dax1* desarrollaban reversión sexual (Meeks *et al.*, 2003c). Esto muestra que los niveles de DAX1 deben encontrarse dentro de unos niveles mínimos y máximos concretos que varían entre especies. También se han descrito casos de duplicación del gen *WNT4* que originan hembras XY (Jordan *et al.*, 2001).

Los ratones con mutación en el gen *Fgf9* también presentan reversión sexual y mueren en el nacimiento (Colvin *et al.*, 2001a). Se ha descrito un fenotipo

3. Antecedentes

similar en ratones *Fgfr2* mutantes que han sido cruzados con la cepa C57BL6 (Bagheri-Fam *et al.*, 2008) y en ratones que presentan una triple mutación en genes de la familia del receptor de la insulina *Ir*, *Igf1r* e *Irr* (Nef *et al.*, 2003).

3.5.2. Reversión sexual en la familia *Talpidae*

El topo ibérico *Talpa occidentalis* (Cabrera, 1914) se distribuye por toda la Península Ibérica, excepto en determinadas áreas del Norte y Noroeste, que se encuentran habitadas por *Talpa europaea*. Los topos presentan una reproducción estacional cuyos ciclos varían según la latitud (Jiménez *et al.*, 1990) y en el Sur de la Península Ibérica abarca desde Noviembre hasta Marzo, aunque estos límites pueden variar de un periodo reproductivo a otro. El periodo de gestación consta de 29 días con una media de 4 crías por camada. Durante cada periodo reproductor quedan preñadas hasta un máximo de 2 veces. Su coeficiente de esfuerzo reproductivo es significativamente más alto (2.69) que el esperado según su masa corporal (1.91), lo que indica que su esfuerzo reproductivo es un 36 % mayor de lo esperado (Barrionuevo *et al.*, 2004a).

En 1988, Jiménez *et al.* describieron en *Talpa occidentalis* el único caso conocido hasta la fecha en mamíferos euterios de hermafroditismo verdadero que afecta a todas las hembras de una misma especie. Las hembras de estas especies presentan ovotestes bilaterales con tejido testicular y ovárico simultáneamente, en lugar de ovarios y sin que su función reproductora se vea comprometida.

Posteriormente, se ha comprobado que otras muchas especies de topos (familia *Talpidae*) presentan este singular y complejo desarrollo ovárico. Estos ovotestes XX han sido descritos en diversas especies europeas del género *Talpa*, *T.europaea*, *T. romana* y *T. stankovici* (Jiménez *et al.*, 1993; Sanchez *et al.*, 1996; Mathews, 1935; Popoff, 1911), el desmán *Galemys pyrenaicus* (Peyre, 1962), el topo de nariz estrellada *Condylura cristata* (Mossman and Duke, 1973; Rubenstein *et al.*, 2003), el topo musaraña americano (Rubenstein *et al.*, 2003) y el topo japonés *Mogera wogura* (Carmona *et al.*, 2008). Esto indica que podría tratarse de una característica adquirida por algunas especies de este grupo taxonómico

La porción ovárica del ovoteste contiene oocitos maduros durante el periodo reproductor y es completamente funcional, mientras que la parte testicular no presenta células germinales, siendo de mayor tamaño que la ovárica. Esta porción testicular desarrolla numerosas características específicas de testículos, como la diferenciación de células de Leydig, productoras de testosterona. Anualmente, ambas porciones alternan ciclos de regresión y crecimiento. Durante la época reproductiva, la parte ovárica predomina sobre la testicular, y en la época de descanso ocurre lo contrario, detectándose altos niveles circulatorios de testosterona procedentes de la región testicular, que desaparecen en la época fértil (Jiménez *et al.*, 1993).

En los testículos de los machos, que presentan un desarrollo gonadal muy similar al del resto de mamíferos, también se han observado cambios de

3.6. Desarrollo gonadal en *Talpa occidentalis*

morfología con respecto a los ciclos estacionales. Durante periodos de inactividad el testículo sufre una reducción de un 80-90% de su masa, como consecuencia de una reducida proliferación de las espermatogonias que también origina que haya un bajo número de células germinales. La apoptosis parece no ser la causa de la masiva depleción de células germinales (Dadhich *et al.*, 2010). Una oleada de proliferación restaura las espermatogonias perdidas durante el periodo de inactividad.

3.6. Desarrollo gonadal en *Talpa occidentalis*

En *Talpa occidentalis*, la cresta genital se detecta por primera vez en el estadio s4 (14-16 dpc) como un engrosamiento en la superficie ventral del mesonefros, al igual que ocurre en el resto de mamíferos. Durante este estadio se producen las señales que dirigen el desarrollo gonadal hacia la formación de un testículo o de un ovoteste.

3.6.1. Desarrollo del testículo

Tras el establecimiento de la cresta genital y la activación de la ruta testicular, se produce la diferenciación de las células de Sertoli (16 dpc), detectándose la presencia de AMH. Este evento se produce en el blastema gonadal indiferenciado, mucho antes de lo que cabría esperar comparado con otros mamíferos. Un día después (17 dpc) se produce una migración celular desde el mesonefros hacia la gónada (Carmona *et al.*, 2009a). En experimentos con MT1-MPP, un marcador de movimiento celular, Gálvez *et al.* (2001) muestran un intenso movimiento en la frontera mesonefros-gónada en este estadio, mostrando evidencias indirectas de que están ocurriendo procesos de migración. Esto se refuerza con la presencia de PDGFR α , un componente clave de la ruta de señalización de proliferación celular específica de la gónada XY, migración desde el mesonefros y diferenciación de células de Leydig en ratón (Ricci *et al.*, 2004; Brennan *et al.*, 2003). En 18 dpc se observa la aparición de cordones testiculares. Esta secuencia de eventos, mucho más lenta de lo que ocurren en ratón, demuestra que la migración celular no es indispensable para una correcta diferenciación de células de Sertoli, tal y como se ha sugerido que ocurre en ratón (Tilmann and Capel, 1999; Brennan *et al.*, 2002). Además, la diferenciación de las células de Sertoli ocurre mucho antes de la formación de cordones, sugiriendo que la diferenciación de estas células sea indispensable para la formación de los mismos.

En 17 dpc también ocurre una regionalización funcional de la gónada masculina previa a la que ocurre desde el punto de vista morfológico, que ocurre un día más tarde con la formación de los cordones testicular (18 dpc). Esto se basa en la expresión de genes en las células de Sertoli, mostrando una organización cordonal antes de que estos sean morfológicamente distinguibles.

3. Antecedentes

Este hecho difiere con lo que ocurre en ratón, ya que el fenotipo Sertoli no se establece hasta 12.5 dpc, cuando los cordones ya se han formado (Tilman and Capel, 1999).

A los 19 dpc se observan las primeras células de Leydig diferenciadas. Su número incrementa en los siguientes estadios (s6 y s7), originándose grandes grupos de células que, llegada la pubertad, ocupan prácticamente todo el espacio intersticial. Éstas células son las principales responsables de la producción de testosterona en la gónada. Durante el estadio s6 comienzan a aparecer las primeras células mioides, pero éstas no rodean a los cordones testiculares hasta s8.

El sistema vascular del testículo comienza a desarrollarse en s5b (18 dpc) y se desarrolla rápidamente hasta originar un profuso sistema arterial y venoso. En s8 se inicia la formación de la *rete testis*. La túnica albugínea se diferencia entre s5c y s8 y se compone de células epiteliales, fibras de colágeno y vasos sanguíneos.

3.6.2. Desarrollo del ovoteste

Las gónadas XX sufren una regionalización temprana (17 dpc) que origina una corteza y una médula separadas por una fina capa de tejido mesenquimático, llamada túnica albugínea primaria, que no se observa en la mayoría de los ovarios de mamíferos (Tilman and Capel, 1999). Sin embargo, esta regionalización no es morfológicamente detectable en este punto.

En 18 dpc, aparecen cordones sexuales primarios en la médula de la gónada XX, al igual que ocurre en la XY, como veremos más adelante. En la región cortical, de donde deriva la porción ovárica, es donde se concentran las células germinales primordiales. En 19 dpc, estas células germinales se agregan formando grandes cordones corticales que también contienen células somáticas de tipo epitelial, y que se separan entre ellos por tejido mesenquimático. Estos cordones se forman como consecuencia de una primera oleada de proliferación de las células germinales que ocurre bajo la superficie del epitelio de la gónada. En 22 dpc, una segunda proliferación de células germinales origina una segunda regionalización, esta vez sólo en el cortex, y da lugar a una región interna y otra externa separadas por una capa de células mesenquimáticas.

El inicio de la meiosis en la hembra de topo se encuentra bastante retrasado con respecto a otras especies de mamíferos, ya que tiene lugar tras el nacimiento (4-5 dpp). Como consecuencia de esto, la formación de los folículos primordiales también se retrasa hasta 15 dpp (Barrionuevo *et al.*, 2004b; Zurita *et al.*, 2007).

A partir de la región medular, se origina la porción testicular del ovoteste. Un evento clave en la formación de este tejido es la migración celular, que se produce en torno a 18 dpc, al igual que en la gónada XY (Barrionuevo *et al.*, 2004b). Tras la primera oleada de proliferación de células somáticas que originan los cordones sexuales primarios en la médula, se produce un retraso

3.6. Desarrollo gonadal en *Talpa occidentalis*

en el desarrollo testicular hasta 1 semana antes del nacimiento. Sin embargo, el número de cordones medulares se incrementa durante este periodo mediante la proyección de grupos de células somáticas hacia la médula desde regiones profundas de los cordones corticales aunque las células germinales nunca llegan a penetrar en la médula. Justo antes del nacimiento, los cordones medulares se rodean de células mioides peritubulares (Barrionuevo *et al.*, 2004b). Este tipo celular no presenta contrapartida en el ovario lo que sin duda es un hecho de gran relevancia. También las células del intersticio se diferencian como células de Leydig, responsables de la producción de testosterona. Una posible consecuencia de la producción de esta hormona podría ser el desarrollo de los conductos de Wolff tras el nacimiento, que origina epidídimos rudimentarios y una rete testis (Zurita *et al.*, 2003).

Al igual que ocurre en testículos de individuos XY, la porción testicular queda recubierta de una túnica albugínea y se desarrolla una vasculatura que se asemeja a la observada en los machos (Carmona *et al.*, 2009b; Barrionuevo *et al.*, 2004b). La túnica se compone de células epiteliales aplanadas con muchas fibras de colágeno y vasos sanguíneos, y se separa de la gónada sobre la región ovárica estableciéndose así una *bursa ovarica* conectada con el infundíbulo y los oviductos (Jiménez *et al.*, 1993). Esta porción testicular crece hasta hacerse unas 10 veces mayor que la ovárica en topes juveniles.

A pesar de que muchas características asemejan la porción testicular de las gónadas XX con los testículos de individuos XY, también hay algunas diferencias entre ambos tejidos. Los ovotestes, por ejemplo, no presentan verdaderos cordones testiculares, sino esférulas formadas por células somáticas que, aunque llegan a ser morfológicamente similares a células de Sertoli inmaduras, nunca llegan a expresar marcadores sertolianos como SOX9 o AMH (Zurita *et al.*, 2003). Esta parte testicular es totalmente estéril, ya que no se observan en ella células germinales. Algunos de los procesos que ocurren en el desarrollo testicular ocurren simultáneamente en ambos sexos, pero otros están retrasados en la gónada XX. No obstante, la compartimentación de la gónada en médula y corteza mediante un septo de tejido mesenquimático, que desaparece posteriormente, ocurre antes en la gónada XX (Barrionuevo *et al.*, 2004b).

3. Antecedentes

Cuadro 3.1: Comparación de los eventos más significativos en el desarrollo del tejido testicular XX y XY en *T. occidentalis* (Barrionuevo *et al.*, 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

4. Material y Métodos

Contenidos

4.1. Material analizado	70
4.2. Métodos	72
4.2.1. Obtención del material	72
4.2.2. Determinación del estadio de desarrollo	74
4.2.3. Metodos citológicos e histológicos	76
4.2.4. Métodos inmunológicos	79
4.2.5. Métodos de análisis molecular	84
4.2.6. Cultivo de órganos	99
4.2.7. Perfusión con tinta china	103
4.3. Preparación de soluciones y medios	103

4.1. Material analizado

El presente estudio se ha basado en el análisis de un total de 172 embriones, fetos, crías e individuos adultos de la especie de topo *Talpa occidentalis*. Estos animales pertenecían a diferentes estadios del desarrollo, abarcando de esta manera todo el proceso de formación de la gónada. Para su clasificación se utilizaron una serie de características morfométricas. La totalidad de este material fue obtenido en diversas alamedas de las localidades de Santa Fé y Chauchina, pertenecientes a la vega de Granada, durante un total de 6 años consecutivos (2005-2010).

Los embriones y fetos se obtuvieron mediante la captura de hembras preñadas. Tras la captura de dichas hembras se procedió a un análisis *in situ* de diversas características morfológicas a fin de determinar su *estatus reproductivo*. Estas características incluían la presencia de un orificio vaginal abierto, el grado de inflamación de éste, cantidad de mucosidad en la vulva, el estado y tamaño de los pezones, la posible producción de leche y la presencia de embriones en el útero. En el caso de aquellas hembras que se encontraban preñadas, se procedió a determinar el estado de gestación de los fetos mediante palpación directa del abdomen de las hembras, lo que además permitía calcular la fecha aproximada del parto. Para la obtención de crías se procedió a la búsqueda de nidos, bien cuando una hembra estaba preñada o próxima al parto examinando su territorio o bien mediante la búsqueda directa de éstos. El cuadro 4.1 recoge los datos del material analizado.

Cuadro 4.1: Material analizado.

Estadio	Edad ^a	Camadas	Gónadas analizadas ^b											
			Individuos analizados		Inclusión en parafina		Inclusión en resina		RT-Q-PCR		Perfusión con tinta		Cultivo de órganos	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
s4c	14-16 dpc	4	6	7	4	5	2	2	4	4	–	–	–	–
s5a	17 dpc	4	6	7	4	5	2	2	6	6	–	–	–	–
s5b	18 dpc	5	9	11	5	6	2	2	6	6	–	–	2	3
s5c	19 dpc	5	7	11	4	7	2	2	6	6	–	–	1	2
s6	19-21 dpc	4	5	8	3	6	2	2	4	4	–	–	–	–
s7	21-23 dpc	4	5	6	3	4	2	2	4	4	–	–	–	–
s8	24-28 dpc	3	5	6	3	4	2	2	4	4	–	–	–	–
s9	0-3 dpp	3	5	5	3	3	2	2	4	4	–	–	–	–
s10	3-7 dpp	4	5	6	3	4	2	2	4	4	–	–	–	–
s11	7-12 dpp	4	5	6	3	4	2	2	4	4	–	–	–	–
s12	12-17 dpp	5	7	9	3	4	2	2	4	4	1	2	–	–
s13	17-22 dpp	3	5	4	3	2	2	2	–	–	–	–	–	–
s14	22-27 dpp	2	4	4	2	2	2	2	–	–	–	–	–	–
s15a	27-33 dpp	3	4	4	2	2	2	2	–	–	–	–	–	–
s15b	30-240 dpp	–	6	7	4	5	2	2	–	–	–	–	–	–
adultos	240 dpp-4 años	–	2	2	–	–	2	2	–	–	–	–	–	–

(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.

4. Material y Métodos

4.2. Métodos

4.2.1. Obtención del material

La obtención de estos especímenes requirió su captura en su hábitat natural, ya que no es posible mantenerlos en cautividad tiempo superior a unos 7 días. Además se procuró alterar el número total de individuos de cada población lo mínimo posible.

El material para realizar este trabajo se obtuvo con el permiso de la Dirección General de Gestión de Medio Natural de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, expedido anualmente para utilizar estos animales con fines de investigación científica.

La manipulación de los ejemplares capturados se realizó según las directrices y aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada.

Captura de topos adultos

Para llevar a cabo la captura de los individuos, nuestro grupo procedió al diseño y construcción de trampas mediante las cuales los animales no sufrieran ningún tipo de daño. En general, estas trampas consisten en unos tubos de PVC sanitario aproximadamente de 20 cm de longitud y 5 cm de diámetro (similar al que presentan las galerías de los topos) y con puertas acopladas a ambos extremos. Las puertas se encuentran 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, lo que provoca que las puertas se cierren a ambos extremos, quedando atrapado y sin sufrir ningún daño. En el interior de la trampa, el topo solo puede permanecer con vida durante un tiempo limitado debido al intenso frío en invierno y el calor en verano. Por ello, la trampa lleva acoplada un nido mediante una unión en forma de T y al que se accede mediante una puerta con un solo sentido. El nido se compone de una capa exterior hecha de material impermeable (lámina de plástico) y de una cubierta interior absorbente (lona). Además, el nido va relleno de hojas secas que sirven de abrigo para el animal. Una vez dentro del nido, los animales permanecen con vida mucho más tiempo, de manera que las trampas se pueden instalar por la mañana y revisarlas por la tarde. Debido al intenso calor que alcanza la zona en verano, el patrón de actuación se invierte, instalando las trampas por la tarde y revisándolas por la mañana.

Obtención de embriones, fetos y crías

Los topos son animales con reproducción estacional cuya época reproductiva abarca desde el mes de Octubre al de Marzo (Jiménez *et al.*, 1990; Sanchez *et al.*,

1996). Por lo tanto se realizaron capturas intensivas en la Vega de Granada durante estas fechas. Para la obtención de embriones y fetos, se colocó una batería de trampas con el fin de capturar ejemplares al azar. De esta manera, las hembras capturadas eran sometidas a palpación abdominal para comprobar si se encontraban embarazadas. Sin embargo, éste método proporcionaba una baja eficiencia de captura de hembras preñadas, por lo que si la hembra no se encontraba en el estadio deseado, ésta era liberada. Debido a la alta territorialidad que presentan éstos animales, que se mueven en un radio de unos 10–30 metros en torno a su nido, se procedía a anotar el territorio del animal para su posterior recaptura en el día adecuado mediante la colocación de numerosas trampas alrededor del lugar inicial de captura. Para hembras que no se encontraban preñadas pero mostraban un orificio vaginal abierto se esperaron 21 días para su recaptura y comprobación de su estatus pasado ese tiempo.

Para establecer el estadio de desarrollo en el que se encontraban los embriones o fetos, se realizó una palpación abdominal de la madre. Esto permite estimar la longitud del embrión con una precisión de ± 1 mm. Este valor permite clasificar al embrión según los días de gestación, lo que permitía liberar a la hembra, si era necesario, para recapturarla cuando se hubiese alcanzado el estadio de desarrollo de interés en cada caso. Cuando el tiempo de espera no era superior a un día se alojaba a la hembra en una jaula especial y se le proporcionaba comida.

Puesto que las crías de topo permanecen en el nido hasta el destete, para su obtención se procedió a la localización de nidos. Los nidos de hembras se pueden reconocer directamente mediante la observación del territorio ya que suelen aparecer como montículos de tierra de entre 10–30 cm de altura y 50–70 cm de diámetro. Si el nido es reciente y no ha llovido desde su construcción, éste se encuentra formado por tierra removida. Si por el contrario el nido tiene varios meses, está formado por tierra fuertemente compacta y cubierto de vegetación. Los nidos que construyen los machos e individuos jóvenes se diferencian fácilmente porque tienen un tamaño menor y están menos elaborados.

Una de las estrategias utilizadas era capturar hembras en periodo de lactancia y localizar el nido dentro de su territorio. Las hembras lactantes eran reconocidas mediante un examen ocular de los pezones, ya que los tienen considerablemente agrandados. Una vez localizado el nido, éste era abierto y las crías eran examinadas en función de su tamaño, peso y morfología externa para comprobar si tenían la edad deseada, para retirarlas en caso afirmativo, o devolverlas al nido en el caso contrario, cerrándolo, y esperándolo el tiempo necesario. Los nidos se cerraron cuidadosamente para no perturbar a la madre y que ésta continuara con el cuidado de las crías de forma normal.

Otra estrategia consistía en seleccionar una alameda y proceder a la búsqueda de nidos mediante observación directa del terreno. Tras la apertura del nido se comprobaba si contenía crías. En caso negativo se instalaban algunas

4. Material y Métodos

trampas alrededor para capturar a la hembra de este territorio y comprobar en que estado se encontraba, con el fin de realizarle un seguimiento.

Una vez localizado el nido y obtenido las crías, éstas se llevaban rápidamente al laboratorio para su análisis y disección.

4.2.2. Determinación del estadio de desarrollo

Para la determinación del estadio de desarrollo de los ejemplares capturados se utilizaron los criterios de clasificación establecidos por [Barrionuevo *et al.* \(2004a\)](#). Esta clasificación tiene en cuenta parámetros como la medida de la longitud (CRL, *crown-rump length*) y del peso, además de la observación de caracteres como la presencia de pelo en la piel o el hocico, de uñas en las manos o la forma de la cabeza entre otros. Ya que durante los estadios s4 y s5, ocurren eventos importantes de la diferenciación gonadal, éstos se han subdividido en tres subestadios para hacer un análisis más preciso ([Barrionuevo *et al.*, 2004b](#)). El cuadro 4.2 muestra las características de cada estadio.

Cuadro 4.2: Estadios de desarrollo de *T. occidentalis*.

Estadio	Edad ^a	CRL ^b (mm)	Peso (g)	Características morfológicas
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 vibras 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)

4. Material y Métodos

4.2.3. Metodos citológicos e histológicos

Los embriones o fetos se extrajeron del útero de hembras preñadas y fueron medidos y pesados en una balanza de precisión. Las crías se sacrificaron mediante dislocación cervical y fueron pesadas a fin de establecer su estadio de desarrollo. Las gónadas de estos animales se aislaron mediante microdissección. De cada individuo, una de las gónadas se congeló en N₂ líquido tras la disección para su uso en técnicas moleculares y la otra fue procesada para realizar estudios histológicos e inmunológicos.

Determinación del sexo de los embriones

Debido a la imposibilidad de sexar embriones y fetos que se encontraban en un estadio de desarrollo inferior a s5b según sus características morfológicas, se realizaron preparaciones de cromatina sexual, a fin de establecer el sexo genético de cada animal. Para esta técnica se utilizó el método descrito por [Jiménez *et al.* \(2000\)](#), que fue desarrollado en nuestro laboratorio. Mediante esta técnica se tiñe el corpúsculo de Barr perteneciente al cromosoma X inactivado en las células del amnios de los individuos XX. El protocolo seguido se detalla a continuación:

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

Inclusión de material en parafina

Este material se procesó para su inclusión en parafina y la elaboración de cortes histológicos para su utilización en diversas técnicas.

Fijación. Tras su extracción, las gónadas fueron fijadas en paraformaldehído al 4 %, por un máximo de 24 horas.

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

- Dos lavados en PBS de 20 minutos cada uno.
- Deshidratar las piezas en una serie de soluciones de etanol:PBS : 50 %, 70 %, 96 %, 100 %. Se dejan 20 minutos en cada solución.
- Sumergirlas en etanol 100 % durante toda la noche a -20 °C.
- 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.
- Xileno durante 1 hora. En este paso se colocan las piezas en una estufa a 60 °C para que 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.
- Orientación de los bloques en moldes de plástico. Dejar solidificar 4-5 horas a temperatura ambiente.
- Almacenaje de los bloques a 4 °C hasta su uso.

Procesado de los bloques y montaje de los cortes. Las piezas incluidas se cortaron de forma seriada (5-8 μ m) utilizando un microtomo rotativo tipo Minot.

Para la obtención de las preparaciones histológicas se depositaron los cortes en portaobjetos tratados con polilysina (Polysine, VWR International, Belgium) a los que previamente se les aplicó una gota de H₂O destilada. Los portaobjetos se encontraban en una placa termostática estabilizada a 40 °C ya que dicha temperatura permite que la parafina se extienda sin llegar a fundirse. Las preparaciones se dejaban toda la noche a esa temperatura para favorecer la evaporación de H₂O y a la mañana siguiente se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Tinción con hemalumbre de Harris y Eosina. Mediante esta técnica se consigue una tinción violeta de los núcleos celulares (hemalumbre de Harris), mientras que los citoplasmas se tiñen de color rosado (Eosina)

- Desparafinar las preparaciones aplicando 3 lavados de Xileno de 10 minutos cada uno.

4. Material y Métodos

- Rehidratación mediante baños en alcoholes de mayor a menor gradación (EtOH 100 %, 96 %, 70 % y 50 %) durante 10 minutos cada uno.
- Lavar en H₂O destilada.
- Teñir con hemalumbre de Harris durante 3 minutos (Es posible que dicho tiempo varíe en función del estado de la solución).
- Virar el colorante mediante baño en H₂O corriente durante 5 minutos.
- Lavar con H₂O destilada.
- Teñir con Eosina durante 3 minutos.
- Deshidratar usando una serie de alcoholes de menor a mayor gradación (EtOH 50 %, 70 %, 96 % y 100 %) durante 4-5 segundos. El tiempo utilizado es el mínimo posible para no perder la tinción con Eosina.
- Xileno durante 1 minuto.
- Aplicación de medio de montaje DePeX y colocación de un cubreobjetos. Dejar solidificar.

Inclusión de material en resina

Con el siguiente protocolo se obtuvieron preparaciones de cortes semifinos de 2 μ M de grosor.

- Las gónadas se introducen en fijador de Karnovsky durante 1 hora.
- Lavar 3 veces con PBS durante 20 minutos cada uno.
- Fijación en OsO₄ al 1 % durante 2 horas.
- Lavar 3 o 4 veces con H₂O.
- Deshidratar usando una serie de alcoholes (EtOH 70 %, 90 % 100 % y 100 %) durante 15 minutos en cada uno.
- Sumergir en óxido de propileno durante 1 hora.
- Inclusión en epon/araldite:óxido de propileno (1:1) durante 2-3 horas a temperatura ambiente.
- Poner las muestras en un molde con epon/araldite recién mezclado, dejar que se sumerjan y llevar a un horno para su polimerización.
- Polimerizar a 60 °C durante 24-48 horas.

4.2.4. Métodos inmunológicos

Inmunofluorescencia indirecta

Mediante dicha técnica, se estudia el patrón de expresión de diversos genes detectando la presencia o ausencia de las proteínas que codifican mediante el uso de anticuerpos específicos. La señal se obtiene gracias a un anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia que se une al anticuerpo previo. Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de fluorescencia y las fotografías se tomaron utilizando una cámara digital Olympus DP70 instalada en un microscopio Olympus BX41.

- Calentar las preparaciones en una placa termoestable estabilizada a 55 °C hasta que se funda la parafina (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar aplicando 2 lavados de xileno de 20 minutos cada uno.
- Rehidratar las muestras en una serie de alcoholes de mayor a menor gradación (EtOH 100 %, 75 %, 50 % y 25 %) dejándolas 5 minutos en cada uno.
- Lavar 2 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) de 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: Transferir las preparaciones a un recipiente que contenga 500 ml de citrato de sodio (0,01M pH=6.0, pH=10.0 o pH=2.0) y calentar en el microondas a la máxima temperatura durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 100 ml de H₂O destilada al recipiente y se vuelve a calentar a máxima potencia durante otros 10 minutos.
- Dejar enfriar durante 30-40 minutos dentro del microondas.
- Aplicar 2 lavados con PBT de 10 minutos cada uno.
- Bloqueo con BSA al 10 % en PBT en cámara húmeda durante 1 hora.
- Añadir una dilución del anticuerpo primario en BSA al 1 % en PBT e incubar a 4 °C toda la noche en cámara húmeda.
- Lavar 3 veces en PBT dejándolas 20 minutos en cada uno.
- Añadir una dilución de anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo en BSA al 1 % en PBT e incubar 1 hora a temperatura ambiente y oscuridad en cámara húmeda.
- Realizar dos lavados en PBT en oscuridad de 30 minutos cada uno.
- Montaje en DAPI-Vectashield y observar al microscopio de fluorescencia.

4. Material y Métodos

Inmunohistoquímica

Esta técnica emplea el mismo fundamento que la inmunofluorescencia indirecta pero en lugar de utilizar fluorescencia para la detección de la señal, se emplea un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina que al contacto con DAB origina un precipitado marrón.

- Calentar las preparaciones en una placa termoestable estabilizada a 55 °C hasta que se funda la parafina (aproximadamente 20 minutos).
- Desparafinar aplicando 2 lavados de xileno de 20 minutos cada uno.
- Rehidratar las muestras en una serie de alcoholes de mayor a menor gradación (EtOH 100 %, 75 %, 50 % y 25 %) dejándolas 5 minutos en cada uno.
- Lavar 2 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 5 minutos cada uno.
- Recuperación de antígeno: Se lleva a cabo con Tris-EDTA (pH=9.0) o citrato de sodio (0,01M pH=6.0 o pH2.0) utilizando el método del microondas anteriormente descrito.
- Lavar 3 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 5 minutos cada uno.
- Bloqueo utilizando suero normal de la especie en que se ha sintetizado el anticuerpo secundario al 10 % en PBT durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Incubación con el anticuerpo diluido en la solución de bloqueo en cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C.
- Lavar 3 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 10 minutos cada uno.
- Bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena: Tratar las preparaciones con peróxido de hidrógeno al 3,5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente
- Lavar 2 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 10 minutos cada uno.
- Bloqueo de la actividad de biotina endógena: Tratar las preparaciones durante 15 minutos con una solución de Avidina D en cámara húmeda a temperatura ambiente. Enjuagar en PBT y aplicar una solución de Biotina durante 15 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 10 minutos cada uno.

- Incubación con el anticuerpo secundario, IgG conjugada con Biotina (1:150 en reactivo de bloqueo) durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Preparación de ABC reagent (10 μl de A + 10 μl de BC + 980 μl de PBT, Vector Laboratories, Burlingame, CA) e incubar 30 minutos a 4^o C en oscuridad.
- Lavar las preparaciones 3 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 10 minutos cada uno.
- Aplicar el ABC reagent a las preparaciones e incubar 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- Lavar 2 veces en PBT (Tween20 al 0,1 % en PBS) durante 10 minutos cada uno.
- Aplicar solución de DAB (1 μl H₂O₂ 35 % + 50 μl DAB 20x + 950 μl PBT) hasta la aparición de color, momento en que se detiene la reacción lavando la preparación con H₂O destilada.
- Realizar contratinción con Hematoxilina.
- Deshidratar con serie de alcoholes de menor a mayor gradación.
- Xileno durante 1 minuto.
- Aplicación de medio de montaje DePeX y colocación de un cubreobjetos. Dejar solidificar.

En los cuadros 4.3 y 4.4 se muestran los anticuerpos utilizados.

Elaboración de anticuerpos frente a la proteína WNT4 de *Talpa*

Debido a que los anticuerpos comerciales no reconocen la proteína WNT4 de *Talpa*, se procedió a realizar un anticuerpo para esta proteína. Con este fin se clonó y secuenció un fragmento de DNA complementario (cDNA) de este gen. Se sintetizaron péptidos con una secuencia de aminoácidos obtenida mediante el paquete informático EMBOSS, compilado para Linux. Este programa es capaz de identificar regiones con potencial antigénico a partir de una secuencia de nucleótidos (Rice *et al.*, 2000). El oligopéptido fue sintetizado en el Servicio de Síntesis de Péptidos del Centro de Biología Molecular (CBM), en Madrid.

Obtención de sueros inmunizados. Para la inmunización se utilizó un conejo de la raza Nueva Zelanda, de dos meses de edad, al que se le inyectaron sucesivas muestras del que contenían el oligopéptido sintetizado previamente. El conejo se mantuvo en un animalario en condiciones de esterilidad a 18 °C.

El protocolo de inmunizaciones que se siguió fue en siguiente:

4. Material y Métodos

Cuadro 4.3: Anticuerpos primarios utilizados

Proteína	Descripción	Fuente del anticuerpo	Procedencia
α -SMA	Actina de músculo liso.	Policlonal de ratón, obtenido a partir de la proteína de conejo.	Sigma. Ref. A2547
AR	Receptor de andrógenos.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína humana.	Santa Cruz Biotech. Ref. sc-815
CAV1	Proteína de membrana	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína humana	BD Biosciences. Ref. 610059
DES	Proteína de tipo III de los filamentos intermedios.	Monoclonal de ratón, obtenido a partir de la proteína de cerdo.	Santa Cruz Biotech, Ref. D1033
FOXL2	Factor de transcripción Forkhead.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína humana.	Dr. Reinier Veitia ^a
FST	Proteína implicada en el desarrollo ovárico.	Policlonal de cabra, obtenido a partir de la proteína de humano.	Santa Cruz Biotech. Ref. sc-23553
PTGDS	Proteína implicada en la síntesis de PGD2.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de ratón	Dr. Francis Poulat ^b
SF1	Factor esteroideogénico.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de ratón.	Dr. Ken Morohashi ^c
SOX9	Factor de transcripción SOX.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de humano.	Santa Cruz Biotech. Ref. sc-20095
WNT4	Proteína implicada en el desarrollo ovárico.	Policlonal de conejo, obtenido a partir de la proteína de topo.	Elaborado en nuestro laboratorio.
WT1	Factor de transcripción.	Monoclonal de ratón, obtenido a partir de la proteína de humano.	DAKO. Ref. M3561

(a) Université Denis Diderot/Paris VII et Institut Universitaire de France, París, Francia.;(b)Department of Genetics and Development, Institut de Génétique Humaine, Montpellier, Francia;(c) National Institute tor Basic Biology, Okazaki, Japón.

Cuadro 4.4: Anticuerpos secundarios utilizados

Anticuerpo	Tipo	Conjugado	Origen	Procedencia
Anti-cabra (IgG)	Policlonal	Biotina	Conejo	Vector Labs. Ref. BA-5000
Anti-conejo (IgG)	Policlonal	Biotina	Cabra	Vector Labs. Ref. BA-1000
Anti-ratón (IgG)	Policlonal	Biotina	Caballo	Vector Labs. Ref. BA-2000
Anti-cabra (IgG)	Policlonal	FITC	Conejo	Sigma. Ref. F7367
Anti-conejo (IgG)	Policlonal	Cy3	Oveja	Sigma. Ref. C2306
Anti-conejo (IgG)	Monoclonal	FITC	Ratón	Sigma. Ref. F4151
Anti-conejo (IgG)	Policlonal	Alexa Fluor 555	Cabra	Invitrogen. Ref. A21429
Anti-ratón (IgG)	Policlonal	Alexa Fluor 488	Cabra	Invitrogen. Ref. A11001

- Se realizó una primera inmunización, inoculando mediante vía subcutánea al animal una mezcla 900 μg de péptido liofilizado, 300 μl de adyuvante completo de Freund y 300 μl de PBS.
- Para las siguientes inoculaciones, hasta un total de 4, se inyectó vía muscular una mezcla compuesta de 500 μg de péptido liofilizado, 300 μl de adyuvante incompleto de Freund y 300 μl de PBS. Entre inmunizaciones se dejó pasar un periodo de 10 días durante el cual se midió el título del suero del conejo, para lo que se obtuvo 1.5 ml de sangre.
- Pasados 10 días tras la última de las inmunizaciones, se procedió a realizar un sangrado de la vena marginal del conejo para obtener el título mediante la técnica de ELISA. El título obtenido fue de 1/450, considerandose éste suficientemente alto, por lo que se procedió a realizar otro sangrado por punción cardíaca, para obtener mayores volúmenes de sangre.

Test de ELISA

Mediante el test de ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay) se obtuvo el título del anticuerpo. Se siguió el protocolo detallado a continuación:

- Activación de la placa de microtitulación mediante la adición de 25 μl de metanol y dejando que éste se evapore.
- Adición de una disolución de 1 μg de antígeno en 100 μl de tampón carbonato a cada pocillo. Incubar durante 16 horas a 4 °C en cámara húmeda para que el antígeno se fije a la placa.
- Lavar 3 veces con PBT (Tween20 0.3 % en PBS).
- Bloqueo de la placa mediante la adición de 200 μl de tampón de bloqueo (leche en polvo 2 % en PBS + Tween20 0.1 %). Incubación de la placa a 37 °C durante 1 hora.
- Lavar 3 veces con PBT
- Añadir a cada pocillo 100 μl 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) e incubar a 37 °C durante 45 minutos.
- Lavar 4 veces con PBT
- Incubar con 100 μl de una dilución 1/1000 de anticuerpo secundario conjugado (anti-conejo IgG marcado con peroxidasa) durante 30 minutos a 37 °C
- Lavar 4 veces con PBT

4. Material y Métodos

- Añadir 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de H_2O_2 30% (P/V) a la solución sustrato de la peroxidasa. Anadir 100 μl de esta solución a cada pocillo y dejar en oscuridad durante 20 minutos.
- Parar la reacción mediante la adición de 50 μl de solución de parada (HCl 3M) al volumen de cada pocillo.
- Medir la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA y determinar la concentración más baja de suero que presenta inmunoreactividad.

4.2.5. Métodos de análisis molecular

Extracción de DNA genómico

Para la elaboración de dicha técnica se siguió el método de ([Sambrook *et al.*, 1989](#)) con algunas modificaciones

- Extracción del material y homogeneizado del mismo en PBS.
- Centrifugación a 1 000 rpm durante 10 minutos.
- Decantar el sobrenadante.
- Lavado en PBS, centrifugando a 1 000 rpm durante 10 minutos cada vez.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 4 ml de tampón de extracción.
- Añadir a la suspensión 50 μl de solución de proteinasa K y 4 ml de tampón de lisis. Mezclar suavemente e incubar durante 5-12 horas en un baño de agua a 56 °C.
- Añadir 100 μl de una solución de RNAsa e incubar a 37 °C durante 3 horas.
- Añadir un volumen igual de fenol, mezclar y centrifugar a 14000 rpm durante 10 minutos.
- Recoger la fase acuosa (fase superior que contiene el ADN) y transferirla a un tubo
- Extracción con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Añadir un volumen igual al que tenemos, mezclar, volver a centrifugar y coger la fase acuosa.
- Extracción con una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Añadir un volumen igual al que tenemos, mezclar, volver a centrifugar y coger la fase acuosa.

- Transferir el ADN (fase acuosa) a un tubo en hielo y añadirle 200 μ 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 70 % a -20 °C y lavar.
- Secar durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender en agua ultrapura autoclavada.
- Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % para comprobar el estado del ADN.
- Almacenar a 4 °C.

Extracción de RNA total

Para realizar los estudios de RT-Q-PCR se utilizaron gónadas de embriones y crías de los diferentes estadios del desarrollo. Debido a la escasez de material de partida, sobre todo en los estadios embrionarios, para estos análisis las muestras analizadas agrupaban las gónadas de dos estadios consecutivos. Para esta técnica se ha utilizado el reactivo “Quiazol Lysis Reagent” (QIAGEN, Valencia, CA) de acorde con el protocolo proporcionado por el fabricante, con algunas modificaciones:

- Esterilizar el material que se va a usar para homogeneizar con NaOH 0.5 M durante 10 minutos y lavarlo con H₂O DEPC.
- Sacar la muestra del contenedor de N₂ líquido. Actuar con rapidez para evitar degradación.
- Transferir el material a un tubo libre de RNAsa y añadir rápidamente 1 ml de Trizol. El volumen de Trizol no debe exceder el 10 % del volumen de la muestra.
- Homogeneizar hasta una total disrupción del tejido, centrifugar y pasar por una aguja de insulina repetidas veces. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente para que se disocien las nucleoproteínas.
- Añadir 200 μ l de Cloroformo. Aplicar e incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12 000 g durante 15 minutos a 4°C. Separar la fase acuosa cuidadosamente para no contaminar con proteínas de la interfase.

4. Material y Métodos

- Añadir 0.5 ml de Isopropanol y 1 μ l de Glicógeno (*carrier* para precipitar muestras pequeñas). Vortex e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12 000 g durante 10 minutos a 4°C. Eliminar la fase acuosa sin provocar disrupción en el sedimento.
- Añadir 1 ml de etanol 75 % preparado con H₂O libre de nucleasas.
- Centrifugar a 7 500 g durante 5 minutos a 4°C. Eliminar todo el etanol posible con una pipeta sin provocar disrupción en el sedimento.
- Secar al aire durante 10 minutos.
- Resuspender mediante suave pipeteo en un volumen apropiado de H₂O libre de nucleasas e incubar durante 10 minutos 60°C aplicando vortex cada 3 minutos.
- Medir concentración en Nanodrop.
- Realizar electroforesis en gel agarosa al 1 %, cargando aproximadamente 0.5 μ g de RNA y comprobar que existen dos bandas de ribosómico, indicador de que el RNA no se encuentra degradado.

Tratamiento con DNAsa

Mediante este tratamiento se elimina cualquier traza de DNA genómico que haya podido contaminar la muestra de RNA total durante su extracción. La reacción se llevó a cabo utilizando “DNase I Amplification Grade” (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acorde al protocolo proporcionado por el fabricante:

- Mezclar lo siguiente:
 - RNA: 8 μ l
 - 10 \times DNase I Reaction Buffer: 1 μ l
 - DNase I: 1 μ l
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 1 μ l de 25mM EDTA. Incubar durante 10 minutos a 65 °C.
- Proceder inmediatamente con la reacción de reverso transcripción o almacenar a -20 °C hasta su uso.

Reacción de reverso transcripción

Para llevar a cabo esta reacción se utilizó el “Superscript First-Strand Syntesis System” kit (Invitrogen)

- Mezclar lo siguiente:
 - Random primers (50 ng/ μ l): 1 μ l
 - RNA: 10 μ l
 - dNTP Mix (10mM cada uno): 1 μ l
- Incubar durante 5 minutos a 65 °C y enfriar en hielo.
- Añadir a la mezcla lo siguiente:
 - 5x First-Strand Buffer: 4 μ l
 - 0.1M DTT: 2 μ l
 - RNaseOut: 1 μ l
- Incubar durante 2 minutos 25 °C.
- Añadir 1 μ l de SuperScript II RT y mezclar pipeteando.
- Incubar durante 10 minutos a 25 °C.
- Incubar durante 50 minutos a 42 °C.
- Inactivar la reacción incubando durante 15 minutos a 70 °C.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

Diseño de primers para PCR y RT-Q-PCR

Para cada gen del cuadro 4.5, se alinearon secuencias de diferentes especies, obtenidas de la base de datos del EMBL, utilizando el programa “matcher”. Posteriormente se elaboró una secuencia consenso mediante el programa “cons”. La elección de los cebadores se llevó a cabo introduciendo la secuencia consenso en el programa “eprimer3”, una interfaz del programa “primer3” del Instituto Whitehead.

En la medida de lo posible, se intentó elegir cebadores que se encontraran en diferentes exones del gen, para evitar así que hubiera amplificación en el DNA genómico.

Para RT-Q-PCR, los cebadores fueron diseñados para amplificar fragmentos de 100-300 pares de bases. Para hibridación *in situ*, se amplificaron fragmentos de 500-700 pares de bases. El fragmento que se amplificó para realizar el anticuerpo de WNT4 específico de topo fue de 294 pb

4. Material y Métodos

Cuadro 4.5: Cebadores utilizados

Gen	Descripción	Cebadores	pb
RT-Q-PCR			
<i>18s</i>	RNA ribosomal 18s	F:CGCTCGCTCCTCTCCTACTT R:GGCACGGCGACTACCATC	271
<i>DHH</i>	Desert hedgehog	F:ACCCCGACATAATCTTCAAGGAT R:GTACTCCGGGCCACATGTTT	120
<i>FGF9</i>	Fibroblast growth factor 9	F:CGTGGACAGTGGACTCTACCT R:AATTTCTGGTGCCGTTTAGTCCTC	225
<i>FOXL2</i>	Forkhead box L2	F:ATAGCATCCGCCACAACCTC R:GCCGGTAGTTGCCCTTCTC	135
<i>FST</i>	Follistatin	F:ACCTCCTCTGAACAGTATCTC R:CTTTCCTCATAGGCTAATCCA	117
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	F:GATGACATCAAGAAGGTGGTG R:TCATAACCAGGAAATGAGCTTG	179
<i>GPI</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	F:GACGCCCCTGGAGAAGAA R:GGTGCCTTGGTGGATGAG	271
<i>PTCH1</i>	Patched 1	F:GGCACAGTCAAGAACAGCAC R:CAGGGTCGTCGTGGTAAAGG	249
<i>RSPO1</i>	R-spondin 1	F:CAATGTGAAATGAGCGAGTGGT R:GGTCTCCTTGATGTCAGAGCAG	149
<i>SOX9</i>	SRY (sex determining region Y)-box 9	F:TCATGAAGATGACCGACGAGC R:CTTGTTCTTGCTGGAGCCGTT	287
<i>WNT4</i>	Wingless-related MMTV integration site 4	F:AGGAAGGCTATCCTGACACAC R:GGCACCGTCGAATTTCTCT	294
Fragmentos de mayor longitud			
<i>DHH</i>	Desert hedgehog	F:CGGCTTGGACTGGGTCTACTAC R:GCGCCCACTGGTGACTCT	554
<i>FGF9</i>	Fibroblast growth factor 9	F:TGATGGCTCCCTTAGGTGAA R:GGGTCCACTGGTCTAGGTAAA	583
<i>PTCH1</i>	Patched 1	F:GCTGGGAGGAAATGCTGAATAAGG R:GATCAATGAGCACAGGCCAG	644
<i>RSPO1</i>	R-spondin 1	F:AAGGGCTGTGAGCTCTGTCT R:GCCTCCTTGCTCTCCTTCC	581

Amplificación mediante PCR

Esta reacción se llevó a cabo utilizando “Biotools DNA Polymerase” (Biotools, Madrid, ESPAÑA) según indicaciones del fabricante:

- Se mezclan los siguientes componentes:
 - 10× Reaction Buffer: 5 μ l
 - dNTP Mix 10 mM: 1 μ l
 - Oligonucleótidos: 0.5 μ l de cada uno
 - Taq Polymerase (1 U/ μ l): 1.25 μ l
 - cDNA: 2 μ l
 - H₂O libre de nucleasas: 39.5 μ l
- Mezclar pipeteando y centrifugar brevemente.
- Introducir tubos los tubos en el termociclador.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- (95 °C, 10 min)
- (95 °C, 15 seg) (X °C, 15 seg) (72 °C, Y seg) × 40 ciclos
- (72 °C, 5 min)

X = Temperatura óptima de hibridación, específica para cada pareja de cebadores. Y = Tiempo de extensión dependiente de la longitud del fragmento a analizar.

PCR cuantitativa en tiempo real (RT-Q-PCR)

Tras la síntesis de cDNA, se realizó la cuantificación de diversos genes utilizando un termociclador Chromo 4 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, USA) utilizando SensiMix dt kit (Quantace, Reino Unido). Para llevar a cabo la reacción, se mezclaron los siguientes componentes:

- Sensimix 2x: 5 μ l
- Forward primer (10pmol/ μ l): 0.2 μ l
- Reverse primer (10pmol/ μ l): 0.2 μ l
- cDNA: 4 μ l
- H₂O libre de nucleasas: 0.6 μ l

4. Material y Métodos

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

- (95 °C, 10 min)
- (95 °C, 15 seg) (X °C, 15 seg) (72 °C, Y seg) (Lectura de placa) × 40 ciclos
- (72 °C, 5 min)
- Curva de melting desde 72 °C hasta 94 °C con lectura cada 1 °C manteniendo durante 1 segundo.

La identidad de los fragmentos amplificados se comprobó mediante secuenciación de DNA, curva de desnaturalización y electroforesis en gel de agarosa 1.5 %. La eficiencia de la amplificación para cada pareja de cebadores se comprobó mediante la elaboración de una curva estándar con diluciones seriadas de cDNA. El valor de la eficiencia de amplificación (E) se calculó utilizando el valor de pendiente de la curva estándar (m) según la siguiente ecuación:

$$\Delta E = 1 - 10^{-1/m}$$

El tanto por ciento de eficiencia se calculó según la siguiente fórmula:

$$\%Eficiencia = (E - 1) \times 100$$

Sólo se utilizaron cebadores con una eficiencia de amplificación 90 %-105 %.

Los niveles de expresión de los genes se calcularon mediante el método ΔCT . Para nuestro estudio se utilizaron 3 genes de referencia: GAPDH, GPI y 18S. Se realizó una media geométrica de los valores de CT para los 3 genes de referencia. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la expresión relativa de cada gen con respecto a los genes de referencia, donde “reference” se refiere a la media de los genes de referencia y “target” al gen objetivo de estudio:

$$\Delta CT = 2^{CT_{(reference)} - CT_{(target)}}$$

Los valores obtenidos se estandarizaron dividiéndolos entre el menor valor de expresión dentro de los diferentes estadios de desarrollo.

Electroforesis en gel de agarosa y purificación de fragmentos

La electroforesis en gel de agarosa se realizó mediante el sistema de electroforesis submarina en gel (Sharp *et al.*, 1973). Los fragmentos de DNA se separaron en base a su tamaño utilizando geles de agarosa al 1.5 % en TAE aplicando una corriente de 5 V/cm. Los fragmentos se cortaron de la agarosa utilizando un escalpelo y fueron purificados utilizando el “QIAquick gel extraction kit” (QIAGEN, Germany) según instrucciones del fabricante:

- Añadir 3 volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel. Incubar a 50 °C durante 10 minutos (o hasta que el gel se disuelva completamente). Aplicar vortex cada 2-3 minutos durante la incubación para favorecer la disolución del gel.
- Añadir 1 volumen de isopropanol y mezclar.
- Transferir hasta un máximo de 800 μl la mezcla en una columna QIAquick depositada sobre un tubo de 2 ml y centrifugar durante 1 minuto a 17 900 \times g. Eliminar el residuo líquido del tubo y volver a poner la columna sobre el mismo.
- Añadir el resto de la mezcla y repetir la operación.
- Añadir 0.5 ml de buffer QG a la columna y centrifugar durante 1 minuto a 17 900 \times g.
- Agregar 0.75 ml de Buffer PE a la columna, esperar 2-5 minutos y centrifugar durante 1 minuto a 17 900 \times g.
- Descartar el residuo líquido y centrifugar durante 1 minuto a 17 900 \times g.
- Depositar la columna sobre un tubo nuevo de 1.5 ml y eluir el DNA mediante la adición de 30 μl de Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH=8.5) al centro de la columna. Esperar 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto a 17 900 \times g.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

Clonación de fragmentos de DNA

Diversos fragmentos de DNA fueron clonados según el protocolo descrito a continuación:

Introducción del fragmento de DNA en vector. Para clonar el fragmento de DNA deseado, previamente se introdujo el mismo en un vector. Para ello se utilizó el kit “PGEM vector T System 1” (Promega, Madison, WI, USA). Este vector tiene extremos protuberantes en 3' en los que hay dTTP. Esto permite el ligado con productos de PCR obtenidos con Taq polimerasa, que presentan extremos protuberantes en 3' donde hay dATP. Este vector, además, confiere a la bacteria resistencia a ampicilina, lo que permite hacer una selección de bacterias recombinantes en medios que contienen IPTG y X-gal.

La reacción de ligado se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Mezclar lo siguiente:
 - Buffer2x: 5 μl

4. Material y Métodos

- Vector: 1 μ l
- T4 Ligasa: 1 μ l
- Inserto: * μ l
- H₂O milliQ hasta 10 μ l

*Cantidad suficiente para que tengamos una relación inserto:vector de 3:1
[$X_{ngins} = \frac{50 ng_{vec} \times X_{kbins} \times 3}{3 kb_{vec}}$]

- Incubar a 4 °C durante toda la noche.

Preparación de bacterias competentes. Las bacterias a las que se les introdujo el vector pertenecían a la cepa XL1-Blue MRF' de *Escherichia coli*. La cepa se preparo de la siguiente manera:

- Sembrar una placa de medio mínimo M9 con bacterias XL1-Blue MRF' procedentes de un stock glicerolado. Incubar toda la noche a 37 °C.
- Aislar una colonia y transferirla a un tubo que contenga 5 ml de medio LB líquido. Incubar toda la noche a 37 °C con agitación.
- Añadir 400 μ l del cultivo anterior a 40 ml de medio LB líquido. Incubar a 37 °C con agitación.
- Medir la DO a 540 nm cada cierto tiempo hasta que ésta alcance un valor comprendido entre 0.4 y 0.6.
- Dejar enfriar el cultivo en hielo. Centrifugar a 4 000 rpm y a 4 °C durante 10 minutos.
- Resuspender el precipitado formado en 20 ml de una solución estéril y fría de CaCl₂ 50 mM.
- Incubar durante 30 minutos en hielo.
- Centrifugar a 4 000 rpm y a 4 °C durante 10 minutos.
- Resuspender el precipitado en 4 ml de la solución CaCl₂ 50 mM.
- Incubar en hielo durante varias horas antes de usar las bacterias.
- Las bacterias competentes pueden almacenarse en glicerol (solución estéril de glicerol 15 % en CaCl₂ 50mM) a -70 °C por un máximo de 6 meses.

Transformación de bacterias competentes.

- Descongelar una alícuota de células competentes (unos 50 μl) en hielo, unos 5-7 minutos.
- Añadir 5 μl de la reacción de ligado (guardar el resto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Pipetear suavemente.
- Mantener en hielo durante unos 25 minutos y volcar suavemente de vez en cuando.
- Heat shock a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 45 segundos.
- Incubar 2 minutos en hielo.
- Añadir de 0.5 ml a 1 ml de medio LB (sin antibiótico) e incubar durante 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación.
- Centrifugar 5 000 rpm 5 min y tirar sobrenadante y quedarse con unos 50-100 μl y resuspender el pellet
- Sembrar en placas de medio LB sólido con ampicilina, IPTG y X-Gal.
- Incubar toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Obtención de DNA plasmídico. Colonias individuales de bacterias transformadas fueron inoculadas en 3 ml de medio LB con ampicilina y el cultivo se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación durante toda la noche.

Para la obtención del plásmido se realizaron minipreparaciones utilizando el kit “QIAprep spin miniprep kit” (QIAGEN, Germany) siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante con ligeras modificaciones:

- Centrifugar el cultivo a 8 000 g durante 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Desechar el sobrenadante y añadir 250 μl de buffer P1 (que contenga RNAsa A) . Resuspender mediante vortex.
- Añadir 250 μl de buffer P2 y mezclar invirtiendo el tubo 4-6 veces. Dejar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 350 μl de buffer P3 y mezclar invirtiendo el tubo 4-6 veces. Mantener el tubo durante 15 minutos en hielo.
- Centrifugar el lisado durante 20 minutos a 17 900 g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo que contiene 700 μl de isopropanol. Mezclar suavemente e incubar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1-2 horas.
- Centrifugar a 17 900 g durante 25 minutos.

4. Material y Métodos

- Desechar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol 70 %.
- Centrifugar a 17 900 g durante 10 minutos. Retirar todo el etanol porque puede interferir en reacciones posteriores.
- Dejar secar el precipitado al aire durante 2-3 horas a temperatura ambiente o durante 15-20 minutos a 37 °C.
- Resuspender el plásmido en 40 μl de buffer TE o H₂O libre de nucleasas.
- Medir absorbancia a 260 nm para analizar el rendimiento.
- Almacenar a -20 °C hasta su uso.

Análisis de los transformantes positivos. Se realizó una digestión con enzimas de restricción con dianas situadas en el polilinker del plásmido a ambos lados del inserto. La digestión se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar que el inserto era del tamaño esperado.

Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se llevó a cabo utilizando “Big DYE Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, USA). La reacción llevada a cabo fue la siguiente:

- Mezclar los siguientes componentes:
 - Primer de secuenciación (T7 o SP6) o primers específicos (3.2 μM): 1 μl
 - Premix: 3 μl
 - Tampón 5 \times : 2 o 4 μl
 - DNA: 100 ng si es producto de PCR y 500 ng si es plásmido
 - H₂O ultrapura: hasta un volumen final de 10 o 20 μl
- Realizar una amplificación lineal en un termociclador de acorde al siguiente programa:
 - (94 °C, 3 min)
 - (96 °C, 10 seg) (50 °C, 5 seg) (60 °C, 4 min) \times 25 ciclos
- Purificación con NaOAc y etanol:
 - A 20 μl de la reacción de secuenciación, añadir 80 μl de la siguiente mezcla y aplicar vortex:
 - Etanol 95 %: 62.5 μl

- 3M NaAc pH=4.6: 3 μ l
 - H₂O ultrapura: 14.5 μ l
 - Incubar 15 minutos a temperatura ambiente
 - Centrifugar 30 minutos a 14 000 rpm a 4 °C. Eliminar sobrenadante.
 - Añadir 250 μ l de etanol 70 % a -20 °C. Centrifugar 20 minutos a 14 000 rpm a 4 °C.
 - Eliminar todo el etanol para que no interfiera con reacciones posteriores.
 - Secar el precipitado a 37 °C durante 15 minutos o hasta que se seque completamente.
 - Se puede almacenar a -20 °C hasta un año.
- Añadir 20 μ l de formamida y resuspender.
 - Cargar la muestra en el secuenciador.

Hibridación *in situ*

Preparación de la ribosonda. El DNA a transcribir se clonó en el vector de transcripción pGEMT, que contiene promotores para las RNA polimerasas SP6 y T7.

Digestión. Se realizo una digestión de los clones positivos con enzimas de restricción para obtener sondas sentido y antisentido. La reacción fue la siguiente:

- DNA: 25 μ g
- Buffer enzima: 10 μ l
- Enzima: X μ l (X depende de la enzima utilizada)
- H₂O: hasta 100 μ l

Incubar toda la noche a la tempratura requerida (dependiente de la enzima)

Purificación de la reacción de digestión. La reacción de digestión se purifico utilizando “PCR Purification Kit” (QIAGEN, Alemania) según indicaciones del fabricante:

- Añadir 5 volúmenes de Buffer PB a la muestra.

4. Material y Métodos

- Poner columna en tubo de 2 ml. Añadir muestra , esperar 4-5 min y centrifugar durante 5 minutos a 17 900 g. Descartar sobrenadante.
- Lavar la columna con 750 μ l Buffer PE. Centrifugar durante 5 minutos a 17 900 g. Descartar sobrenadante.
- Centrifugar columna durante 1 minuto a 17 900 g en un tubo de 2 ml para eliminar restos de buffer.
- Añadir 25 μ l buffer EB o H₂O en el centro de la membrana de la columna. Poner la columna en un tubo de 1.5 nuevo. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar durante 1 minuto a 17 900 g.
- Medir concentración en Nanodrop.
- Analizar la muestra mediante una electroforesis de agarosa cargando la muestra junto con un plásmido sin digerir para poder comparar.

Transcripción *in vitro*. Para la obtención de ribosondas sentido y anti-sentido se utilizó el “Dig-RNA labeling Kit” (Roche Applied Sciences). Estas ribosondas van marcadas con digoxigenina. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Se mezclan los siguientes componentes:
 - DNA: 1-4 μ g
 - Transcription Buffer: 2 μ l
 - dNTPs: 2 μ l
 - RNA Polymerase (SP6 o T7): 2 μ l
 - RNase inhibitor: 1 μ l
 - H₂O libre de nucleasas: hasta 20 μ l
- Incubar durante 2 horas 37 °C.
- Añadir 2 μ l DNAsa e incubar durante 20 minutos a 37 °C.
- Precipitar añadiendo a la reacción lo siguiente:
 - Yeast extract (10 μ g/ul): 1 μ l
 - dH₂O TE ph7.5: 100 μ l
 - 4MLiCl: 10 μ l
 - EtOH 100 %: 300 μ l
- Incubar durante 1-2 horas a -80 °C o toda la noche a -20°C.
- Centrifugar a 13 200 g durante 15-20 minutos a 4°C.

- Lavar con etanol 70 %.
- Centrifugar a 13 200 g durante 15-20 minutos a 4°C.
- Secar en estufa a 37°C durante 10 minutos.
- Resuspender en 100 μ l H₂O libre de nucleasas.
- Añadir 1 μ l RNase inhibitor.
- Analizar la muestra mediante una electroforesis de agarosa al 1 % cargando 5 μ l.

Hibridación *in situ*. Esta técnica se realizó en cortes en parafina. El protocolo que se utilizó fue el siguiente:

- Desparafinar las preparaciones calentandolas a en una placa termostática estabilizada a 55 °C hasta que la parafina se derrita.
- Lavar 2 veces con Xileno durante 5 minutos cada uno.
- Hidratar utilizando una serie decreciente de soluciones de etanol:PBS DEPC (100 %, 100 %, 75 %, 50 % y 25 %) durante 3 minutos cada uno.
- Aplicar 2 lavados en PBS DEPC de 5 minutos cada uno.
- Prefijación con PFA 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuagar con PBT DEPC y dar 2 lavados de PBT DEPC [PBS + Tween 20 (0.01 %)] de 5 minutos cada uno.
- Tratamiento con Proteinasa K (1 μ g/1 ml en PBS DEPC) a 37 °C durante 10 minutos.
- Aplicar 2 lavados de PBT DEPC de 5 minutos cada uno.
- Postfijación con PFA 4 % durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Enjuagar con PBT DEPC y dar 2 lavados de PBT DEPC [PBS + Tween 20 (0.01 %)] de 5 minutos cada uno.
- Acetilación. Mezclar vigorosamente 8 ml de TEA 1M pH=8.0 con 200 μ l de anhídrido acético y completar con H₂O hasta 80 ml. Llenar el recipiente con la mezcla e introducir las preparaciones. Mantener durante 15 minutos.
- Enjuagar con PBT DEPC y dar 2 lavados de PBT DEPC [PBS + Tween 20 (0.01 %)] de 5 minutos cada uno.
- Deshidratar utilizando una serie creciente de soluciones de etanol:PBS DEPC (25 %, 50 %, 75 %, 100 % y 100 %) durante minutos cada uno, excepto el de 75 % que se mantiene durante 10 minutos.

4. Material y Métodos

- Secar las preparaciones a 40 °C en placa termostática. Las preparaciones pueden ser almacenadas tras este paso si es necesario a 4 °C.
- Prehibridación. Calentar solución de hibridación a 85 °C durante 5 minutos. Transferir inmediatamente a hielo. Aplicar 150 μ l a cada preparación, cubrir con parafilm e incubar durante 30 minutos a la temperatura de hibridación (depende de la sonda) en una cámara húmeda que contiene 50 % Formamida/ 2 \times SSC.
- Hibridación. Mezclar solución de hibridación con la sonda para que ésta quede a una concentración de 1 μ g/ μ l e incubar a 85 °C durante 5 minutos. Transferir inmediatamente a hielo. Retirar el líquido de cada preparación, aplicar 300 μ l de la solución con la sonda y poner un cubreobjetos de vidrio. Incubar durante toda la noche a la temperatura de hibridación (depende de la sonda) en una cámara húmeda que contiene 50 % Formamida/ 2 \times SSC.
- Lavados. Los tampones de lavados se precalentaron antes de aplicarlos:
 - Quitar los cubreobjetos enjuagando en 5x SSC a la temperatura de hibridación.
 - Lavar con 50 % Formamida/ 1xSSC durante 30 minutos a la temperatura de hibridación.
 - Lavar con TNE durante 10 minutos a 37 °C.
 - Tratamiento con RNAsa A 20 μ g/ml en TNE durante 30 minutos a 37 °C.
- Lavados. Los tampones de lavados se precalentaron antes de aplicarlos:
 - Lavar con TNE durante 10 minutos a 37 °C.
 - Lavar con 2 \times SSC durante 20 minutos a la temperatura de hibridación.
 - Lavar con 0.2 \times SSC durante 20 minutos a la temperatura de hibridación.
 - Lavar con 0.2 \times SSC durante 20 minutos a la temperatura de hibridación.
 - Dos lavados con MABT a temperatura ambiente durante 5 minutos cada uno.
- Bloqueo con 20 % HISS/MABT durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda que contiene H₂O destilada.
- Preparar anticuerpo anti-digoxigenina a una dilución 1:2000 en 2 % HISS/MABT una hora antes de su aplicación y guardar a 4 °C hasta su uso.
- Incubación con anticuerpo anti-digoxigenina durante toda la noche a 4 °C en cámara húmeda que contiene H₂O destilada.

- Enjuagar con MABT y aplicar 3 lavados con MABT de 5 minutos cada uno.
- Lavado con NTMT pH=9.5 durante 10 minutos.
- Preparar sustrato mezclando 1 ml BM Purple AP Substrate Precipitating (Roche, Alemania) + 10 μ l 100 \times levamisole + 2 μ l Tween 50 %. Aplicar e incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda hasta que se desarrolle color.
- Detener la reacción enjuagando en NTMT pH=9.5
- 2 lavados en PBS de 5 minutos cada uno.
- Montar con gelatina de glicerol y almacenar a temperatura ambiente.

4.2.6. Cultivo de órganos

Con el fin de estudiar procesos de migración desde tejido mesonefrico hacia la gónada en *Talpa occidentalis*, nuestro grupo desarrolló un método mediante el cual, células mesonefricas de ratón marcadas con fluorescencia forman unos agregados celulares, los cuales se ensamblan con gónadas recién diseccionadas y se depositan en unos geles de agar que contienen unos pocillos para mantener la estructura tridimensional del órgano y forzar la recombinación de los tejidos. Transcurridas 48 horas dichos cultivos de recombinación se visualizan mediante microscopía confocal láser.

Preparación de gel de agar.

Se utilizan unos discos de agar con surcos, para que los cultivos de recombinación puedan ensamblarse y tengan un crecimiento óptimo. El tamaño y forma de dichos surcos es importante para mantener la morfología tridimensional del órgano. Para dicho fin se mandaron construir unos moldes en aluminio.

Para la elaboración del gel se utilizó el siguiente protocolo:

- Se pesan 0.375 mg de agar y se añaden a un tubo Falcon de 25 ml. Se añade hasta 25 ml de medio DMEM (Sigma, USA)
- Calentar en microondas hasta que se disuelva el agar, llevándolo a ebullición 4 o 5 veces.
- Depositar 1 ml del medio en el molde en condiciones de esterilidad.
- Dejar solidificar 10-20 min. El resto se guarda a temperatura ambiente hasta el próximo uso.

4. Material y Métodos



Figura 4.1: Molde para la elaboración de discos de agar.



Figura 4.2: Disco de agar.

- Con ayuda de una cuchilla se separa el gel del molde, se deposita en una placa de Petri pequeña y se le añaden 2 ml de medio líquido DMEM suplementado con 10 % FCS (fetal calf serum) y ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
- Meter en la estufa a 37 °C con 5 % de CO₂ durante un mínimo de 2 horas para equilibrar (se puede mantener durante toda la noche).
- Cuando llegue el momento de utilizar, eliminar todo el medio con una

micropipeta y añadir 400 μ l de medio fresco. Retirar medio suficiente para que los pocillos se queden sin líquido.

Elaboración de cultivos celulares mesonefricos

Se realizaron disecciones de embriones de ratón que se encontraban en 13.5 dpc. Durante este periodo, las células mesonefricas son susceptibles de migrar al interior de la gónada si reciben las señales necesarias. Una vez las células se mantienen en cultivo estable, no pierden su capacidad migratoria. Para ello, se utilizo el siguiente protocolo:

- Se extraen los complejos mesonefros-gónada y se aíslan los mesonefros utilizando una aguja de insulina.
- Se colectan todos los mesonefros en un tubo de 1.5 ml. Se añaden 50 μ l de medio DMEM completo [suplementado con 10 % FCS (fetal calf serum) y ampicilina (100 μ g/ml)].
- Se procede a la disgregación mecánica utilizando un pistilo.
- Se recoge el disgregado y se transfiere a un frasco Flask de cultivo que contiene 8 ml de medio DMEM completo.
- Se incuba en una estufa a 37 °C con 5 % de CO₂ hasta que el cultivo esté confluyente.

Marcaje de células y formación de agregados celulares

Las células mesonefricas de ratón se marcan con fluorescencia y son sometidas a rotación para que se formen agregados celulares, los cuales se cultivan pegados a las gónadas, produciendose recombinación entre ambas estructuras. Para la formación de estos agregados, se construyó un dispositivo que sometía a los tubos a rotación constante a una velocidad de 7 rpm.

- Se lava el cultivo 2 veces con solución de Hank (Sigma, USA).
- Se añade 1 ml de tripsina-EDTA 1 \times (Trypsin-EDTA solution 10 \times , Sigma, USA) en solución de Hank durante 10 minutos (o hasta que se despeguen las células)
- Se realizan 2 lavados con PBS.
- Se procede al marcaje de las células con fluorescencia mediante la incubación con CFDA a una concentración de 20 μ M en PBS durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C.

4. Material y Métodos

- Se lavan las células con medio de cultivo durante 30 minutos a una temperatura de 37 °C.
- Se transfieren las células a un tubo con fondo cónico y se centrifugan a 1200 rpm durante 5 minutos.
- Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en 300 μ l de medio de cultivo.
- El tubo se deposita en el dispositivo rotatorio en la estufa a 37 °C con 5% de CO₂ durante 6 horas como mínimo (han de formarse agregados celulares)

Cultivos de recombinación

Para realizar estos cultivos se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

- Se realiza la disección de los embriones y el aislamiento de los complejos gónada-mesonefros. Se separan las gónadas con una aguja.
- Se transfieren los agregados a una placa de Petri y se lavan varias veces con medio DMEM.
- Se ensamblan los cultivos en el disco de agar, depositando gónadas en los pocillos con ayuda de un capilar de vidrio unido a un dispositivo de pipeteo bucal y acoplado a cada gónada un número suficiente de agregados celulares para llenar la porción de tejido donde antes se hallaba el mesonefros.
- Se retira el medio y se añade 400 μ l medio fresco retirando el líquido de los pocillos.
- Se transfiere a la estufa a 37 °C con 5% de CO₂ durante 48 horas. El medio se cambia cada 12 horas.
- Se transfieren las gónadas a un tubo con paraformaldehído al 4% donde se fijan durante al menos 1 hora a 4 °C y en oscuridad.
- Se lavan 2 veces con PBS durante 10 minutos cada uno.
- Se transfieren las gónadas a un portaobjetos. Se aplica una gota de Vectashield. Se coloca encima un cubreobjetos con un poco de masilla en cada esquina.
- Se analizan mediante microscopía confocal láser.

4.3. Preparación de soluciones y medios

Recuento de células fluorescentes

Las células que forman parte de los agregados celulares provienen de la disgregación de mesonefros de ratón. Hemos observado que estas células migran con mayor eficiencia al interior de la gónada de ratón que a la de topo. Debido a esto, hemos creído conveniente cuantificar los datos de migración en número de células migrantes en la gónada femenina respecto al número de estas células en la gónada masculina, tanto en ratón como en topo. Estos datos relativos de migración en la gónada XX con respecto a la gónada XY nos permite comparar los resultados obtenidos en topo respecto a los obtenidos en ratón.

4.2.7. Perfusión con tinta china

Para la observación del sistema vascular gonadal, se realizó una perfusión *in toto* de individuos pre y post-natales utilizando un medio de contraste y posteriormente sometiendo a las gónadas a clarificación. Para este fin, se preparó medio de contraste mediante la dilución de tinta china (Black Indian ink, Talens, Holland) al 50 % con PBS y posterior filtrado a través de un filtro de celulosa (Millipore, 0.45 μm pore size).

Se perfundieron embriones y fetos inyectando el medio de contraste en la vena vitelina extra-embionaria con un capilar de vidrio moldeado manualmente con calor (Brand, Wertheim), ajustado a un dispositivo de pipeteo bucal de acorde al protocolo descrito por (Haigh and Nagy, 2004). Especímenes post-natales se perfundieron post-mortem inyectando el medio de contraste en el en el ventrículo izquierdo, utilizando una aguja de inyección de vía 21 conectada a un tubo de silicona de 1 mm de diámetro interno, a su vez conectado a un reservorio que contenía la solución y que se encontraba a 70 cm por encima del animal. La aguja se introdujo en el ventrículo una vez que el tubo se encontrara lleno de la solución y bloqueado para evitar que entraran burbujas de aire dentro del sistema vascular. Tras esto, el tubo se desbloqueó y el ventrículo quedó sometido a la presión hidrotática de la solución. Después de introducirlo dentro de la vena cava una aguja conectada a un tubo de silicona para drenar la sangre/medio. El proceso de perfusión se mantuvo durante varios minutos hasta que el líquido drenado saliera completamente negro.

Tras la perfusión, los embriones y las gónadas diseccionadas de especímenes post-natales se deshidrataron en una serie de alcoholes creciente (30 %, 50 %, 70 %, 100 % y 100 %, 2 horas cada uno) y clarificados durante al menos 2 días en una mezcla 2:1 de bencilbenzoato y alcohol bencílico. Tras la clarificación, se realizó una disección de los fetos y embriones para aislar las gónadas. Las gónadas perfundidas se fotografiaron utilizando una cámara digital Olympus DP50 ensamblada a un estereomicroscopio Olympus SZX12.

4.3. Preparación de soluciones y medios

Paraformaldehído al 4 %

4. Material y Métodos

Para un volumen de 100 ml:

- Añadir 4 g de paraformaldehído a 80 ml de H₂O destilada.
- Calentar hasta 60 °C y añadir 1N NaOH y mezclar hasta una solubilización completa.
- Enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 10 ml de PBS 10×.
- Ajustar pH a 7.2-7.4.
- Ajustar volumen a 100 ml.
- Filtrar

10X PBS

Para un volumen de 1 l:

- Disolver los siguientes componentes en 800 ml de H₂O destilada:
- NaCl: 80 g
- KCl: 2 g
- Na₂HPO₄: 14.4 g
- KH₂PO₄: 2.4 g
- Ajustar pH a 7.4.
- Añadir H₂O hasta 1 l y autoclavar.

Hemalumbre de Harris

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

Eosina

4.3. Preparación de soluciones y medios

- Disolver 4.5 g de eosina en 450 ml de H₂O.
- Agregar 4 gotas de ácido acético glacial y agitar.
- Filtrar y almacenar en botella de vidrio ámbar.

Karnowsky

Para un volumen total de 5 ml:

- Añadir los siguientes componentes a un tubo de 10 ml:
 - Paraformaldehído al 4 %: 1.25 ml
 - Cacodilato sódico 0.4M pH=7.3-7.4: 1.25 ml
 - Glutaraldehído 25 %: 0.5 ml
 - Carbonato cálcico 0.25 %: 1 ml
 - H₂O destilada: 1 ml
- Mezclar mediante agitación.

20× DAB

Para un volumen total de 10 ml:

- Añadir 0,1 g de DAB (3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride) en 10 ml de H₂O destilada.
- Añadir 3 gotas de HCl 10 N. La solución se vuelve marrón.
- Agitar durante 10 minutos hasta que se disuelva completamente.
- Alicuotar y almacenar a -20 °C.

Tampón carbonato 0.1M

Para un volumen total de 500 ml:

- Pesar los siguientes componentes y añadirlos a 450 ml de H₂O destilada:
 - Na₂CO₃: 5.30 g
 - NaHCO₃: 4.24 g
- Ajustar a pH=9.4 y enrasar hasta 500 ml.

Solución sustrato de la peroxidasa

Para un volumen total de 25 ml:

4. Material y Métodos

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

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

Tampón de extracción

Esta solución se compone de :

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

Solución de proteinasa K

- Disolver 100 mg de proteinasa K liofilizada en 10 ml de H₂O ultrapura estéril.
- Alicuotar y guardar a -20 °C.

Tampón de lisis

la solución se compone de:

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

Solución de RNAsa libre de DNAsa

- Preparar una solución compuesta de:
 - Tris-ClH 10 mM pH=7.5
 - NaCl 15 mM
- Disolver RNAsa A a una concentración de 10 mg/ml en la solución anterior.
inactivar las DNAsas.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Alicuotar y guardar a -20 °C.

4.3. Preparación de soluciones y medios

Medio mínimo M9

Para 500 ml de medio:

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

Medio LB

Para 1 l de medio:

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

4. Material y Métodos

Medio LB sólido

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

50X Reactivo de Denhardt

Para 100 ml:

- Añadir los siguientes componentes:
 - Ficoll: 1 g
 - Polyvinylpyrrolidona: 1 g
 - BSA: 1 g
- Filtrar y almacenar a -20 °C.

20×SSC

Para 100 ml:

- Añadir los siguientes componentes a 80 ml de H₂O DEPC:
 - Cloruro sódico: 17.53 g
 - Citrato sódico: 8.82 g
- Ajustar pH a 7.0 con HCl.
- Ajustar volumen a 100 ml.
- Autoclavar y guardar a temperatura ambiente.

Buffer de hibridación

Para preparar un volumen de 100 ml:

- Añadir los siguientes componentes:
 - 1M Tris pH=7.5: 1 ml

4.3. Preparación de soluciones y medios

- 5M NaCl: 12 ml
- 0.5M EDTA pH8: 200 μ l
- 20% SDS: 1.25 ml
- Dextran sulphate: 10 g
- Yeast tRNA (50 mg/ml): 400 μ l
- 50 \times Reactivo Denhardt: 2 ml
- Formamida: 50 ml

- Ajustar volumen hasta 100 ml con H₂O DEPC y almacenar a -20 °C.

5X MAB pH7.5

Para preparar 500 ml:

- Añadir los siguientes componentes:
 - Ácido maléico: 29 g
 - Cloruro sódico: 20.5 g
- Ajustar pH a 7.5 con 10 n NaOH.
- Ajustar volumen a 500 ml con H₂O DEPC.

1 \times MABT pH7.5

Para preparar 500 ml:

- Añadir los siguientes componentes:
 - 5 \times MAB: 100 ml
 - Tween 20: 5 ml
- Ajustar volumen con H₂O DEPC.

Solución de bloqueo

Para 10 ml, añadir los siguientes componentes:

- 1 \times MABT: 5 ml
- Heat inactivated sheep serum (inactivar suero de oveja incubándolo durante 30 minutos a 56 °C): 5 ml

4. Material y Métodos

5M Cloruro sódico

Para preparar 250 ml:

- Disolver 73.125 g en H₂O DEPC y ajustar volumen a 250 ml.
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

1M Tris-HCl pH=7.5

Para preparar 200 ml:

- Pesar 24.228 g de Tris base y disolverlos en 180 ml de H₂O DEPC.
- Ajustar al pH deseado con HCl. Puesto que la adición de HCl genera calor, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y volver a ajustar el pH (en las soluciones de Tris, el pH se afecta por la temperatura de la misma).
- Añadir H₂O DEPC hasta un volumen de 200 ml.

2M Tris-HCl pH=9.5

Para preparar 200 ml:

- Pesar 48.456 g de Tris base y disolverlos en 180 ml de H₂O DEPC.
- Ajustar al pH deseado con HCl. Puesto que la adición de HCl genera calor, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y volver a ajustar el pH (en las soluciones de Tris, el pH se afecta por la temperatura de la misma).
- Añadir H₂O DEPC hasta un volumen de 200 ml.

0.5M EDTA pH=8.0

Para un volumen de 100 ml:

- Añadir 18.612 g de EDTA (sal disódica) a 80 ml de H₂O DEPC .
- Ajustar pH a 8.0 con 10 n NaOH
- Ajustar volumen a 100 ml.
- Autoclavar y almacenar a temperatura ambiente.

1 M Cloruro de magnesio

Disolver 50.82 g de cloruro de magnesio en 220 ml de H₂O y ajustar volumen.

4.3. Preparación de soluciones y medios

NTMT pH=9.5

Para preparar 1 l:

- Añadir los siguientes componentes:
 - 5 M NaCl: 20 ml
 - 2 M Tris-HCl pH=9.5: 50 ml
 - 1 M MgCl₂: 50 ml
- Ajustar pH a 9.5.
- Añadir 2 ml de Tween 20 (50 %).
- Ajustar volumen a 1 000 ml.

4. Material y Métodos

5. Resultados

Contenidos

5.1. Genes implicados en el desarrollo de la gónada indiferenciada	114
5.1.1. <i>WT1</i>	114
5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular . . .	118
5.2.1. <i>SOX9</i>	118
5.2.2. <i>FGF9</i>	121
5.2.3. <i>SF1</i>	124
5.2.4. <i>DHH</i>	126
5.2.5. <i>PTCH1</i>	133
5.2.6. <i>PTGDS</i>	137
5.2.7. <i>AR</i>	142
5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico	146
5.3.1. <i>FOXL2</i>	146
5.3.2. <i>RSPO1</i> , <i>WNT4</i> y <i>FST</i>	159
5.3.3. Genes de referencia RT-Q-PCR: <i>18S</i> , <i>GAPDH</i> , <i>GPI</i>	171
5.4. Caracterización de las células de Leydig en <i>Talpa occidentalis</i>	174
5.5. Diferenciación de células mioides peritubulares .	175
5.5.1. Expresión de DES	175
5.5.2. Expresión de α -SMA	181
5.6. Desarrollo vascular en la gónada	185
5.6.1. Descripción morfológica	185
5.6.2. Expresión de α -SMA	186
5.6.3. Expresión de CAV1	190
5.6.4. Visualización <i>whole-mount</i> de la gónada	196
5.7. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano	200

5.1. Genes implicados en el desarrollo de la gónada indiferenciada

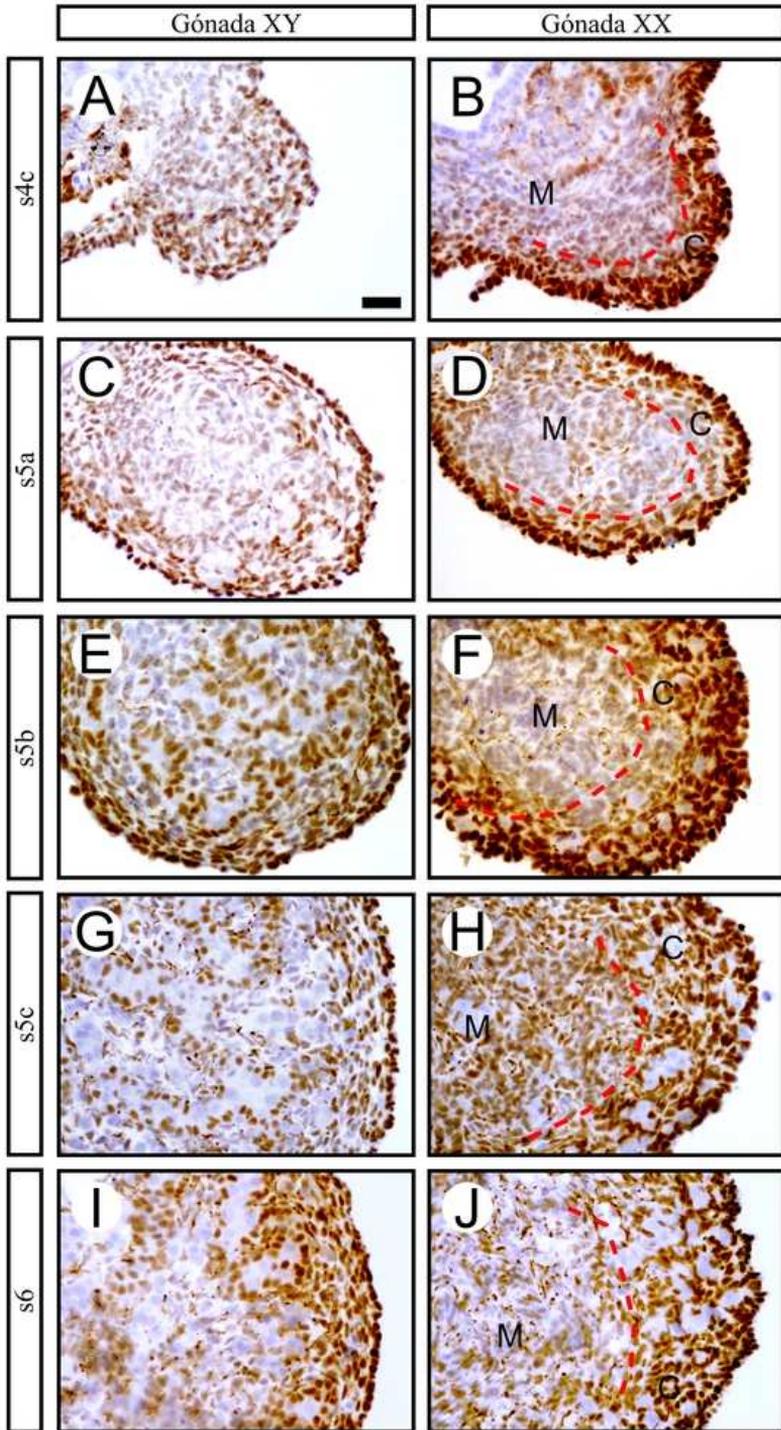
5.1.1. *WT1*

La proteína WT1 muestra una expresión nuclear en todos los estadios estudiados. En la gónada XY la expresión se comienza a detectar en el primordio gonadal, siendo ésta más fuerte en el epitelio celómico (Figura 5.1 A, C). En estadios posteriores se comienza a observar como la expresión se restringe claramente a las células de Sertoli en el interior de los cordones y a las que forman parte del epitelio celómico (Figura 5.1 E, G, I; Figura 5.2 A, D, G; Figura 5.3 A, D, G)

En la gónada femenina, la expresión comienza también en s4c, detectándose una mayor expresión en las células que forman parte del epitelio celómico, aunque las del interior de la gónada presentan expresión. La expresión persiste hasta el estadio 5c donde, además de observarse una intensa tinción en el epitelio celómico, prácticamente la totalidad de las células dentro de la gónada, excepto las células germinales, están expresando WT1 (Figura 5.1 B, D, F, H). En el estadio 6, las células somáticas del córtex del ovoteste muestran una intensa expresión de WT1, mientras que las células germinales aparecen negativas. En la porción medular se distinguen muchas células positivas y otras negativas (Figura 5.1 J). Esto continúa en los estadios siguientes (Figura 5.2 B, C, E, F)), hasta llegar a s9 en el cual, la expresión de WT1 en la región medular se restringe a las células que forman las esférulas, sin llegarse a detectar expresión en células intersticiales (Figura 5.2 H, I). A partir de este momento, el patrón de expresión de WT1 continúa invariable en la gónada femenina (Figura 5.3 B, C, E, F, H, I)

Figura 5.1: Detección de WT1 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis*, correspondientes a los estadios s4c (A, B), s5a (C, D), s5b (E, F), s5c (G, H) y s6 (I, J), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY de los estadios s4c y s5a se detecta la proteína en la mayoría de las células somáticas de la gónada (A, C). En s5b, s5c y s6 se observa expresión en el epitelio celómico y en las células somáticas que forman parte de los cordones (E, G, I). En la gónada XX se observa una expresión muy intensa en células somáticas del córtex (B, D, F, H, J). La mayoría de las células somáticas de la médula muestran una expresión más débil. Las células germinales aparecen negativas. Las líneas discontinuas rojas marcan el límite entre el córtex y la médula. La barra de escala representa 20 μm . (M) Médula; (C) Córtex

5.1. Genes implicados en el desarrollo de la gónada indiferenciada



5. Resultados

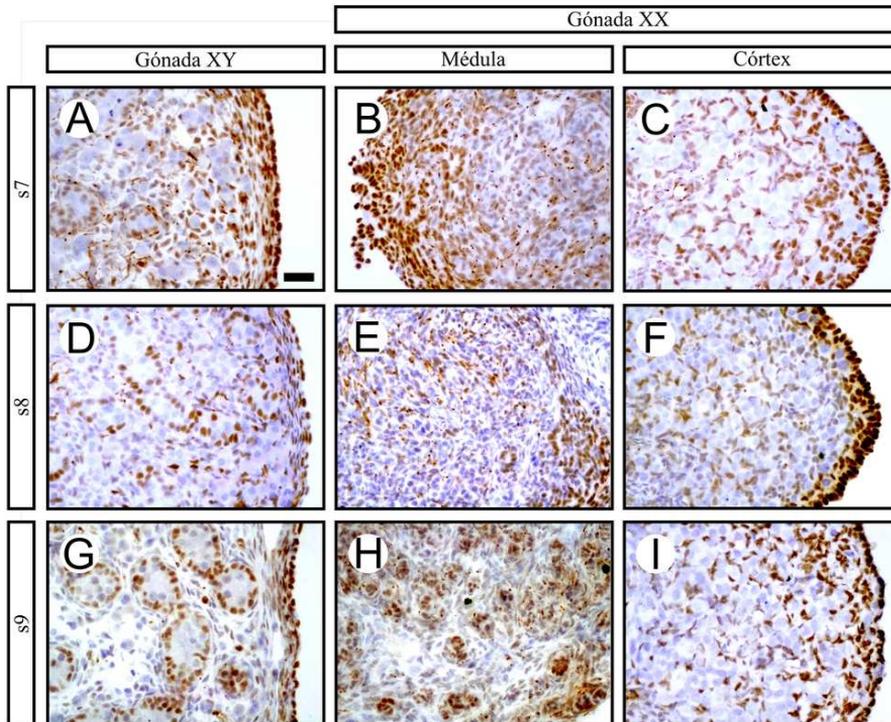


Figura 5.2: Detección de WT1 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*, correspondientes a los estadios s7 (A, B, C), s8 (D, E, F) y s9 (G, H, I) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se detecta la proteína en el epitelio celómico y en las células de Sertoli, que forman parte de los cordones (A, D, G). En la gónada XX se observa una disminución en el número de células WT1 positivas en la región medular de s8 (E) con respecto a s7 (B). En s9, las únicas células positivas son las que forman las esférulas (H). En la corteza, en los estadios estudiados, todas las células somáticas son positivas, mostrando una mayor intensidad las que pertenecen al epitelio celómico (C, F, I). La barra de escala representa 20 μm .

5.1. Genes implicados en el desarrollo de la gónada indiferenciada

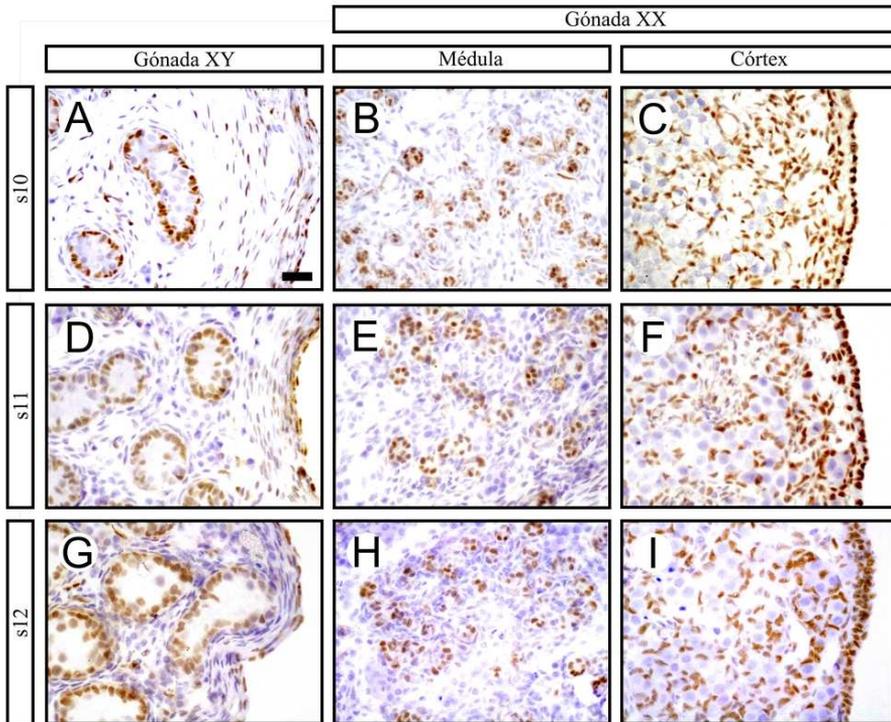


Figura 5.3: Detección de WT1 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis*, correspondientes a los estadios s10 (A, B, C), s11 (D, E, F) y s12 (G, H, I) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se detecta la proteína en el epitelio celómico y en las células de Sertoli, que forman parte de los cordones (A, D, G). En la gónada XX se observa que las células positivas son las que forman parte de las esférulas (B, E, H). En la corteza, en los estadios estudiados, todas las células somáticas son positivas, mostrando una mayor intensidad las que pertenecen al epitelio celómico (C, F, I). La barra de escala representa 20 μm .

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

5.2.1. *SOX9*

Los datos de RT-Q-PCR del gen *SOX9* muestran que no se detecta expresión de este gen en ninguno de los estadios estudiados en las hembras. En machos, se observan niveles significativamente superiores de transcritos con respecto a la hembra en todos los estadios estudiados ($5,851 \cdot 10^{-5} < p < 0,001964$), que van aumentando progresivamente hasta alcanzar niveles máximos en s12 (Figura 5.4). Para cuantificar los niveles de transcrito, se amplificó y secuenció un fragmento de 287 pb del gen *SOX9* de *Talpa occidentalis* (Figura 5.5).

Los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica muestran que *SOX9* se expresa en la gónada XY en células de Sertoli (Figura 5.6 A), mientras que en la gónada XX no se detecta la proteína ni en la región medular ni en la cortical (Figura 5.6 B,C).

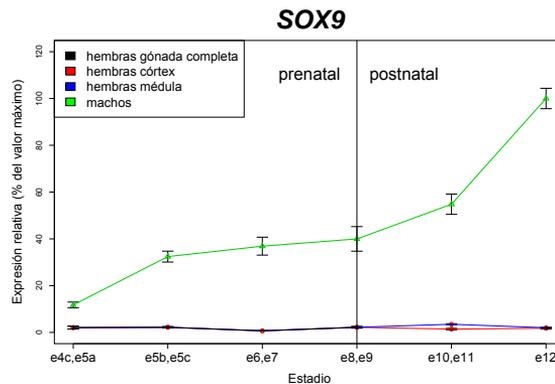


Figura 5.4: Estudio del patrón de expresión cuantitativo mediante RT-Q-PCR de *SOX9* en gónadas pre- y post-natales de *Talpa occidentalis*. En la gónada femenina, los niveles son muy bajos en todos los estadios estudiados, mientras que en la gónada XY, estos son siempre más elevados que en la XX, aumentando progresivamente en estadios sucesivos, alcanzando su máximo en el estadio s12.

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

T. occidentalis	AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACC	35
H. sapiens	AGGAGAAGGGCCTGTCCGGCGCCCCAGCCCCACC	35
M. musculus	AGGAGAAGGGCCTGTcGGCGCCCCAGCCCCACC	35
consensus	*****	
T. occidentalis	ATGTCCGAGGACTCGGCcGGCTCGCCCTGCCCGTC	70
H. sapiens	ATGTCCGAGGACTCcGCgGGCTCGCCCTGCCCGTC	70
M. musculus	ATGTcgGAGGACTCGGCtGGtTCGCCCTgtCCcTC	70
consensus	*****	
T. occidentalis	GGGCTCCGGCTCcGACACCGAGAACACGCGGCCCC	105
H. sapiens	GGGCTCCGGCTCGGACACCGAGAACACGCGGCCCC	105
M. musculus	GGGCTCCGGCTCGGACACgGAGAACACcCGGCCCC	105
consensus	*****	
T. occidentalis	AGGAGAACACCTTCCCCAAGGGCGAGCCGGAcCTG	140
H. sapiens	AGGAGAACACgTTCCCCAAGGGCGAGCCcGATCTG	140
M. musculus	AGGAGAACACCTTCCCCAAGGGCGAGCCGATCTG	140
consensus	*****	
T. occidentalis	AAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCCGTGTG	175
H. sapiens	AAGAAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTCCCCGTGTG	175
M. musculus	AAGAgGGAGAGCGAGGAaGAtAAGTTCCCCGTGTG	175
consensus	*****	
T. occidentalis	CATCCGCGAGGCGGTCAGCCAGGTGCTCAAGGGCT	210
H. sapiens	CATCCGCGAGGCGGTCAGCCAGGTGCTCAaaGGCT	210
M. musculus	CATCCGCGAGGCGGTCAGCCAGGTGCTgAAGGGCT	210
consensus	*****	
T. occidentalis	ACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGCGCGTC	245
H. sapiens	ACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCGGTGCGCGTC	245
M. musculus	ACGACTGGACGCTGGTGCCCATGCCcGTGCGCGTC	245
consensus	*****	

Figura 5.5: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *SOX9* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 98% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 94% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

5. Resultados

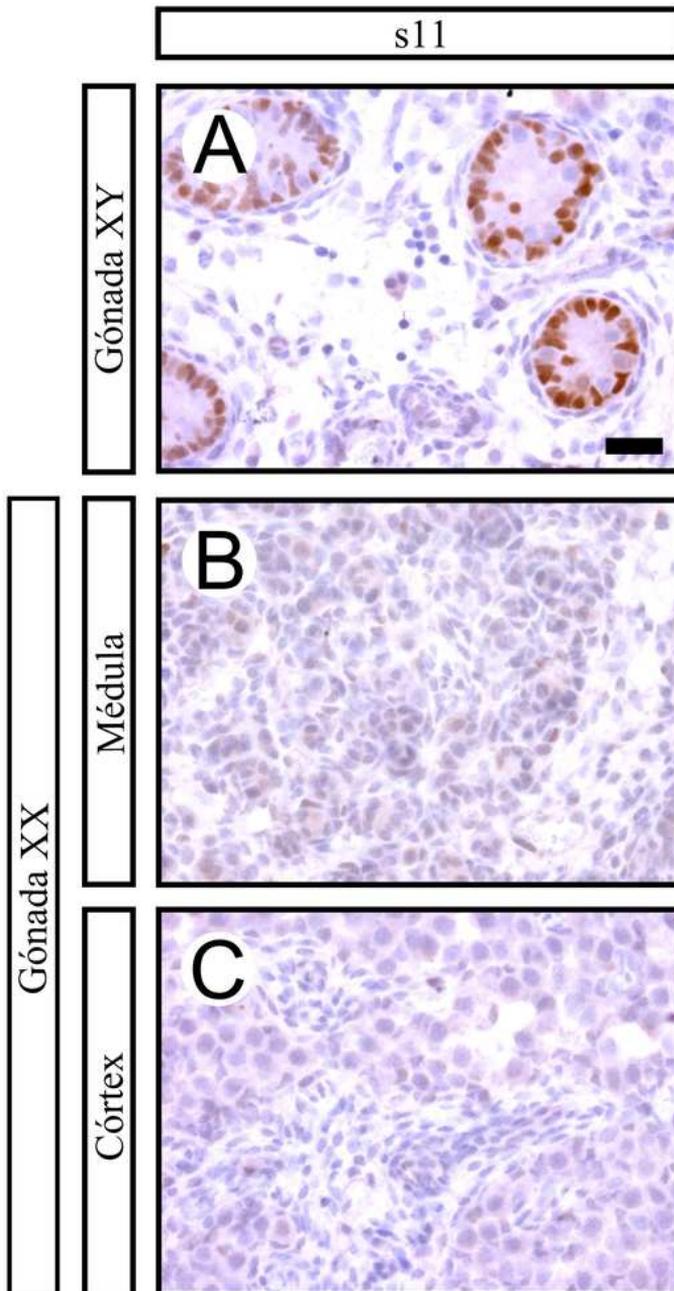


Figura 5.6: Detección de SOX9 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas del estadio s11 de *Talpa occidentalis*, utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se detecta la proteína en el núcleo de células de Sertoli (A). En la gónada XX no se observa expresión ni en la región medular ni en la cortical (B, C). La barra de escala representa 20 μm .

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

5.2.2. *FGF9*

Los datos de RT-Q-PCR para *FGF9* muestran que en estadios tempranos (s4c y 5a), los niveles en machos son más altos que los observados en hembras (p=0.005), aunque estos niveles sufren un brusco descenso en s5c, decreciendo de forma paulatina hasta hacerse muy bajos en estadios postnatales. Sin embargo, en la hembra los valores oscilan dentro de un rango de expresión medio durante todo el desarrollo prenatal y aparece una clara divergencia en estadios postnatales, manteniéndose niveles relativamente altos en el córtex, comparados con los registrados en la gónada XY (p=0.018) y en la región medular (p=0.039) (Figura 5.7). Para realizar el estudio de cuantificación, se amplificó y secuenció un fragmento de 225 pb a partir de un fragmento de mayor tamaño (Figura 5.8).

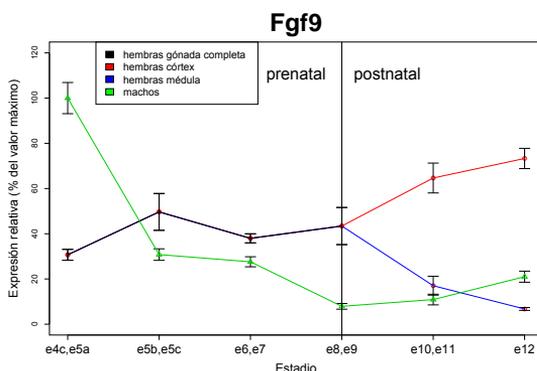


Figura 5.7: Estudio del patrón de expresión cuantitativo mediante RT-Q-PCR de *FGF9* en gónadas pre- y post-natales de *Talpa occidentalis*. En los estadios s4-s5a se observa que los niveles son más altos en machos que en hembras. En estadios posteriores, estos niveles decrecen en la gónada XY, mientras que en la XX, se mantienen constantes. Tras el nacimiento, la expresión en el córtex aumenta significativamente en comparación con la observada en médula.

T. occidentalis	GTTGGGAACTATTTTCGGTGTGCAGGATGCGGTACC	35
H. sapiens	GTTGGGAACTATTTTCGGTGTGCAGGATGCGGTACC	35
M. musculus	GTTGGGAgCTATTTTCGGTGTGCAGGAcGCGGTACC	35
consensus	*****	

T. occidentalis	aTTTGGGAAATGTGCCGGTGTGCGCGGTGGACAGCC	70
H. sapiens	GTTTGGGAAATGTGCCcGTGTTGCCGGTGGACAGCC	70
M. musculus	GTTcGGGAAcGTaCCGGTGTGCGCGGTGGACAGtC	70
consensus	*****	

5. Resultados

T. occidentalis	CGGTTTTGTTAAGTGACCACCTGGGTcAGTCCGAA	105
H. sapiens	CGGTTTTGTTAAGTGACCACCTGGGTcAGTCCGAA	105
M. musculus	CGGTgTTGcTAAGTGACCACCTGGGTcAGTCCGAA	105
consensus	*****	
T. occidentalis	GCAGGGGGcCTtCCCAGGGGACCCGCAGTCACGGA	140
H. sapiens	GCAGGGGGGCTcCCCAGGGGACCCGCAGTCACGGA	140
M. musculus	GCAGGGGGGCTgCCCcGGGGACCCGCAGTCACGGA	140
consensus	*****	
T. occidentalis	CTTGGATCATTAAAGGGGATTCTCAGGCGGAGaC	175
H. sapiens	CTTGGATCATTAAAGGGGATTCTCAGGCGGAGC	175
M. musculus	CTTGGATCATTAAAGGGGATTCTCAGGCGGAGGC	175
consensus	*****	
T. occidentalis	AGCTATACTGCAGGACTGGATTTCACTTAGAAATC	210
H. sapiens	AGCTATACTGCAGGACTGGATTTCACTTAGAAATC	210
M. musculus	AGCTgTACTGCAGGACTGGATTTcAtTTAGAgATC	210
consensus	*****	
T. occidentalis	TTCCCCAATGGTACTATCCAGGGAACCAGGAAAGA	245
H. sapiens	TTCCCCAATGGTACTATCCAGGGAACCAGGAAAGA	245
M. musculus	TTCCCCAAcGGTACTATCCAGGGAACCAGGAAAGA	245
consensus	*****	
T. occidentalis	CCACAGCaGATTTGGCATTcCGGAATTTATCAGTA	280
H. sapiens	CCACAGCCGATTTGGCATTCTGGAATTTATCAGTA	280
M. musculus	CCACAGCCGcTTcGGCATTCTGGAATTTATCAGTA	280
consensus	*****	
T. occidentalis	TAGCAGTGGGCCTGGTCAGCATTcGAGGCGTGGAC	315
H. sapiens	TAGCAGTGGGCCTGGTCAGCATTcGAGGCGTGGAC	315
M. musculus	TAGCAGTGGGCCTGGTCAGCATTcGAGGtGTGGAC	315
consensus	*****	
T. occidentalis	AGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAAGGGGGA	350
H. sapiens	AGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAAGGGGGA	350
M. musculus	AGTGGACTCTACCTCGGcATGAAcGAGAAGGGGGA	350
consensus	*****	
T. occidentalis	GCTGTATGGATCAGAAAACTAACCCAAAGAGTGTG	385
H. sapiens	GCTGTATGGATCAGAAAACTAACCCAAAGAGTGTG	385
M. musculus	GCTGTATGGATCAGAAAACTAACCaCAgGAaTGTG	385
consensus	*****	

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

T. occidentalis	TATTCAGAGAACAGTTTGAAGAAAACCTGGTATAAT	420
H. sapiens	TATTCAGAGAACAGTTcGAAGAAAACCTGGTATAAT	420
M. musculus	TgTTCAGAGAACAGTTTGAAGAgAACTGGTAcAAc	420
consensus		
T. occidentalis	ACCTACTCATCCAAtCTATAcAAACACGTGGACAC	455
H. sapiens	ACgTACTCATCaAACCTATATAAgCACGTGGACAC	455
M. musculus	ACCTACTCtTCCAACCTcTATAACAAtGTGGACAC	455
consensus		
T. occidentalis	TGGAAGGCGATACTATGTaGCcTTAAATAAAGACG	490
H. sapiens	TGGAAGGCGATACTATGTTGCATTAAATAAAGAtG	490
M. musculus	cGGAAGGaGATACTATGTTGCATTAAATAAgGACG	490
consensus		
T. occidentalis	GGACCCCAAGAGAAGGaACgAGGACTAAACGGCAC	525
H. sapiens	GGACCCcgAGAGAAGGGACtAGGACTAAACGGCAC	525
M. musculus	GGACtCCAAGAGAAGGGACcAGGACTAAACGGCAC	525
consensus		
T. occidentalis	CAGAAATTCACACATTT	542
H. sapiens	CAGAAATTCACACATTT	542
M. musculus	CAGAAATTtACACATTT	542
consensus		

Figura 5.8: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *FGF9* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 97% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 92% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde. Los bloques azules se corresponden con el fragmento utilizado para RT-Q-PCR.

5. Resultados

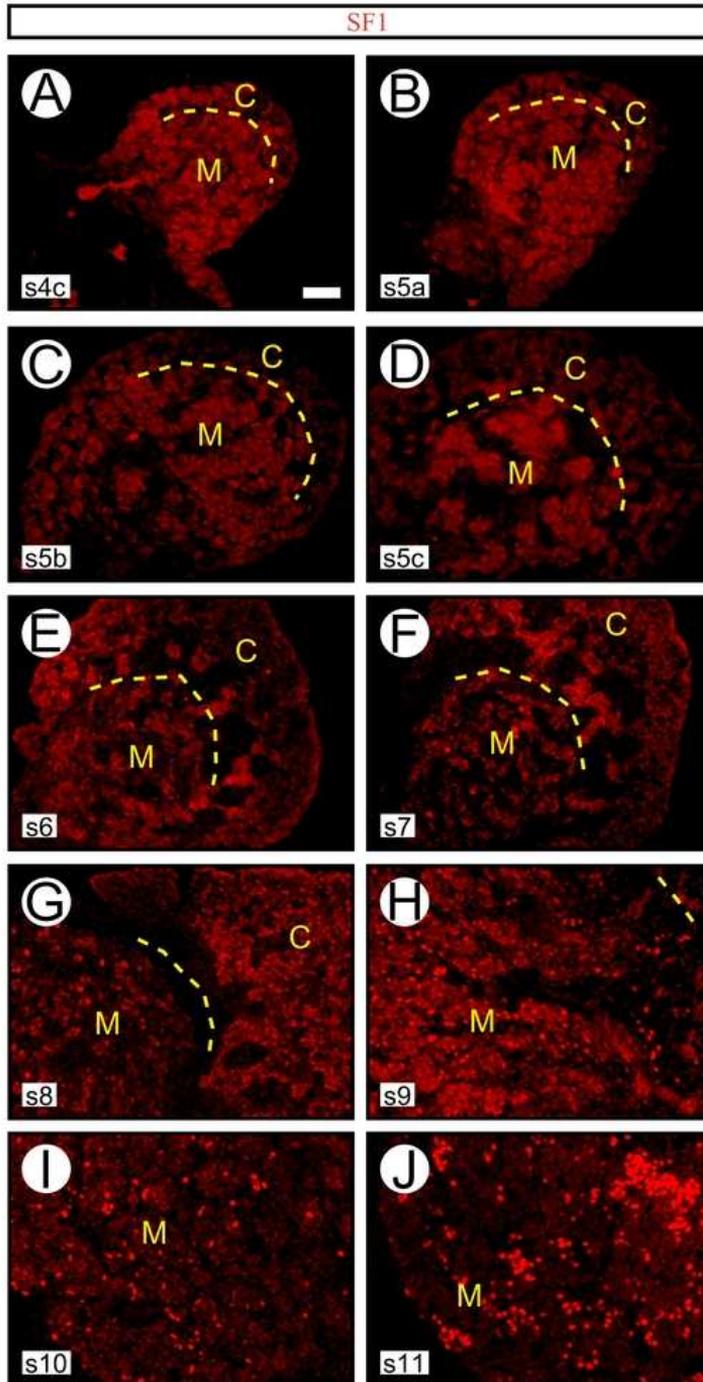
5.2.3. *SF1*

En la gónada XX de *Talpa occidentalis*, la detección de la proteína SF1 mediante inmunofluorescencia muestra que, en el primordio gonadal (s4c), hay expresión en las células de la médula y de la corteza (Figura 5.9 A). A partir del estadio s5a, ésta expresión comienza a decrecer progresivamente pero sin llegar a desaparecer, observándose en el interior de los cordones corticales (Figura 5.9 B-G). Alrededor del nacimiento (s9), la expresión desaparece en la región cortical (Figura 5.9 H).

En la porción medular se observa expresión en estadios tempranos (Figura 5.9 A, B), en las células del interior de los cordones en s5b y se mantiene alta en sucesivos estadios (Figura 5.9 C-G). Cuando se produce la diferenciación de células de Leydig (s9-10), la expresión disminuye en el interior de los cordones y aumenta en células intersticiales (Figura 5.9 H-J).

Figura 5.9: Detección de SF1 mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XX embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s4c (A), s5a (B), s5b (C), s5c (D), s6 (E), s7 (F), s8 (G), s9 (H), s10 (I) y s11 (J), utilizando un anticuerpo secundario marcado con Cy3 (rojo). La proteína SF1 se detecta prácticamente en todas las células de la gónada en s4c (A). En e5a (B) las células corticales aparecen menos inmunorreactivas que las medulares y esta diferencia de expresión se incrementa en estadios sucesivos, manteniéndose hasta el nacimiento (C-G), siendo las células de los cordones medulares las que lo expresan con mayor intensidad. A partir de s9, en las células de los cordones medulares se observa una disminución en la intensidad de expresión, mientras que las células intersticiales medulares comienzan a mostrar una fuerte señal positiva formando agrupaciones en el estadio 11 (H-J). En el córtex, se observa expresión en los cordones corticales profundos desde s6 hasta s8 (E-G). Pero a partir de s9 la expresión desaparece en la región cortical (H-J). Las líneas discontinuas amarillas delimitan la región cortical de la gónada femenina. La barra de escala representa 20 μm en A-D y 40 μm en E-J. (M) Médula; (C) Córtex.

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular



5. Resultados

5.2.4. *DHH*

Ninguno de los anticuerpos comerciales existentes para *DHH* mostró inmunoreactividad contra la proteína de *Talpa occidentalis*. Para llevar a cabo el estudio del perfil de expresión, se amplificó y secuenció un fragmento de 118 pb del gen, con el fin de obtener una ribosonda marcada con digoxigenina (Figura 5.10). Hibridaciones *in situ* realizadas con esta sonda mostraron los transcritos de *DHH* se comienzan a detectar a partir del estadio 5b en el interior de los cordones en la gónada masculina (Figura 5.11 E, G, I). En estadios previos no se aprecia señal (Figura 5.11 A, C)). Este patrón de expresión continúa invariable en estadios posteriores (Figura 5.12 A, C, E, G, I).

En la gónada femenina, no se detecta presencia del mRNA de *DHH* en ninguno de los estadios estudiados (Figura 5.11 B, D, F, H, J; Figura 5.12 B, D, F, H, J).

T. occidentalis	GAGTCCCGaAACCACGTCCACGTGTCGGTCAAAGC	35
H. sapiens	GAGTCCCGCAACCACGTCCACGTGTCGGTCAAAGC	35
M. musculus	GAGTCCCGCAACCACaTCCACGTaTCGGTCAAAGC	35
consensus	*****	
T. occidentalis	cGATAAActcCTGGCGGTCaGGGCCGGCGGCTgtT	70
H. sapiens	TGATAAActCACTGGCGGTCCGGGcgGGCGGCTGCT	70
M. musculus	TGATAAActCACTGGCGGTCCGaGCCGgaGGCTGCT	70
consensus	*****	
T. occidentalis	TTCCGGGgAAcGCCACGGTGCGCCTGaaGAGCGGC	105
H. sapiens	TTCCGGGAAATGCaActGTGCGCCTgtGGAGCGGC	105
M. musculus	TTCCGGGAAATGCCACGGTGCGctTGcGGAGCGGC	105
consensus	*****	
T. occidentalis	GAGCGGAAGGGGCTGCGGAgCTGCACCGCGgGA	140
H. sapiens	GAGCGGAAaGGGCTGCGGAACTGCACCGCGgaGA	140
M. musculus	GAaCGGAAGGGGCTGaGGGAActaCAtCGtGGtGA	140
consensus	*****	
T. occidentalis	CTGGGTgCTGGCGGCaGAcGCGGCCGGCCGGGTGG	175
H. sapiens	CTGGGTttTGGCGGCcGATGCGtCaGGCCGGGTGG	175
M. musculus	CTGGGTaCTGGCcGctGATGCaGCGGCCGgaGTGG	175
consensus	*****	

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

T. occidentalis	TGCCACGCCGGTGCTGCTCTTCCTGGACCGGGAC	210
H. sapiens	TGCCACGCCGGTGCTGCTCTTCCTGGACCGGGAC	210
M. musculus	TaCCACGCCaGTGCTGCTCTTCCTGGACCGGGAt	210
consensus	*****	
T. occidentalis	CTGCAGCGCaGGCCTCcTTCGTGGCTGTGGAGAC	245
H. sapiens	tTGCAGCGCCGGGctTCaTTtGTGGCTGTGGAGAC	245
M. musculus	CTGCAGCGCCGcGCCTCgTTCGTGGCTGTGGAGAC	245
consensus	*****	
T. occidentalis	CGAGCGGCCcCCGCGAAgCTGTTGCTCACGCCCT	280
H. sapiens	CGAGtGGCTCCaCGAAACTGTTGCTCACGCCCT	280
M. musculus	CGAGCGGCCTCCGCGAAACTGTTGCTCACaCCCT	280
consensus	*****	
T. occidentalis	GGCACCTGGTGTTCGCaGCTCGgGGGCCGGCaCCC	315
H. sapiens	GGCACCTGGTGTttGCcGCTCGaGGGCCGGCGCC	315
M. musculus	GGCAtCTGGTGTTCGctGCTCGcGGGCCaGCGCct	315
consensus	*****	
T. occidentalis	GCGCCcGGCGACTTcGCcCCGGTGTTCGCGCGCCG	350
H. sapiens	GCGCCAGGCGACTTTGCACCGGTGTTTCGCGCGCCG	350
M. musculus	GctCCAGgtGACTTTGCACCGGTGTTTCGCGCGCCG	350
consensus	*****	
T. occidentalis	GCTgCGCGCTGGGGACTCcGTGCTGGCGCCgGGCG	385
H. sapiens	GCTACGCGCTGGGGACTCGGTGCTGGCGCCCGGCG	385
M. musculus	ctTACgtGCTGGcGACTCGGTGCTGGctCCCCGGC	385
consensus	*****	
T. occidentalis	GGGATGCGCTTCGGCCGGCGCGCGTGGCCCGaGTG	420
H. sapiens	GGGATGCGCTTCGGCCaGCGCGCGTGGCCCGtGTG	420
M. musculus	GGGAcGCGCTcCaGCCGGCGCGCGTaGCCCGcGTG	420
consensus	*****	
T. occidentalis	GCGCGGGAGGAAGCCGTGGGCGTGTTCGCGCCGCT	455
H. sapiens	GCGCGGGAGGAAGCCGTGGGCGTGTTCGCGCCGCT	455
M. musculus	GCGCGcGAGGAAGCCGTGGGCGTGTTCGCaCCGCT	455
consensus	*****	
T. occidentalis	CACaGctCACGGGACGCTGCTGGTCAACGACGTCC	490
H. sapiens	CACcGCGCACGGGACGCTGCTGGTgAACGAtGTCC	490
M. musculus	CACtGCGCACGGGACGCTGCTGGTCAACGACGTCC	490
consensus	*****	

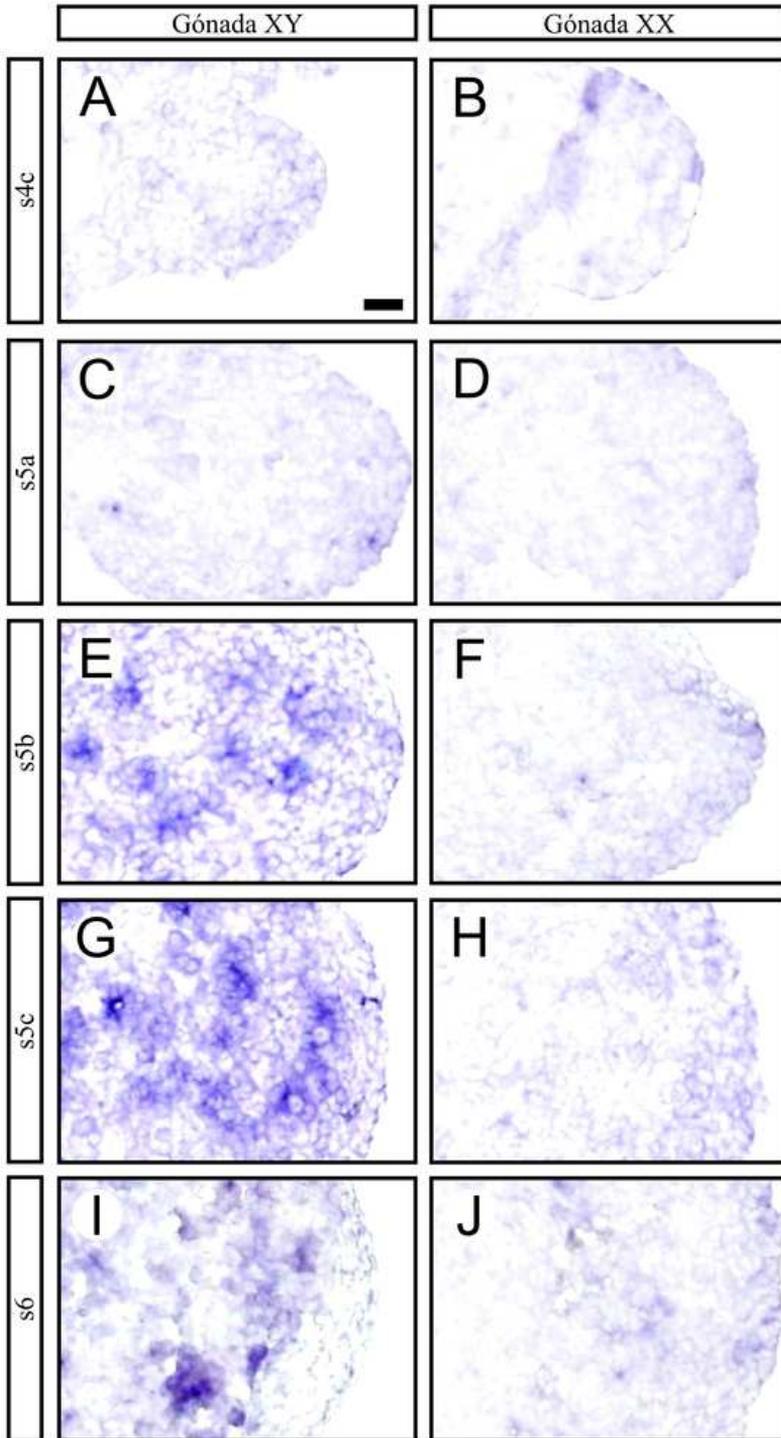
5. Resultados

T. occidentalis	TGGCCTCgTGCTACGCGGTctTGG	514
H. sapiens	TGGCCTCtTGCTACGCGGTTCTGG	514
M. musculus	TcGCCTCcTGCTACGCGGTTCTaG	514
consensus		

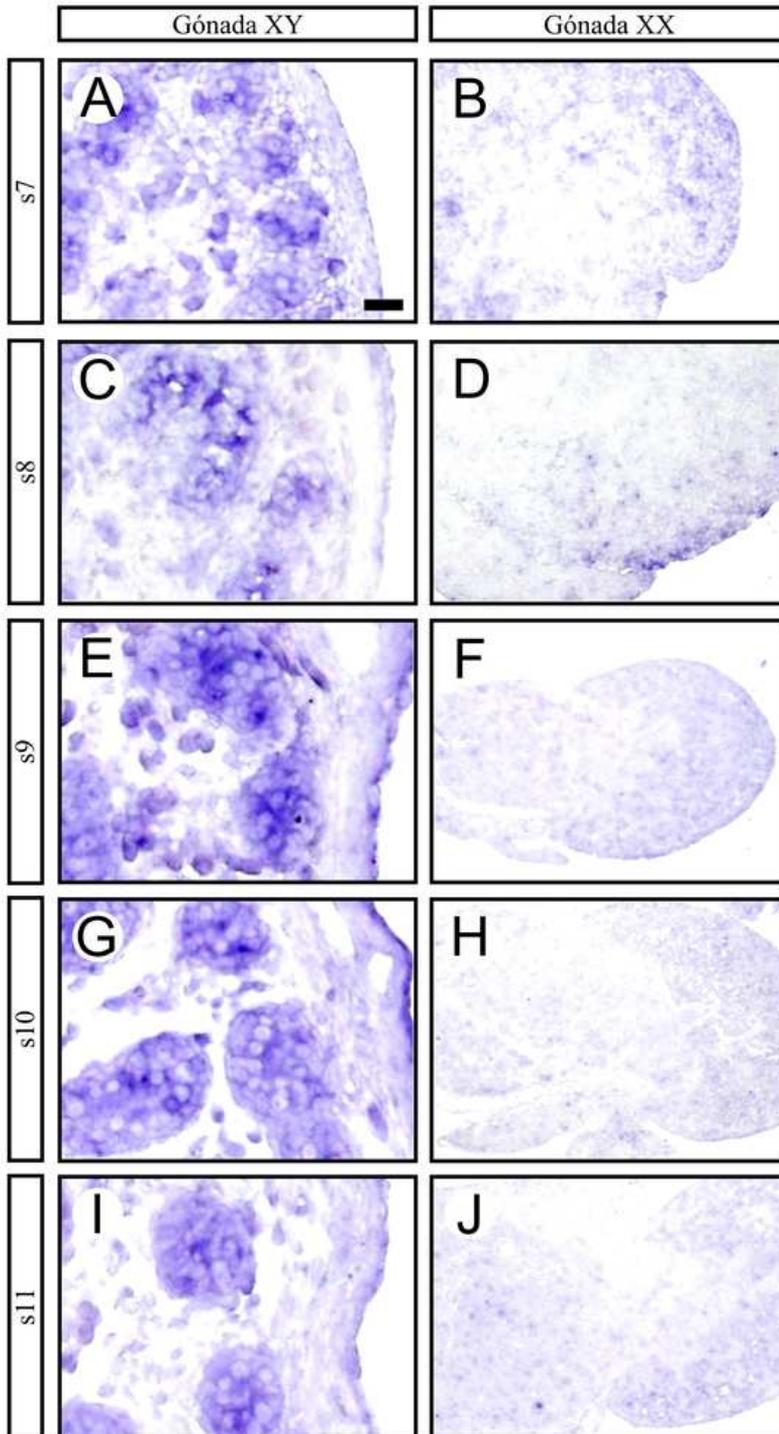
Figura 5.10: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *DHH* de *T. occidentalis* utilizado para hibridación *in situ*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 91% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 88% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

Figura 5.11: Detección de DHH mediante hibridación *in situ* en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s4c (A, B), s5a (C, D), s5b (E, F), s5c (G, H) y s6 (I, J), utilizando NBT/BCIP (morado). En la gónada XY no se detecta transcrito ni en el estadio s4c (A) ni en s5a (C). En s5b (E), s5c (G) y s6 (I) se observa expresión en el interior de los cordones testiculares. En la gónada XX no se detecta transcrito en ninguno de los estadios estudiados (B, D, F, H, J). La barra de escala representa 20 μm .

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular



5. Resultados



5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

T. occidentalis	ACCCCGACATAATCTTCAAGGATGAGGAaAACAGT	35
M. musculus	ACCCCGACATAATCTTCAAGGATGAGGAGAACAGc	35
H. sapiens	ACCCCGACATcATCTTCAAGGATGAGGAGAACAGT	35
consensus		
T. occidentalis	GGCGCAGAtCGCCTGATGACCGAGCGcTGCAAAGA	70
M. musculus	GGCGCAGACCGCCTGATGACaGAGCGTTGCAAAGA	70
H. sapiens	GGaGCcGACCGCCTGATGACCGAGCGTTGtAAgGA	70
consensus		
T. occidentalis	GCGGGTGAACGCgCTcGCCATCGCCGTGATGAACA	105
M. musculus	GCGGGTGAACGCTCTaGCCATCGCgGTGATGAACA	105
H. sapiens	GCGGGTGAACGCTtTgGCCATtGCCGTGATGAACA	105
consensus		
T. occidentalis	TGTGGCaCGGAGT	118
M. musculus	TGTGGCCCCGAGT	118
H. sapiens	TGTGGCCCCGAGT	118
consensus		

Figura 5.13: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *DHH* de *T. occidentalis* utilizado para RT-Q-PCR, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 89% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 93% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

Figura 5.12: Detección de DHH mediante hibridación in situ en secciones transversales de gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s7 (A, B), s8(C, D), s9 (E, F), s10 (G, H) y s11 (I, J), utilizando NBT/BCIP (morado). En la gónada XY se observa expresión en el interior de los cordones testiculares en s7 (B), s8 (D), s9 (F), s10 (H) y s11 (J). En la gónada XX no se detecta transcrito en ninguno de los estadios estudiados (B, D, F, H, J). La barra de escala representa 20 μ m.

5. Resultados

Para realizar el estudio de expresión mediante RT-Q-PCR se amplificó y secuenció otro fragmento del gen (Figura 5.13). Estos datos muestran que a partir del estadio s5b, los niveles de transcritos aumentan en la gónada masculina, presentando fluctuaciones a lo largo del patrón espaciotemporal, pero manteniéndose mucho más elevados que en la gónada femenina ($1,363 \cdot 10^{-5} < p < 0,007915$) (Figura 5.14).

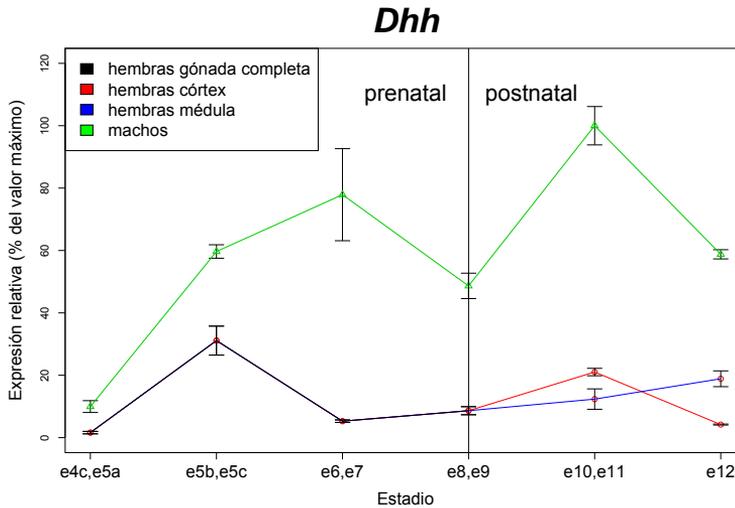


Figura 5.14: Estudio del patrón de expresión cuantitativo mediante RT-Q-PCR de DHH en gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. En los estadios s4-s5a se observa que los niveles son similares en macho y hembras. Pero a partir de s5b-s5c, los niveles aumentan significativamente en el macho y se mantienen mucho más elevados que los observados en hembras durante todo el desarrollo gonadal.

5.2.5. *PTCH1*

Se amplificó y secuenció un fragmento del gen *PTCH1* de *Talpa occidentalis*, a partir del cual se elaboraron cebadores para amplificación mediante RT-Q-PCR (Figura 5.15). El estudio cuantitativo de los niveles de transcrito de *PTCH1* muestra que los niveles de los mismos en la gónada indiferenciada (s4c) y el estadio 5a de ambos sexos son similares, aunque a partir de s5b, estos aumentan en machos con respecto a la hembra ($p = 0.050$). Durante sucesivos estadios, estos niveles se mantienen constantes en machos, comenzando a decrecer a partir de s10. En la gónada femenina, los niveles decrecen comparados con los observados en la gónada indiferenciada, manteniéndose bajos durante todo el desarrollo. A partir de s12 se observa que aumenta la expresión en la región medular con respecto a la cortical ($p = 0.01618$) y a los observados en machos ($p = 0.01272$) (Figura 5.16).

T. occidentalis	CTGAAGTTGGTCATGGTTACATGGACCGGCCCTGC	35
H. sapiens	CTGA _g GTTGGTCATGGTTACATGGACCG _c CCCTGC	35
M. musculus	C _c GAAGTTGG _c CATGG _g TACATGGACCGGCC _t TGC	35
consensus		
T. occidentalis	CTCAATCC _t GC _t GATCC _c GATTGCCCG _{gt} C _t ACAGC	70
H. sapiens	CTCAATCC _g GCCGATCCAGAC _t TGCCCG _c GCCACAGC	70
M. musculus	CTCAA _c CC _a GCCGA _c CCAGATTGCCCG _t GCCACAGC	70
consensus		
T. occidentalis	CCCCAA _t AAAAAT _g CAACCAA _g CCTCTTGATATGG	105
H. sapiens	CCCCAACAAAAATTCAACCAAACCTCTTGATATGG	105
M. musculus	CCC _t AACAAAAATTCAACCAAACCTCTTGAT _g TGG	105
consensus		
T. occidentalis	CCCTTGTTTTGAATGGTGGATGTCATGG _a TTATCC	140
H. sapiens	CCCTTGTTTTGAATGGTGGATGTCATGG _c TTATCC	140
M. musculus	CCCTTGTTTTGAATGGTGGATGTCA _a GG _t TTATCC	140
consensus		
T. occidentalis	AGAAAGTATATGCACTGGCA _a GA _a GA _a TTGATTGT	175
H. sapiens	AGAAAGTATATGCACTGGCAGGAGGAGTTGATTGT	175
M. musculus	AG _g AAGTATATGCA _t TGGCAGGAGGAGTTGATTGT	175
consensus		

5. Resultados

T. occidentalis	GGGTGGCACAGTCAAGAACAGCACTGGgAAACTTG	210
H. sapiens	GGGTGGCACAGTCAAGAACAGCACTGGAAAACTcG	210
M. musculus	GGGTGGtACcGTCAAGAAAtgcCACTGGAAAACTTG	210
consensus	*****	
T. occidentalis	TCAGCGCCCATGCCtTGCAGACCATGTTtCAGTTA	245
H. sapiens	TCAGCGCCCATGCCCTGCAGACCATGTTCCAGTTA	245
M. musculus	TCAGCGcTCAcGCCCTGCAaACCATGTTCCAGTTA	245
consensus	*****	
T. occidentalis	ATGACaCCCAAGCAAATGTATGAACAAtTTCAAGGG	280
H. sapiens	ATGACTCCCAAGCAAATGTAcGAgCACTTCAAGGG	280
M. musculus	ATGACTCCCAAGCAAATGTATGAACACTTCAgGGG	280
consensus	*****	
T. occidentalis	aTAtGACTATGTCTCTCACATCAACTGGAATGAGG	315
H. sapiens	gTACGAgTATGTCTCaCACATCAACTGGAAcGAGG	315
M. musculus	cTACGACTATGTCTCTCACATCAACTGGAATGAaG	315
consensus	*****	
T. occidentalis	ACAAGGCAGCgGCCATCCTGGAaGcTGGCAGAGG	350
H. sapiens	ACAAaGCgGCaGCCATCCTGGAGGCCTGGCAGAGG	350
M. musculus	ACAgGGCAGCcGCCATCCTGGAGGCCTGGCAGAGG	350
consensus	*****	
T. occidentalis	ACATATGTGGAGGTGGTTCATCAAAGTGtGCCCA	385
H. sapiens	ACATATGTGGAGGTGGTTCATCAgAGTGTCGCaCA	385
M. musculus	ActTAcGTGGAGGTGGTTCATCAAAGTGTCGCCc	385
consensus	*****	
T. occidentalis	GAAtTCtACTCAgAAGGTGCTcTCCTTtACCACgA	420
H. sapiens	GAACTCCACTCAAAAGGTGCTTTCTTCCACCACCA	420
M. musculus	aAACTCCACTCAAAAGGTGCTTcCCTTCAcAACCA	420
consensus	*****	
T. occidentalis	CGACCCTGgACGACATCCTGAAgTCCTTCTCTGAT	455
H. sapiens	CGACCCTGgACGACATCCTGAAATCCTTCTCTGAc	455
M. musculus	CGACCCTGgACGACATCCTaAAAATCCTTCTCTGAT	455
consensus	*****	
T. occidentalis	GTCAGcGTCATtCGAGTGGCCAGCGGCTACCTACT	490
H. sapiens	GTCAGTGTcATCCGcGTGGCCAGCGGCTACTtTACT	490
M. musculus	GTCAGTGTcATCCGAGTGGCCAGCGGCTACCTACT	490
consensus	*****	

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

T. occidentalis	CATGCTTGCCTATGCCTGTTTAACCATGCTGCGCT	525
H. sapiens	CATGCTcGCCTATGCCTGTcTAACCATGCTGCGCT	525
M. musculus	gATGCTTGCCTATGCCTGTTTAACCATGCTGCGCT	525
consensus		
T. occidentalis	GGGACTGCTCCAAGTCCCAGGGTGCCGTGGGGCTG	560
H. sapiens	GGGACTGCTCCAAGTCCCAGGGTGCCGTGGGGCTG	560
M. musculus	GGGACTGCTCCAAGTCCCAGGGTGCCGTGGGGCTG	560
consensus		
T. occidentalis	GCTGGCGTCCTGTTGGTTGCACTGTCAGTGGCTG	594
H. sapiens	GCTGGCGTCCTGcTGGTTGCACTGTCAGTGGCTG	594
M. musculus	GCTGGCGTCCTGTTGGTTGcgCTGTCAGTGGCTG	594
consensus		

Figura 5.15: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *PTCH1* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 92% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 90% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde. Los bloques azules se corresponden con el fragmento utilizado para RT-Q-PCR.

5. Resultados

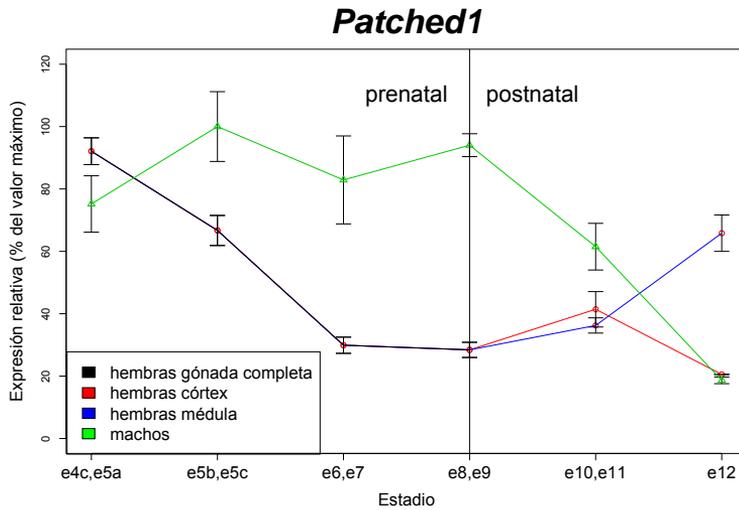


Figura 5.16: Estudio del patrón de expresión cuantitativo de PTCH1 en gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. En los estadios s4-s5a se observa que los niveles son similares en macho y hembras. Pero a partir de s5b-s5c, los niveles aumentan significativamente en el macho, en comparación con los observados en hembras. Después del nacimiento, los niveles comienzan a decrecer progresivamente en el macho hasta alcanzar niveles parecidos a los registrados en hembras en el estadio s12, en donde observa un aumento de expresión en la región medular de la gónada XX.

5.2.6. *PTGDS*

El análisis de la expresión de PTGDS mediante inmunofluorescencia muestra que en los estadios en los que se detecta expresión, PTGDS muestra una localización citoplasmática. En machos no se observa ninguna expresión ni en el primordio gonadal (s4c), ni en el estadio s5a (Figura 5.17 A, C). En el estadio s5b comienza a detectarse la proteína en el interior de los cordones. La expresión persiste en posteriores estadios, mostrando la misma localización (Figura 5.17 E, G; Figura 5.18 A, D, G; Figura 5.19 A; Figura 5.20 A, C).

En hembras no se detecta expresión de PTGDS en ningún estadio prenatal (Figura 5.17 B, D, F, H; Figura 5.18 B, C, E, F, H, I). Sin embargo, a partir del nacimiento (s9), se observa leve expresión en la región cortical y más intensa en la *rete testis* en formación. Esta expresión continúa en estadios posteriores (Figura 5.19 B, C, D, E; Figura 5.20 B, D).

5. Resultados

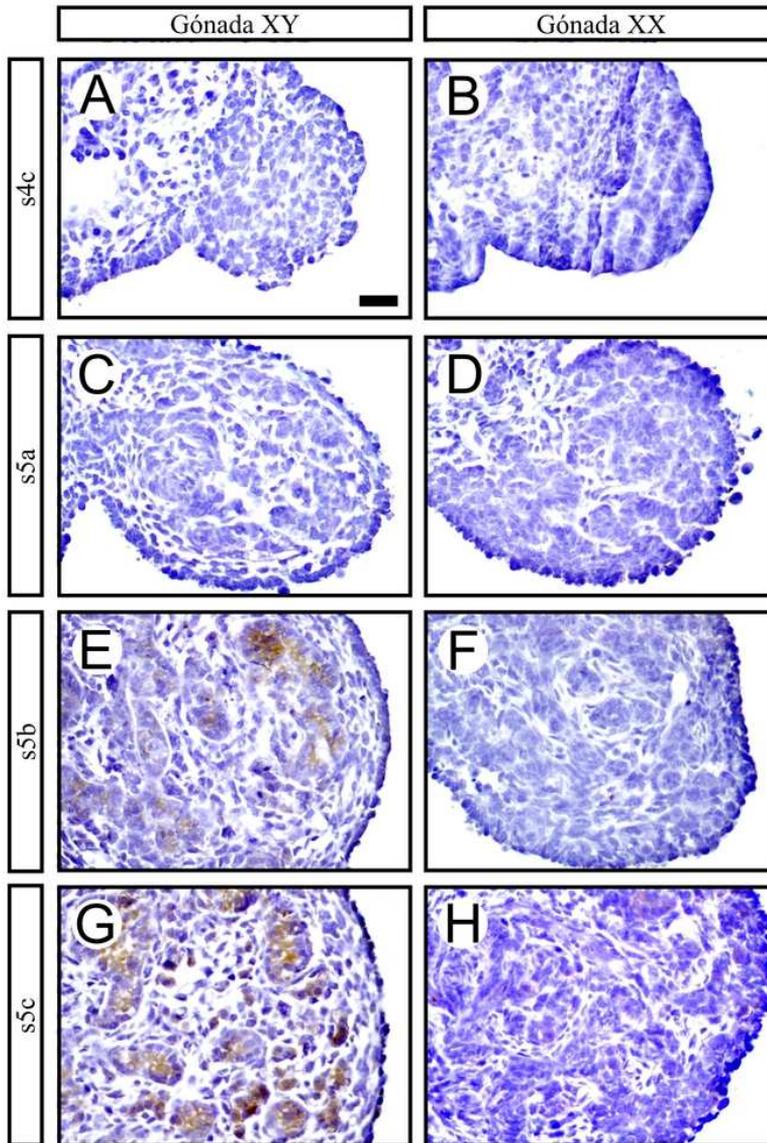


Figura 5.17: Detección de PTGDS mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s4c (A, B), s5a (C, D), s5b (E, F) y s5c (G, H), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta la proteína ni en el estadio s4c (A) ni en s5a (C). En s5b (E) y s5c (G) se observa expresión citoplasmática en el interior de los cordones testiculares. En la gónada XX no se observa expresión en ninguno de los estadios estudiados (B, D, F, H). La barra de escala representa 20 μm .

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

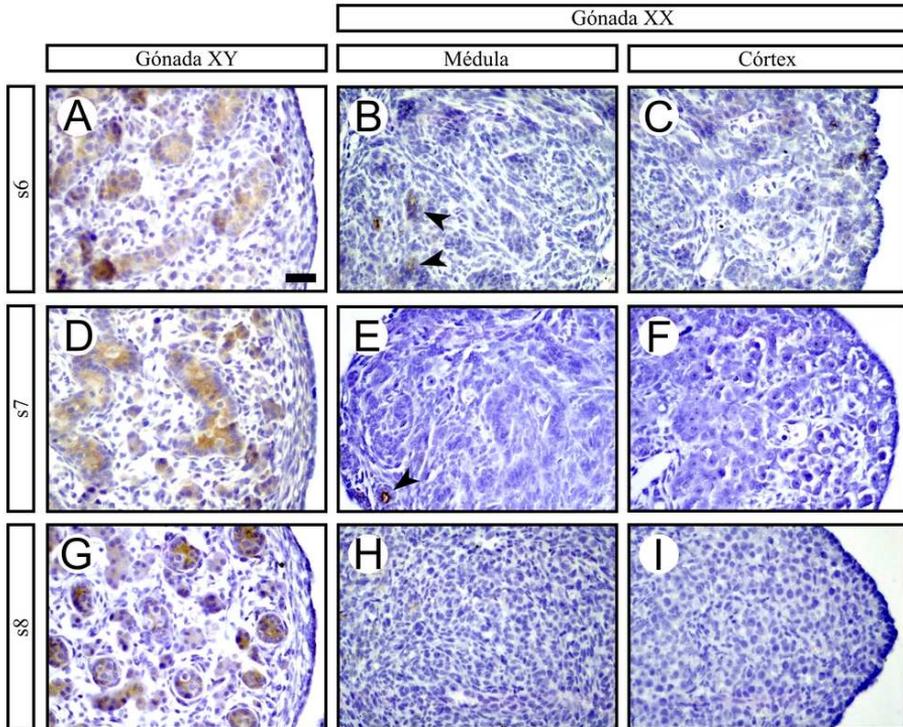


Figura 5.18: Detección de PTGDS mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s6 (A, B, C), s7 (D, E, F) y s8 (G, H, I), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa expresión citoplasmática de PTGDS en células de Sertoli en los estadios s6 (A), s7 (D) y s8 (G). En la región medular de la gónada XX se detecta expresión en la *rete testis* (puntas de flecha) en los estadios s6 (B) y s7 (E). En la región cortical de la gónada XX no se observa expresión en ninguno de los estadios estudiados (C, F, I). Las puntas de flecha señalan la *rete testis*. La barra de escala representa 20 μm .

5. Resultados

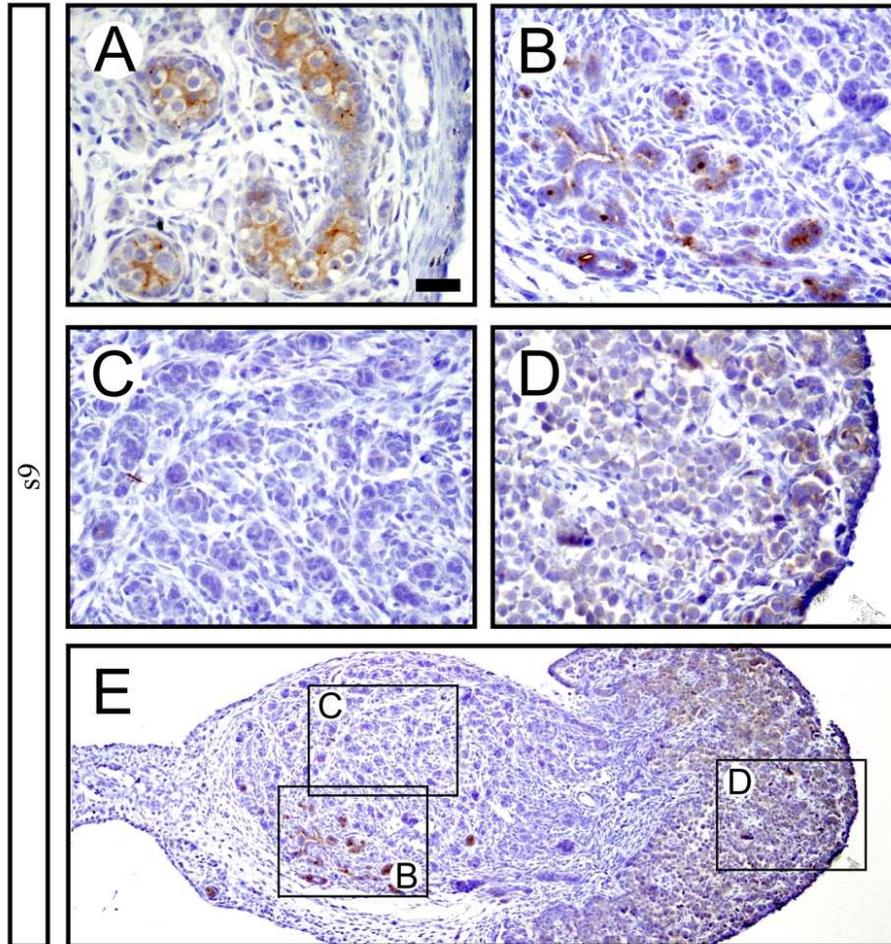


Figura 5.19: Detección de PTGDS mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas del estadio s9 de *Talpa occidentalis*, utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa expresión citoplasmática de PTGDC en células de Sertoli (A). En la región medular de la gónada XX se detecta expresión en la *rete testis* (B, E), mientras que el resto de la región aparece negativo (C, E). En la región cortical de la gónada XX se observa expresión citoplasmática asociada a células germinales (D, E). La barra de escala representa 20 μm en A, B, C y D y 65 μm en E.

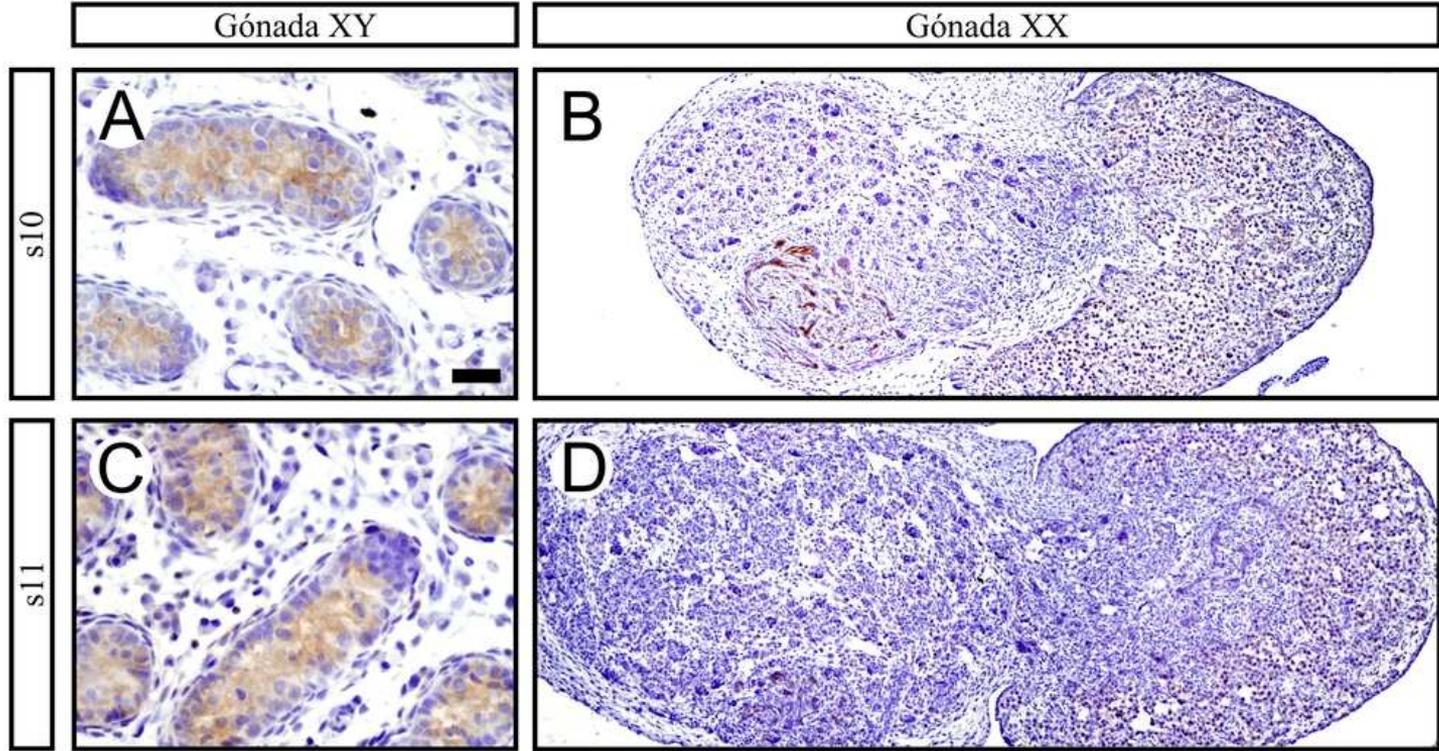


Figura 5.20: Detección de PTGDS mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s10 (A, B) y s11 (C, D), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa expresión citoplasmática de PTGDS en células de Sertoli en s10 (A) y s11 (C). En la región medular de la gónada XX se detecta expresión en la *rete testis*, mientras que el resto de esta región aparece negativo (B, D). En la región cortical de la gónada XX se observa expresión citoplasmática asociada a células germinales (B, D). La barra de escala representa 20 μm en A y C y 80 μm en B y D.

5. Resultados

5.2.7. AR

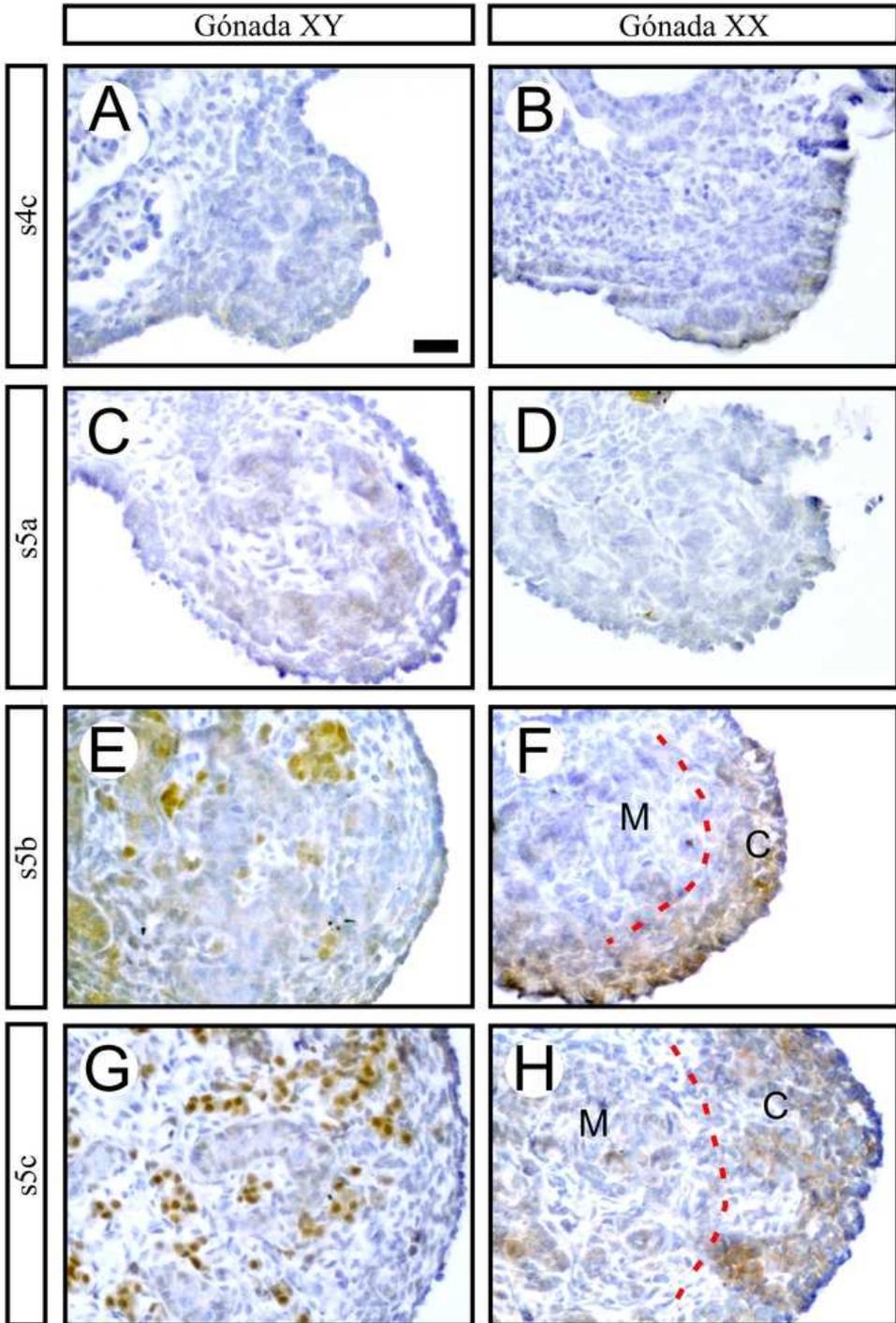
En la gónada masculina no se detecta la proteína ni en la cresta genital ni durante el estadio s5a (Figura 5.21 A, C). A partir de s5b, se comienza a observar expresión citoplasmática en la periferia de los cordones, concretamente en las células de Leydig (Figura 5.21 E). En s5c y 6, la expresión es citoplasmática y nuclear, pasando a ser nuclear a partir de s7 y observándose hasta la edad juvenil (Figura 5.21 G; Figura 5.22 A, D, G). A partir del nacimiento, las células de Sertoli también comienzan a mostrar una expresión citoplasmática de AR, que pasa a ser nuclear en s10 y al igual que las células de Leydig se mantiene en estadios posteriores (Figura 5.22 J; Figura 5.23 A, D). Además, a partir de s12, las células mioides peritubulares también aparecen positivas para AR (Figura 5.23 G, F, M).

En hembras, la región medular no muestra ninguna expresión en ninguno de los estadios estudiados hasta s9 (nacimiento) (Figura 5.21 B, D, F, H; Figura 5.22 B, E, H). Durante este estadio se observa expresión citoplasmática en las células de las esférulas (Figura 5.22 K). La expresión se mantiene en s10 (Figura 5.23 B) y desaparece en s11 (Figura 5.23 E). A partir de este estadio la expresión de AR pasa a observarse en células intersticiales y mostrando un patrón nuclear. Las células que lo expresan son principalmente las células mioides peritubulares, aunque también algunas células de Leydig. Este patrón continúa en estadios posteriores hasta la edad juvenil (Figura 5.23 H, K, N).

En la región cortical de la gónada XX tampoco se observa expresión en estadios tempranos (s4c y s5a) (Figura 5.21 B, D). Aunque a partir de s5b, se observa una débil expresión en esta región (Figura 5.21 F, H) (Figura 5.22 C, F, I). Este patrón continúa invariable hasta el nacimiento (s9) donde se hace más intenso, identificándose en el citoplasma de los oocitos y continuando hasta la edad juvenil (Figura 5.22 L; Figura 5.23 C, F, I, L, O).

Figura 5.21: Detección de AR mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s4c (A, B), s5a (C, D), s5b (E, F) y s5c (G, H), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta la proteína ni en el estadio s4c (A) ni en s5a (C). En s5b (E) se observa una fuerte expresión en el núcleo y citoplasma de las células de Leydig, que pasa a ser exclusivamente nuclear en s5c (G). En la gónada XX no se observa expresión ni en s4c (B) ni en s5a (D). En s5b (F) y s5c (H) se detecta una expresión débil en el córtex mientras que la médula aparece negativa. Las líneas discontinuas rojas delimitan la región cortical de la gónada femenina. La barra de escala representa 20 μm . (M) Médula; (C) Córtex.

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular



5. Resultados

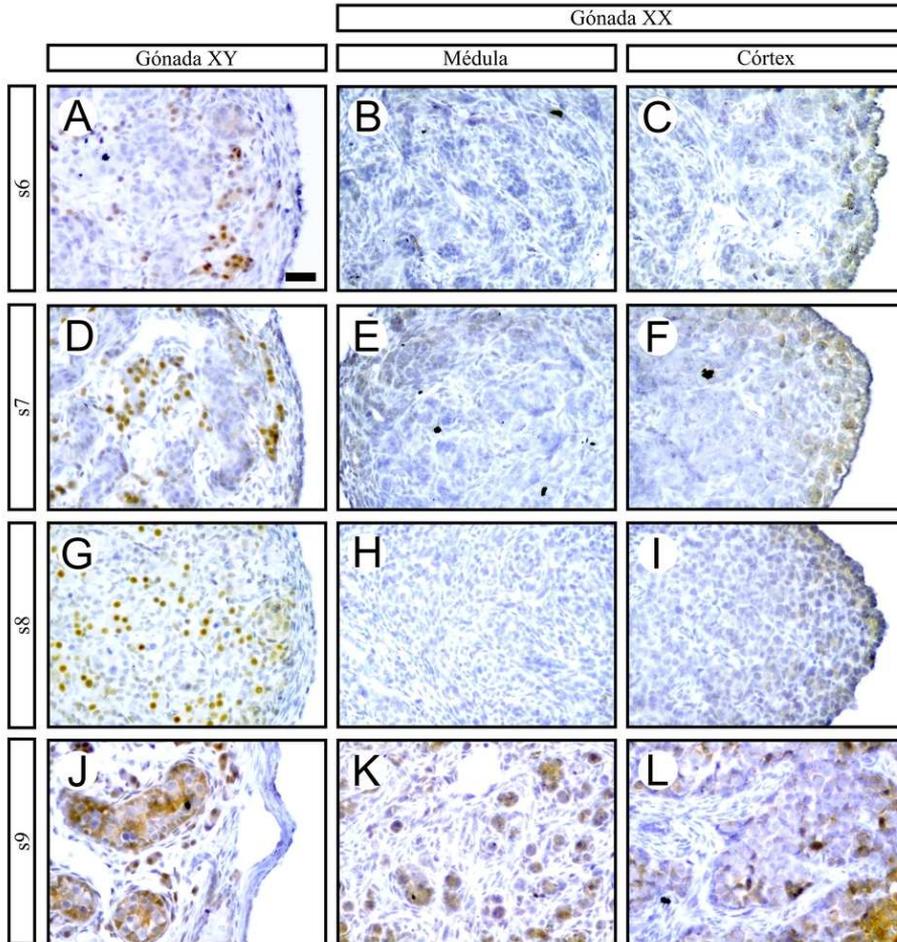


Figura 5.22: Detección de AR mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s6 (A, B, C), s7 (D, E, F), s8 (G, H, I) y s9 (J, K, L), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa una fuerte expresión de AR en núcleos de células de Leydig en todos los estadios estudiados (A, D, G, J). En s9 (J) se observa además expresión en el citoplasma y núcleo de células de Sertoli. En la gónada XX no se observa expresión en médula en los estadios s6 (B), s7 (E) y s8 (H). En s9 (K) se detecta expresión citoplasmática en las células que forman las esférulas de la región medular. En el córtex se observa una leve expresión citoplasmática en células germinales en todos los estadios estudiados (C, F, I, L). La barra de escala representa 20 μm .

5.2. Genes implicados en el desarrollo testicular

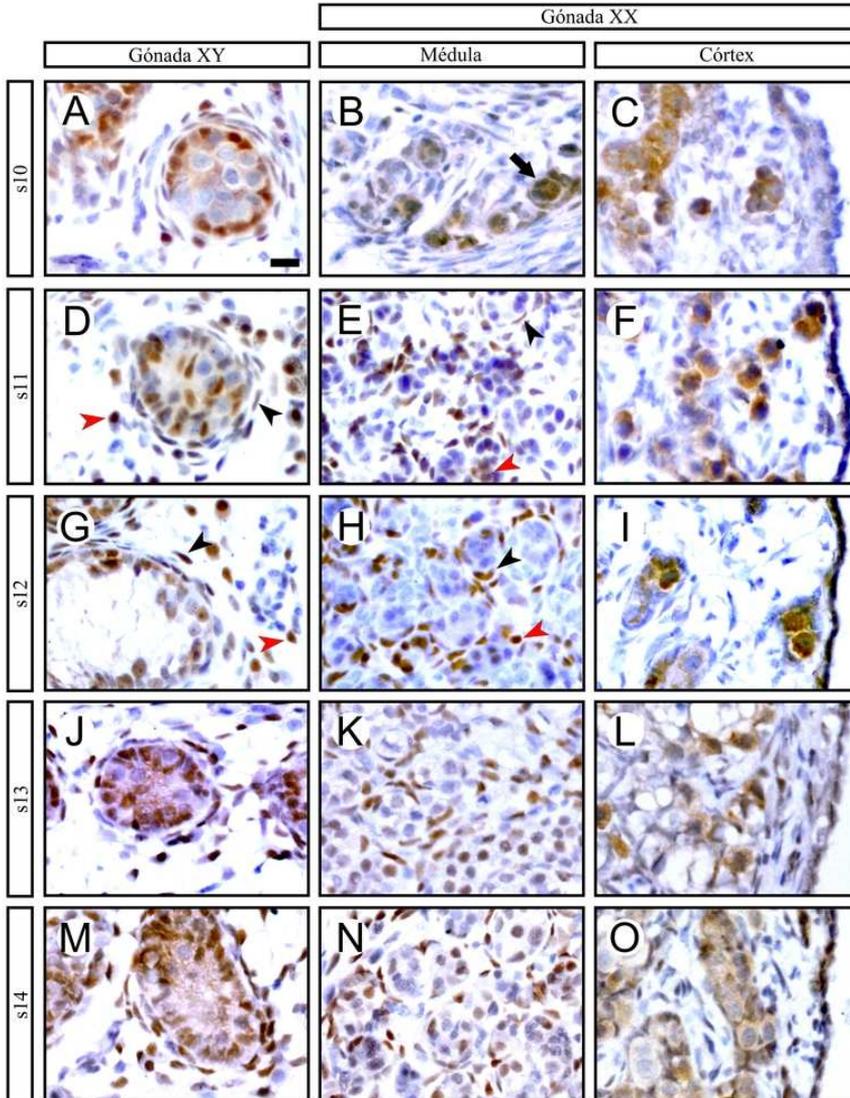


Figura 5.23: Detección de AR mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s10 (A, B, C), s11 (D, E, F), s12 (G, H, I), s13 (J, K, L) y s14 (M, N, O), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa expresión nuclear de AR en células mioides peritubulares, células de Leydig y de Sertoli en todos los estadios estudiados (A, D, G, J, M). En la gónada XX se observa expresión citoplasmática de AR en células que forman las esférulas de la médula (flechas negras) en el estadio s10 (B). A partir de s11 se observa expresión en células mioides peritubulares (puntas de flecha negras) y en algunas células de Leydig (puntas de flecha rojas) (E, H, K, N). En la región cortical se detecta expresión en el citoplasma de células germinales en todos los estadios estudiados (C, F, I, L, O). Las flechas negras señalan esférulas medulares. Las puntas de flecha negra señalan células mioides peritubulares. Las puntas de flecha roja señalan células de Leydig. La barra de escala representa 10 μm .

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

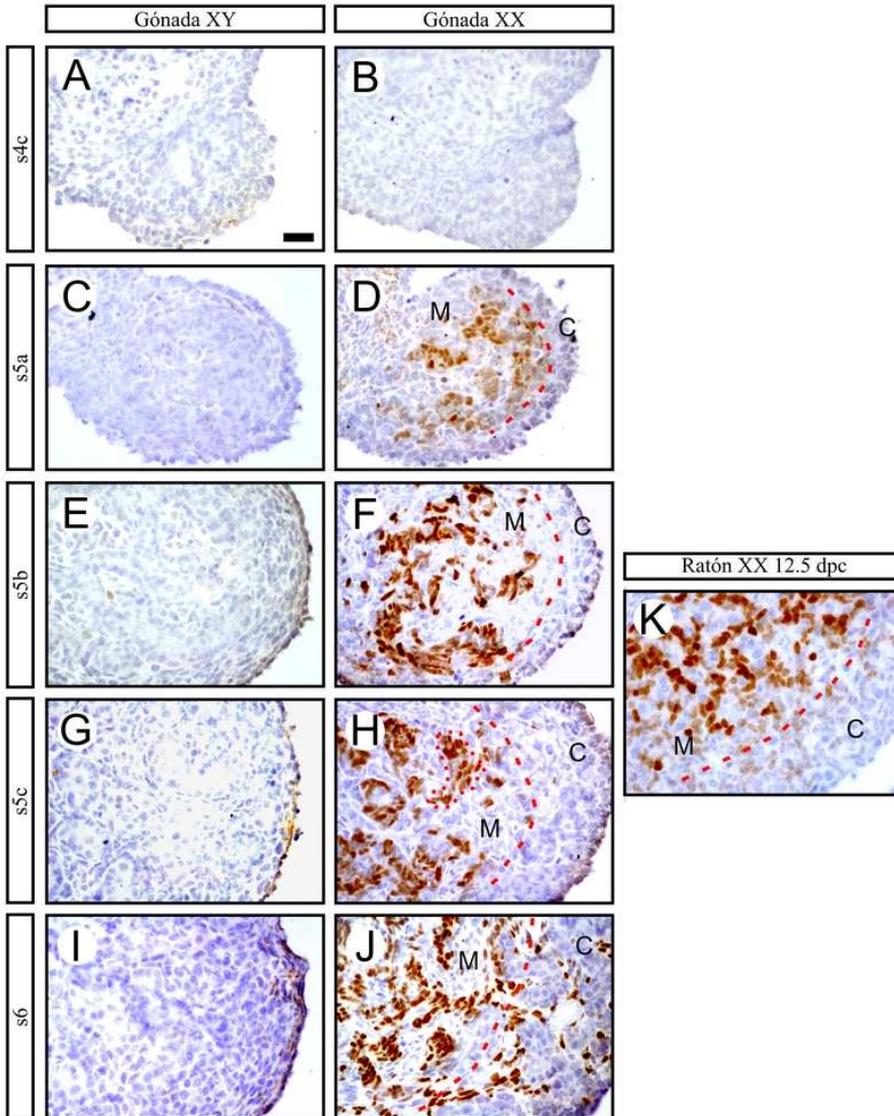
5.3.1. *FOXL2*

Los estudios de inmunohistoquímica para la proteína FOXL2 muestran que no hay expresión de la misma en la gónada masculina en ninguno de los estadios estudiados (Figura 5.24 A, C, E, G, I), Figura 5.25 A, B), Figura 5.26 A, B), Figura 5.27 A, B), Figura 5.28 A, B).

En la gónada femenina no se aprecia ninguna expresión en el primordio gonadal (s4c) (Figura 5.24 B). En el estadio 5a comienza a detectarse expresión en la región medular de la gónada, mientras que la corteza se halla desprovista de expresión (Figura 5.24 D). FOXL2 muestra un patrón de expresión nuclear. En los estadios s5b, s5c se hace patente que esta expresión medular se corresponde con células que se hallan en el interior de los cordones medulares, aunque también oparecen expresarlo algunas células intersticiales (Figura 5.24 F, H), siendo este patrón muy parecido al observado en ratón, aunque en esta especie no se forman estos cordones (Figura 5.24 K). La corteza sigue sin presentar células positivas. En s6, las células de los cordones medulares se hacen más numerosas, por lo que encontramos un mayor número de células positivas. En la región cortical comienzan a aparecer células FOXL2 positivas en regiones intersticiales, sobre todo en el córtex profundo. Las células de los cordones corticales son negativas (Figura 5.24 J). En los estadios 7 y 8, siguen aumentando el número de células positivas en zonas intersticiales de la corteza siendo más numerosas en la región frontera con la región medular (Figura 5.25 E, F). Se observan las primeras células positivas en el córtex externo (Figura 5.25 G, H). Las células mesenquimáticas de la región medular aparecen negativas (Figura 5.25 C, D).

Figura 5.24: Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* y *Mus musculus* correspondientes a los estadios s4c (A, B), s5a (C, D), s5b (E, F), s5c (G, H) y s6 (I, J) de topo y 12.5 dpc de ratón, utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta proteína en ninguno de los estadios estudiados (A, C, E, G, I). En la gónada XX no se observa expresión en el estadio s4c (B). En los estadios s5a (D), s5b (F), s5c (H) y s6 (J) se detecta la proteína en células de la médula, mostrando un patrón de expresión nuclear. En la gónada XX de 12.5 dpc de ratón (K) se observan células positivas en la región medular y unas pocas células lo expresan de manera muy leve en la región cortical. Las líneas de puntos rojas delimitan los cordones medulares de la gónada femenina. Las líneas discontinuas rojas delimitan la región cortical de la gónada femenina. La barra de escala representa 20 μm . (M) Médula; (C) Córtex.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico



5. Resultados

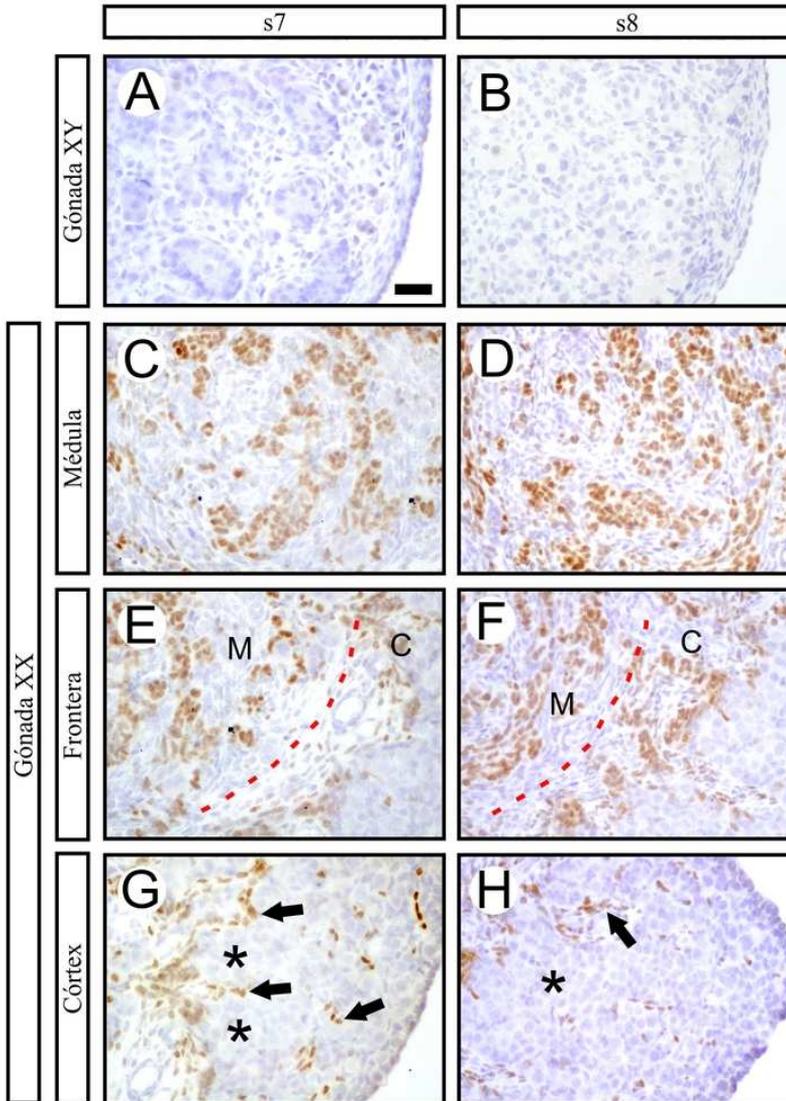


Figura 5.25: Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s7 (A, C, E, G) y s8 (C, D, F, H) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta proteína en ninguno de los estadios estudiados (A, B). En la gónada XX se detecta la proteína en células que forman las esférulas de la región médular, mostrando un patrón de expresión nuclear, en los estadios s7 (C) y s8 (D). En la región frontera se observan células positivas alrededor de los cordones corticales en el estadio s7 (E), aumentando este número en s8 (F). En la región cortical, las células positivas son las que quedan en los espacios intersticiales (flechas) entre cordones (asteriscos) (G, H). Las líneas discontinuas rojas delimitan la región cortical de la gónada femenina. Las flechas señalan espacios intersticiales. Los asteriscos indican cordones corticales. La barra de escala representa 20 μm . (M) Médula; (C) Córtex.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

En s9 las células positivas en la médula son las que forman las esférulas, manteniéndose éste patrón en sucesivos estadios (Figura 5.26 C, D; Figura 5.27 C, D; Figura 5.28 C, D). En el córtex, la distribución de las células mesenquimáticas que expresan FOXL2 no es homogénea, sino que son más frecuentes en la región frontera con la médula (Figura 5.26 E, F; Figura 5.27 E). Durante todo este periodo, estas células siempre son de tipo mesenquimático y ocupan los intersticios existentes entre los cordones corticales. Las células somáticas incluidas en estos cordones no expresan FOXL2 (Figura 5.26 G, H; Figura 5.27 G). Entre los estadios s12 (15-20 dpp) y s14 (25-30 dpp) los cordones se rompen y se observa una clara reorganización durante la cual las células que expresan FOXL2 se disponen alrededor de las células germinales constituyendo los folículos ováricos, mientras que las células que no expresan FOXL2 quedan en el compartimento intersticial (Figura 5.27 F, H; Figura 5.28 E, F, G, H). El número de estas células intersticiales carentes de FOXL2 disminuye paulatinamente en estadios posteriores del desarrollo hasta alcanzar su máxima representación en las gónadas juveniles (Figura 5.29 A, B). El número de células que expresan FOXL2 es muy escaso durante todo el desarrollo prenatal, creciendo entre s10 y s11 (en 5 días) en que se alcanza el número máximo y se observa una distribución homogénea de este tipo de células en todo el córtex (Figura 5.30). Este número se mantiene constante en los estadios posteriores.

Las inmunofluorescencias dobles realizadas con anticuerpos frente a las proteínas FOXL2 y WT1 han revelado que, en el córtex de la gónada XX de *Talpa*, hay dos subpoblaciones de células somáticas procedentes del epitelio celómico (positivas para WT1), unas que expresan FOXL2 y suelen estar junto a folículos en formación, y otras que no expresan FOXL2 (Figura 5.31 A, B, C, D, E, F). En ratón ocurre algo similar, observándose también ambas poblaciones (Figura 5.31 M, N, O). En la región medular, las células positivas para ambas proteínas son las somáticas que forman las esférulas medulares (Figura 5.31 G, H, I).

5. Resultados

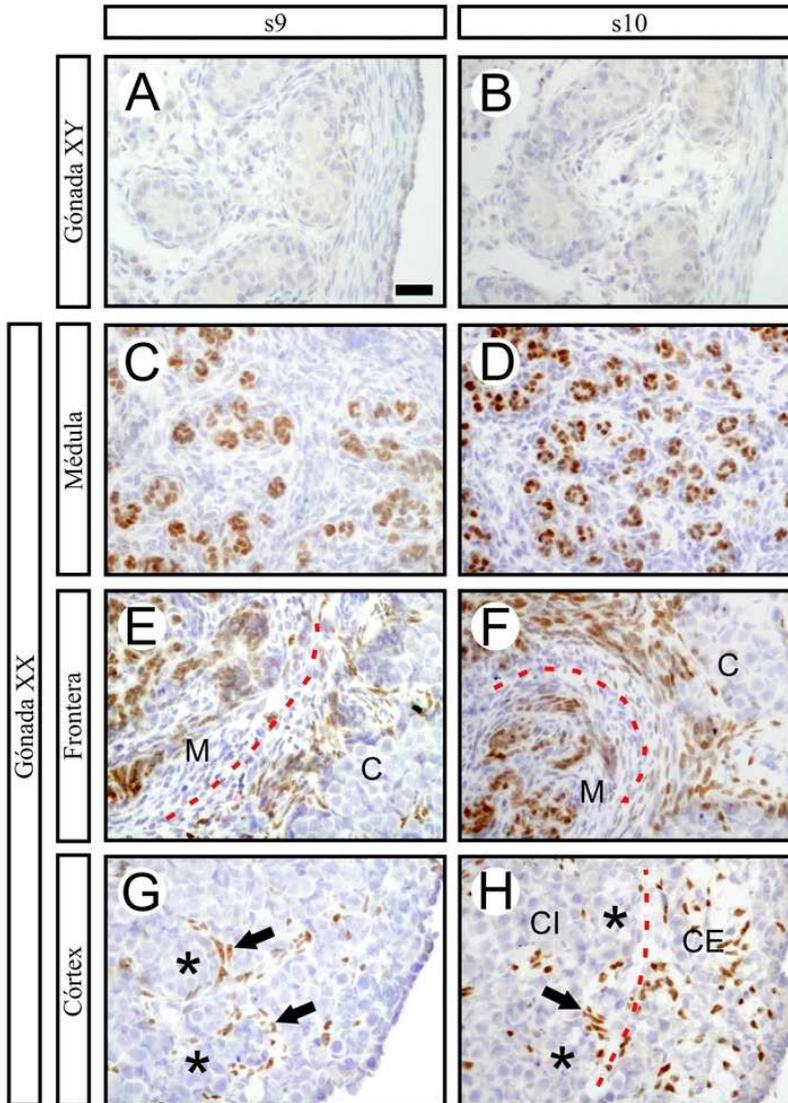


Figura 5.26: Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s9 (A, C, E, G) y s10 (C, D, F, H) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta proteína en ninguno de los estadios estudiados (A, B). En la gónada XX se detecta la proteína en células que forman las esférulas de la región médular, mostrando un patrón de expresión nuclear, en los estadios s9 (C) y s10 (D). En la región frontera se observan células positivas alrededor de los cordones corticales en el estadio s9 (E), aumentando en número en s10 (F). En la región cortical, las células positivas son las que quedan en los espacios intersticiales (flechas) entre cordones (asteriscos) (G, H), apareciendo éstas tanto en el córtex interno como externo (H). Las líneas discontinuas rojas delimitan la región cortical de la gónada femenina. Las flechas señalan espacios intersticiales. Los asteriscos indican cordones corticales. La barra de escala representa 20 μm . (M) Médula; (C) Córtex; (CI) Córtex interno; (CE) Córtex externo.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

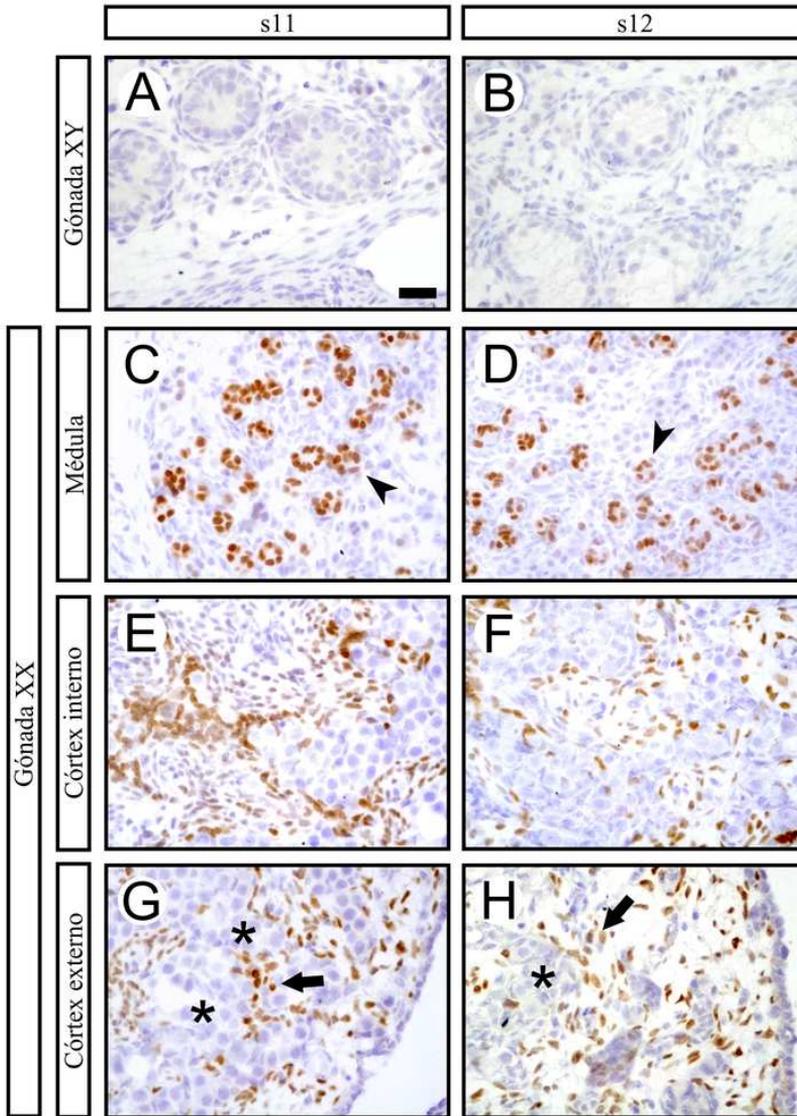


Figura 5.27: Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s11 (A, C, E, G) y s12 (C, D, F, H) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta proteína en ninguno de los estadios estudiados (A, B). En la gónada XX se detecta la proteína en células que forman las esférulas de la región médular (puntas de flecha), mostrando un patrón de expresión nuclear, en los estadios s11 (C) y s12 (D). En la región frontera se observan células positivas alrededor de los cordones corticales en el estadio s11 (E), aumentando este número en s12 (F). En la región cortical, las células positivas son las que quedan en los espacios intersticiales (flechas), entre cordones (asteriscos), que ahora son muy amplios (G, H). Las puntas de flecha señalan esférulas. Las flechas señalan espacios intersticiales. Los asteriscos indican cordones corticales. La barra de escala representa 20 μm .

5. Resultados

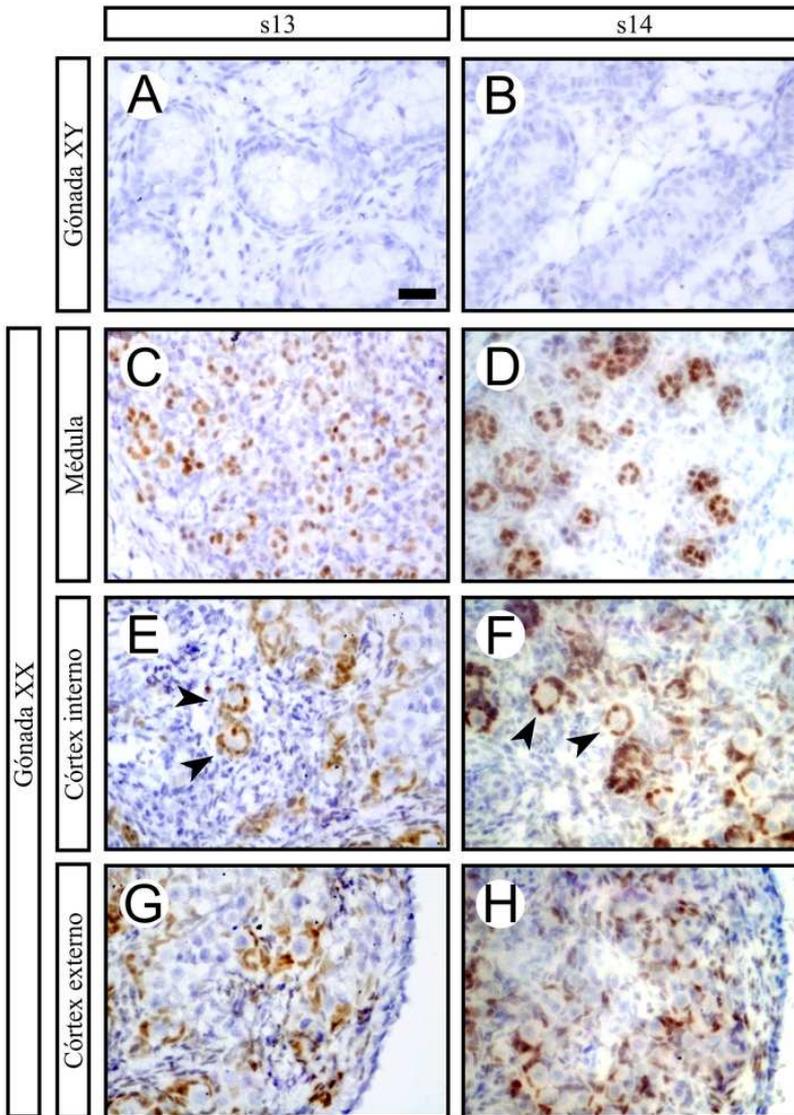


Figura 5.28: Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s13 (A, C, E, G) y s14 (C, D, F, H) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY no se detecta proteína en ninguno de los estadios estudiados (A, B). En la gónada XX se detecta la proteína en células que forman las esférulas de la región médular, mostrando un patrón de expresión nuclear, en los estadios s13 (C) y s14 (D). En el córtex interno se observan los primeros folículos formados (puntas de flecha) (E, F), mientras que en el córtex externo todavía no aparecen pocos folículos formados (G, H). Las puntas de flecha señalan folículos. La barra de escala representa 20 μm .

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

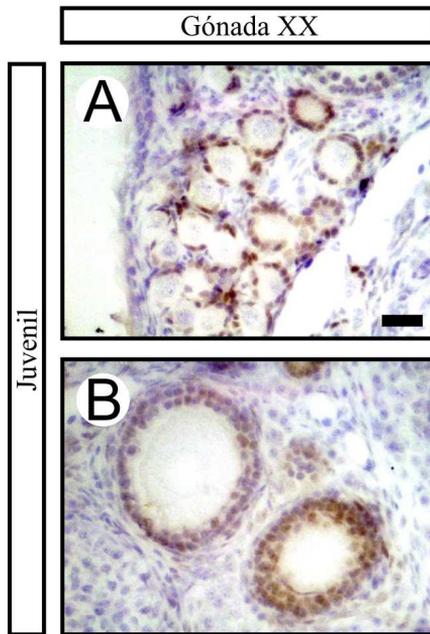


Figura 5.29: Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas XX juveniles de *Talpa occidentalis* (A, B) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la corteza externa aparecen folículos primarios, identificándose como positivas las células de la granulosa (A). En el córtex interno, aparecen folículos secundarios, apareciendo también como positivas las células de la granulosa (B). La barra de escala representa 20 μm .

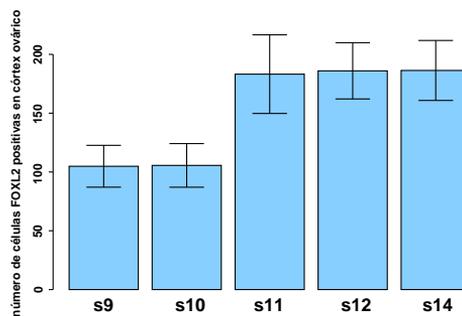


Figura 5.30: Recuento de células positivas para FOXL2 en la región cortical de la gónada XX de *Talpa occidentalis*. Durante los estadios s9 y s10, el número de células positivas para FOXL2 se mantiene constante en la región cortical. Entre s10 y s11 (5 días) se produce un incremento notable del número de células positivas, que permanece estable en estadios posteriores.

5. Resultados

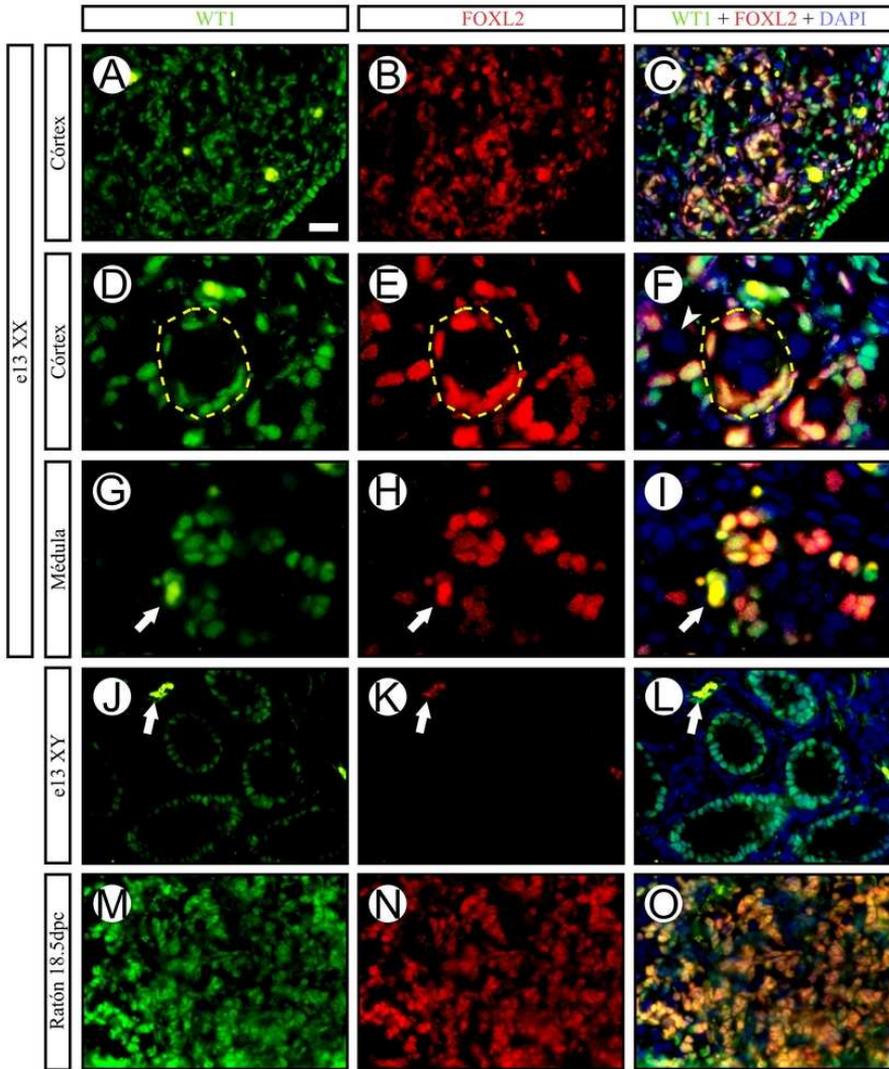


Figura 5.31: Detección de WT1 (verde) y FOXL2 (rojo) mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis* y *Mus musculus*. En el córtex de la gónada XX de *Talpa* del estadio s13, todas las células somáticas son positivas para WT1 pero no todas lo son para FOXL2, la mayoría asociadas a folículos en formación (A, B, C, D, E, F). En la médula, FOXL2 y WT1 colocalizan en las células de las esférulas medulares (G, H, I). En la gónada XY de *Talpa* del estadio s13, las células positivas para WT1 son las células de Sertoli, mientras que no se observa ninguna célula positivas para FOXL2 (J, K, L). En la gónada XX de ratón de 18.5 dpc, todas las células somáticas expresan WT1, aunque no todas expresan FOXL2 (M, N, O). Las líneas discontinuas amarillas delimitan folículos en formación. Las puntas de flecha blancas señalan células germinales. Las flechas blancas señalan eritrocitos autofluorescentes. La barra de escala representa 20 μm en A, B, C, J, K, L, M, N, O y 8 μm en D, E, F, G, H e I.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

Las células somáticas de las esférulas medulares proceden de proyecciones de células desde los cordones corticales hacia la médula (Figura 5.32 A, C, D). Estas células somáticas no expresaban *FOXL2*, pero al incorporarse al compartimento medular, comienzan a hacerlo (Figura 5.32 B). Las figuras 5.59 A y B también muestran claros ejemplos de este tipo de proyecciones celulares.

Se amplificó y secuenció un fragmento del gen *FOXL2* de topo, con el fin de realizar un estudio de expresión mediante RT-Q-PCR (Figura 5.33). En este estudio se observa que los niveles de transcrito en machos, permanecen bajos durante todo el desarrollo testicular, mientras que en hembras, en estadios tempranos (s4c y 5a), los niveles se muestran similares a los observados en machos. No obstante, a partir de s5b, la presencia de transcritos aumenta progresivamente, siendo siempre mayor que en la gónada masculina ($1,125 \cdot 10^{-7} < p < 0,01325$). En el estadio s10, la expresión en la región cortical aumenta con respecto a la testicular, volviéndose a igualar los mismos en el siguiente estadio y posteriores (Figura 5.34).

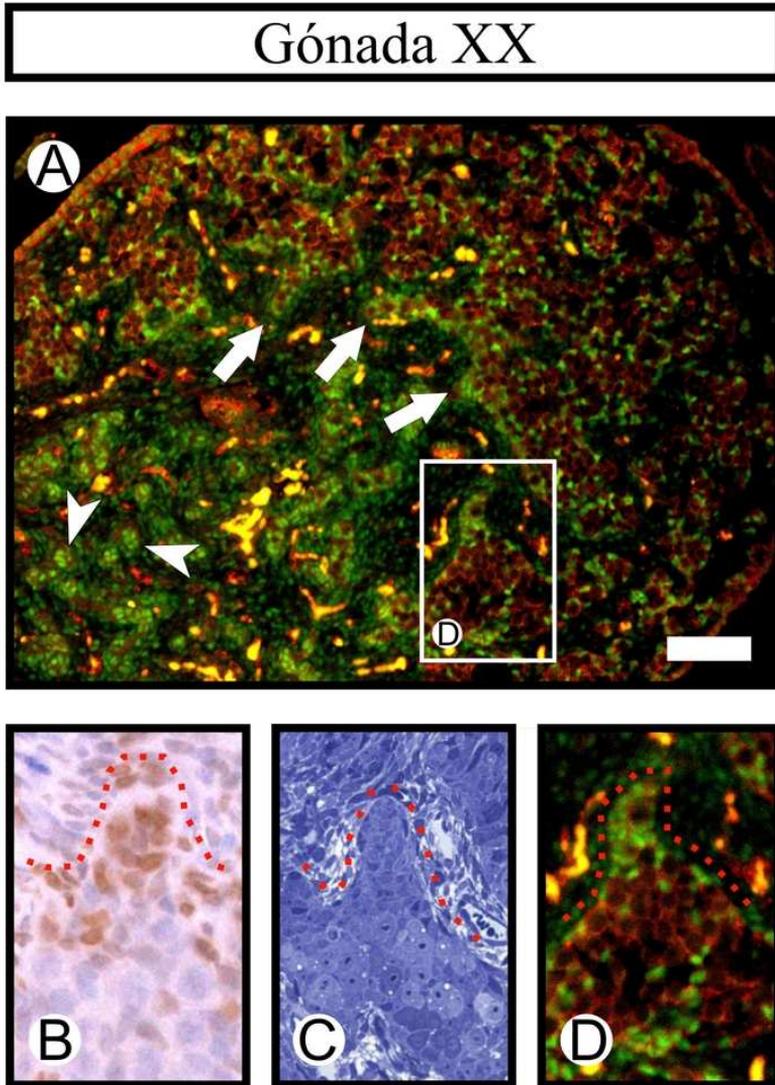


Figura 5.32: Proyecciones de los cordones corticales hacia la región medular en la gónada XX del estadio s11 de *Talpa occidentalis*. Los cordones corticales se proyectan hacia la región medular (flechas blancas), dando lugar a nuevos cordones medulares que se fragmentan originando esférulas medulares (puntas de flecha) (A). Las células germinales y los vasos están marcados mediante inmunofluorescencia utilizando una anticuerpo contra la proteína CAV1 (rojo), mientras que para las células somáticas se utilizó uno contra WT1 (verde) (A,D). B, C y D muestran una proyección en detalle, formada por células somáticas y germinales. (B) Detección de FOXL2 mediante inmunohistoquímica en células somáticas que se proyectan hacia la médula. (C) Estudio de la morfología de las proyecciones mediante cortes semifinos. (D) Detalle del inserto mostrado en A. La barra de escala representa 110 μm en A, 20 μm en B, 50 μm en C y 60 μm en D.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

T. occidentalis	AGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGCGA	35
M. musculus	AGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGCGA	35
H. sapiens	AGCCTCAACGAGTGCTTCATCAAGGTGCCGCGCGA	35
consensus	*****	
T. occidentalis	GGGCGGCGGCGAGCGCAAGGGCAACTACTGGACGC	70
M. musculus	GGGCGGCGGCGAGCGCAAGGGCAACTACTGGACGC	70
H. sapiens	GGGCGGCGGCGAGCGCAAGGGCAACTACTGGACGC	70
consensus	*****	
T. occidentalis	TGGACCCGGCCTGCGAGGACATGTTC	96
M. musculus	TcGGACCCGGCCTGCGAGGACATGTTC	96
H. sapiens	TGGACCCGGCCTGCGAaGACATGTTC	96
consensus	* ** * * * * *	

Figura 5.33: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *FOXL2* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 99% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 99% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

5. Resultados

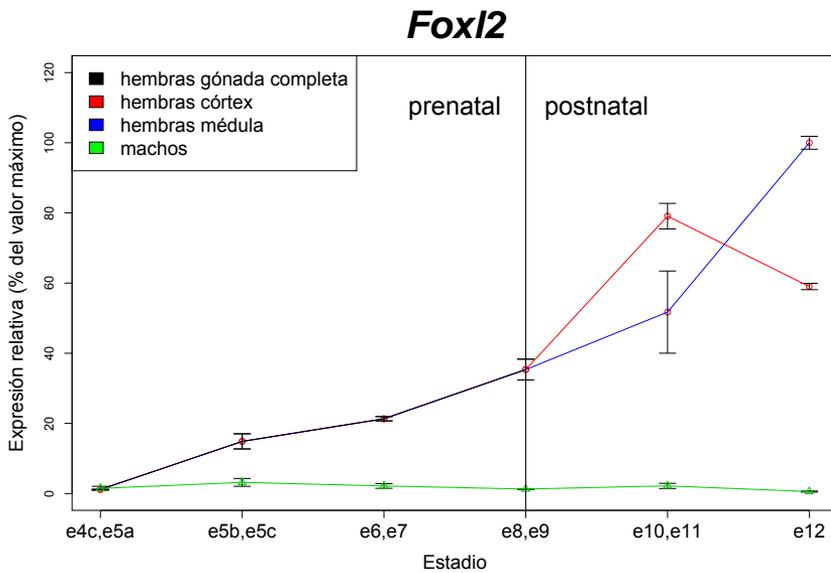


Figura 5.34: Estudio del patrón de expresión cuantitativo mediante RT-Q-PCR de FOXL2 en gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. En los estadios s4-s5a se observa que no hay expresión de FOXL2 ni en machos ni en hembras. Estos niveles van aumentando progresivamente a partir de s5b-s5c en la gónada femenina para alcanzar niveles máximos a partir de s10-s11, mientras que en el macho no se detecta expresión en ninguno de los estadios estudiados.

5.3.2. *RSPO1*, *WNT4* y *FST*

En la gónada femenina, se detecta la proteína WNT4 de manera muy leve en la región medular de ovoteste durante el desarrollo temprano (s4c-s5c) (Figura 5.35 A, C, E, G). A partir de s6, la expresión comienza a aumentar, apareciendo células positivas en la región cortical (Figura 5.35 I; Figura 5.36 A). En s8, tanto la región cortical como la medular muestran una intensa expresión de WNT4, observándose que son las células del interior de los cordones corticales las que los expresan en la corteza (Figura 5.36 C). A partir de s9, esta expresión comienza a decrecer paulatinamente en ambas regiones (Figura 5.36 E, G, I).

La proteína FST no se detecta durante estadios tempranos de la gonadogénesis femenina (Figura 5.35 B, D, F, H, I). Sin embargo, en el estadio 7, algunas células inmunorreactivas para FST aparecen en la corteza (Figura 5.36 B). Durante los estadios s8, 9 y 10, la mayoría de células corticales aparecen positivas para FST, mostrando un patrón difuso, lo que sugiere que esta proteína se secreta fuera de las células que la producen (Figura 5.36 D, F, H). En estadios posteriores, esta expresión desaparece (Figura 5.36 J).

5. Resultados

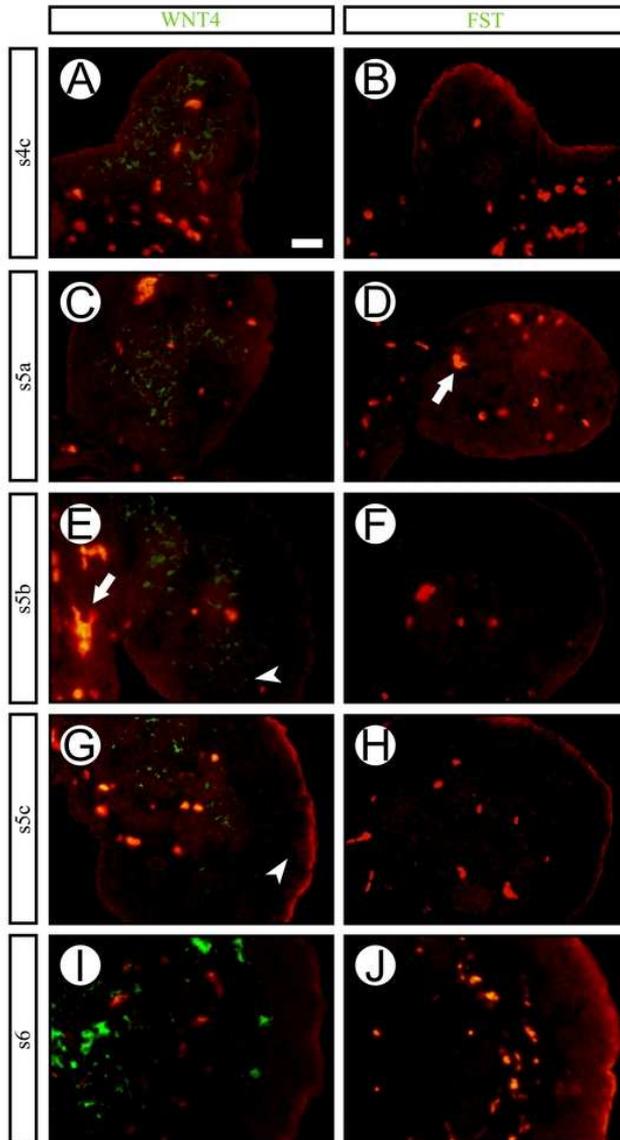


Figura 5.35: Detección de WNT4 y FST mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XX embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s4c (A, B), s5a (C, D), s5b (E, F), s5c (G, H) y s6 (I, J), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). En todos los estadios estudiados se observa una leve expresión en la región medular (A, C, E, F, I). En ninguno de los estadios estudiados se observa expresión de FST (B, D, F, H, J). Las puntas de flecha blancas señalan células germinales. Las flechas blancas señalan eritrocitos autofluorescentes. La barra de escala representa 20 μm .

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

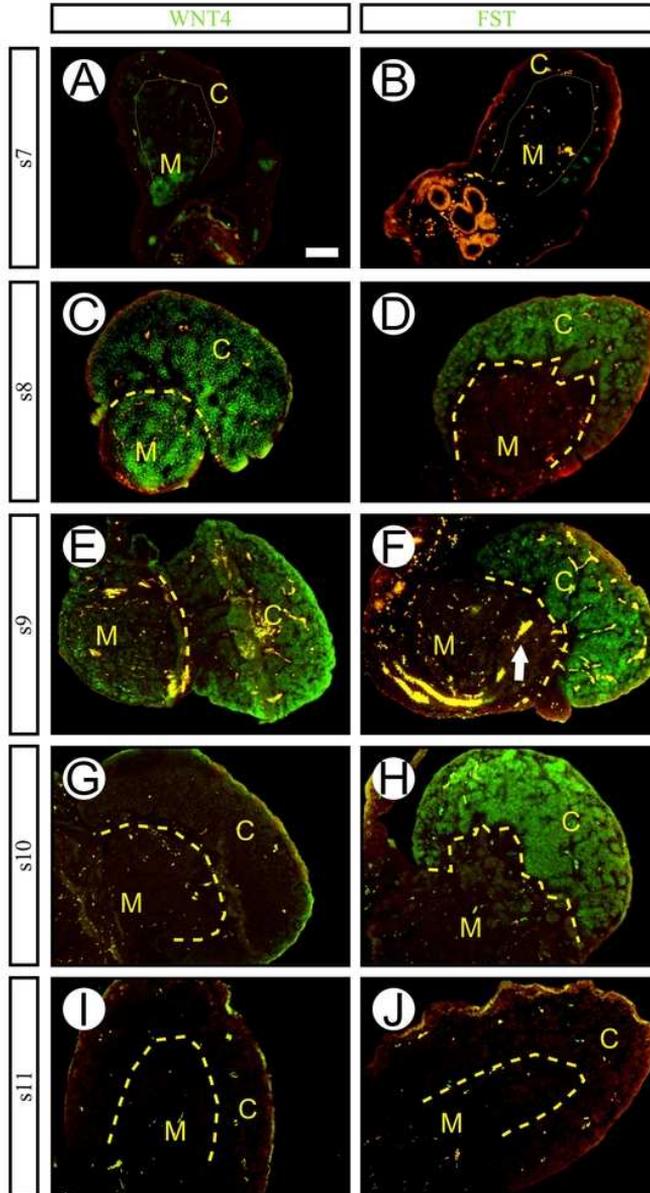


Figura 5.36: Detección de WNT4 y FST mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas XX embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s7 (A, B), s8 (C, D), s9 (E, F), s10 (G, H) y s11 (I, J), utilizando un anticuerpo secundario marcado con FITC (verde). En los estadios s7, s8 y s9 se detecta expresión de WNT4 tanto en la región medular como en la cortical (A, C, E). En s10 y s11 la expresión de WNT4 desaparece (G, I). En s7 se comienza a detectar expresión de FST en unas pocas células corticales (B). En s8, s9 y s10 se detecta la proteína FST en toda la región cortical (D, F, H). En s11 no se observa expresión de FST (J). Las flechas blancas señalan eritrocitos autofluorescentes. Las líneas discontinuas amarillas delimitan la región cortical. La barra de escala representa 80 μm . (M) Médula; (C) Córtex.

5. Resultados

El análisis de los tipos celulares que expresan los diferentes marcadores ováricos muestra que las células somáticas que expresan FOXL2 son las intersticiales en la periferia de los cordones corticales (Figura 5.37 B), mientras que las que reaccionan positivamente para WNT4 y FST son las del interior de éstos (Figura 5.37 C, D). Ambos tipos celulares expresan WT1 (Figura 5.37 A).

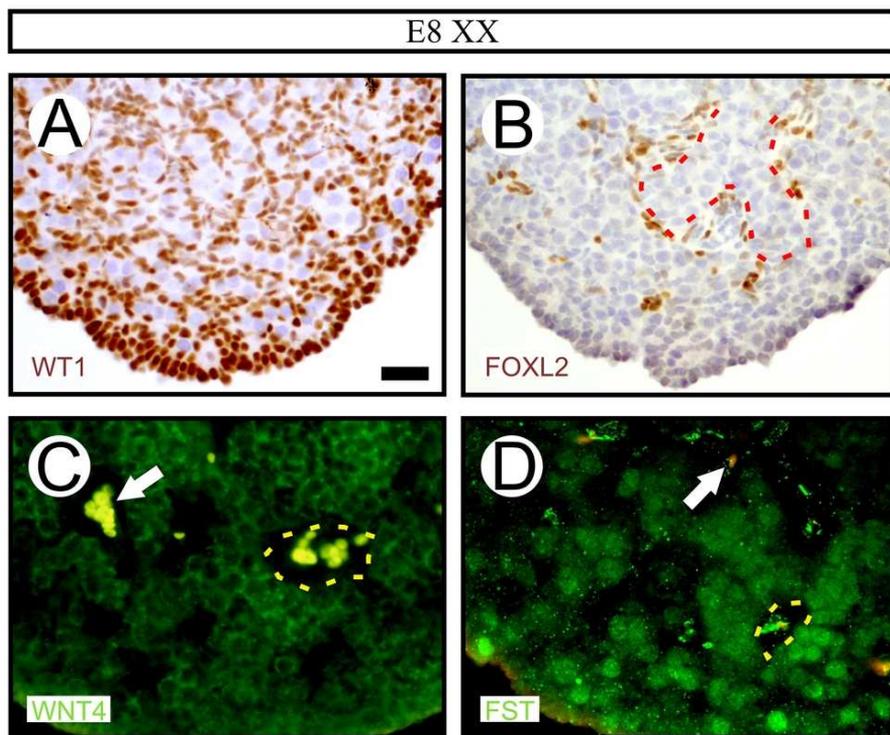


Figura 5.37: Identificación de las diferentes poblaciones de células somáticas que expresan marcadores ováricos en la región cortical de la gónada XX de *T. occidentalis*. La inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-WT1 muestra que todas las células somáticas de la corteza son positivas para esta proteína (A). El marcaje mediante inmunohistoquímica de la proteína FOXL2 revela que las células que la expresan son las intersticiales de la periferia de los cordones corticales (B). Las inmunofluorescencias para WNT4 y FST muestran que las células positivas son las del interior de los cordones corticales (C, D). Las flechas blancas señalan eritrocitos autofluorescentes. Las líneas discontinuas rojas delimitan cordones corticales. Las líneas discontinuas amarillas marcan zonas intersticiales. La barra de escala representa 20 μm .

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

Se amplificaron y secuenciaron fragmentos de *RSPO1*, *WNT4* y *FST*, para realizar un estudio de expresión mediante RT-Q-PCR.

T. occidentalis	CcGAgGTCAACGGCTGCCTCAAGTGCTCGCCCAAG	35
H. sapiens	CtGAAGTCAACGGCTGCCTCAAGTGCTCaCCCAAG	35
M. musculus	CaGAAGTCAACGGtTGCCTCAAGTGCTCGCCCAAG	35
consensus		
T. occidentalis	CTGTTCATCCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCA	70
H. sapiens	CTGTTCATCCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCA	70
M. musculus	CTcTTCATtCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCA	70
consensus		
T. occidentalis	GGTGGGCGTCTGCTTGCCGTCCTGCCACCTGGAT	105
H. sapiens	GGTGGGCGTCTGCTTGCCGTCCTGCCACCTGGAT	105
M. musculus	GGTGGGCGTCTGcTGCCGTCCTGCCACCTGGAT	105
consensus		
T. occidentalis	ACTTCGATGCCCGCAgCCCCGACATGAACAAGTGC	140
H. sapiens	ACTTCGAcGCCCGCAACCCCGACATGAACAAGTGC	140
M. musculus	ACTTtGATGCCCGCAACCCCGACATGAACAAaTGC	140
consensus		
T. occidentalis	ATCAAAATGCAAGATtGAGCACTGcGAGGCCTGCTT	175
H. sapiens	ATCAAAATGCAAGATCGAGCACTGTGAGGCCTGCTT	175
M. musculus	ATCAAAATGCAAGATCGAGCACTGTGAGGCCTGCTT	175
consensus		
T. occidentalis	CAGCCACAACCTTCTGCACCAAGTGTAAAGGAGaGCT	210
H. sapiens	CAGCCAaTAACCTTCTGCACCAAGTGTAAAGGAGGGCT	210
M. musculus	CAGCCACAACCTTCTGCACCAAGTGTcAGGAGGcCT	210
consensus		
T. occidentalis	TGTACCTGCACAAGGGCCGCTGCTAcCCAGaCTGC	245
H. sapiens	TGTACCTGCACAAGGGCCGCTGCTATCCAGCtTGt	245
M. musculus	TGTACtTaCACAAGGGCCGCTGCTATCCAGCCTGC	245
consensus		

5. Resultados

T. occidentalis	CCCGAGGGCTCTACAGCaGCCAACGGCACCATGGA	280
H. sapiens	CCCGAGGGCTCctCAGCtGCCAAatGGCACCATGGA	280
M. musculus	CCTgAGGGCTCTACAGCcGctAACaGCACCATGGA	280
consensus	*****	
T. occidentalis	GTGCAGCAGTCCgGCACAATGTGAAATGAGCGAGT	315
H. sapiens	GTGCAGtAGTCCTGCgCAATGTGAAATGAGCGAGT	315
M. musculus	GTGCgGCAGTCCTGCACAATGTGAAATGAGCGAGT	315
consensus	*****	
T. occidentalis	GGTCCCCGTGGGGGCCaTGCTCCAAGAAGAAGAA	350
H. sapiens	GGTcCCGTGGGGGCCCTGCTCCAAGAAGcAGcAG	350
M. musculus	GGTCCCCGTGGGGaCCCTGCTCCAAGAAGAgGAAG	350
consensus	*****	
T. occidentalis	CTCTGTGGTTTCCGGAGGGGCTcTGAGGAGCGGAC	385
H. sapiens	CTCTGTGGTTTCCGGAGGGGCTCcGAGGAGCGGAC	385
M. musculus	CTgTGcGGTTTCCGGAAaGGGaTCgGAaGAGCGGAC	385
consensus	*****	
T. occidentalis	tCGgAGGGTGCTCCATGCgCCTGGGGGGGACCATG	420
H. sapiens	ACGCAGGGTGCTaCATGCcCCTGtGGGGGACCATG	420
M. musculus	ACGCAGaGTGCTCCATGCtCCcGGGGGaGACCaca	420
consensus	*****	
T. occidentalis	CTACCTGCTCTGACAtCAAGGAGACCcGGAGGTGC	455
H. sapiens	CTgCCTGCTCTGACACCAAGGAGACCcGGAGGTGC	455
M. musculus	CcACCTGCTCcGACACCAaGAGACCcGcaAGTGt	455
consensus	*****	
T. occidentalis	ACgGTGAtaAGGActCCCTGTCCTGAaGGGCAGAA	490
H. sapiens	ACaGTGAGgAGagtGCCgTGTCCTGAGGGGCAGAA	490
M. musculus	ACcGTGcGcAGGACGCCCTGcCCaGAGGGGCAGAA	490
consensus	*****	
T. occidentalis	aAGGAGGAAaGGcGGCCAGGGCCGGCGGGAGAATG	525
H. sapiens	GAGGAGGAAGGGaGGCCAGGGCCGGCGGGAGAATG	525
M. musculus	GAGGAGGAAGGGgGGCCAGGGCCGGaGGGAGAATG	525
consensus	*****	
T. occidentalis	CCAACAGGAgCCTGaaCA	543
H. sapiens	CCAACAGGAACCTGGCCA	543
M. musculus	CCAACAGGcAtCcGGCCA	543
consensus	*****	

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

Figura 5.38: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *RSPO1* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 91 % con la secuencia de *Homo sapiens* y un 88 % con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde. Los bloques azules se corresponden con el fragmento utilizado para RT-Q-PCR.

T. occidentalis	AAGCAAGGGGGCCTC a TCCAGCCGGGCCCTCATGA	35
H. sapiens	AAGCAAGGGGGCCTC g TCCAGC a GaGCCCTCATGA	35
M. musculus	g AAGCAAGGGGGCCTC c TCCAGCCGGGC a TCATGA	35
consensus	* *	
T. occidentalis	ACCTCCACAACAACGAGGCTGGCAGGAAGGC t ATC	70
H. sapiens	ACCTCCACAACA a tGAGGC c GGCAGGAAGGCCATC	70
M. musculus	At CT t CACAACAACGAGGCTGGCAGGAAGGCCATC	70
consensus	* *	
T. occidentalis	CTGACACACATGCGGGTGGAGTGCAAGTGCCACGG	105
H. sapiens	CTGACACACATGCGGGTGG a ATGCAAGTGCCACGG	105
M. musculus	t TGACACACATGCGGGTGGAGTGCAAGT t CACGG	105
consensus	* *	
T. occidentalis	GGTGTCGGGCTCCTGCGAGGT g AAGACGTGCTGGC	140
H. sapiens	GGTGTC a GGCTCCT g tGAGGTAAGACGTGCTGGC	140
M. musculus	GGTGTCGGGCTCCTGCGAGGTAAAGACGTGCTGGC	140
consensus	* *	
T. occidentalis	G c GCCGTGCCGCCCTTCCGCCAGGTGGGCCACGCA	175
H. sapiens	G a GCCGTGCCGCCCTTCCGCCAGGTGGG t CACGCA	175
M. musculus	G t G C t G T a CCGCCCTTCCGCCAGGT t GGCCACG g	175
consensus	* *	
T. occidentalis	CTGAA a GAGAA a TT c GACGGTGCCACGGAGGTGGA	210
H. sapiens	CTGAAGGAGAAGTT G a tGGTGCC a C t GAGGTGGA	210
M. musculus	CT a AAGGAGAAGTT T G a cGGTGCC a CGGAGGTGGA	210
consensus	* *	

5. Resultados

T. occidentalis	GCCgCGCCGCGTGGGCTCCTCCCGcGCGCTGGTGC	245
H. sapiens	GCCACGCCGCGTGGGCTCCTCCaGGGCaCTGGTGC	245
M. musculus	GCCACGaCGCGTaGGCTCCTCCCGGGCGCTGGTGC	245
consensus	* *	
T. occidentalis	CgCGCAACG	254
H. sapiens	CaCGCAACG	254
M. musculus	CtCGgAAtG	254
consensus	* * * * *	

Figura 5.39: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *WNT4* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 92 % con la secuencia de *Homo sapiens* y un 91 % con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

T. occidentalis	cCGGATTTGCCAGAGCCC	aCCTCCTCTGAACAGT	35
M. musculus	TGGATTTGCCAGAGCCC	tCCTCtTCTGAACAGT	35
H. sapiens	TGGATTTGCCAGAGCCT	gCtTCCTCTGAgCAaT	35
consensus			
T. occidentalis	ATCTCTGTGAAATGATGG	gGTGACCTACTCCAGC	70
M. musculus	AcCTtTGTGAAATGATGGAGTGACT	tTACTCCAGC	70
H. sapiens	ATCTCTGTGG	gAATGATGGAGTcACCTACTCCAGt	70
consensus			
T. occidentalis	GCCTGtCACCTGAGAAAGGCTAC	gTGtCTGCTGGG	105
M. musculus	GCCTGCCACCTGAGAAAGGC	cACCTGctTGCTGGG	105
H. sapiens	GCCTGCCACCTGAGAAAGGCTACCTGCCTGCTGGG		105
consensus			
T. occidentalis	CAGATCCATTGGATTAGCCTATGAGGGAAAG		136
M. musculus	CAGATCCATTGGATTAGCCTATGAGGGAAAG		136
H. sapiens	CAGATCtATTGGATTAGCCTATGAGGGAAAG		136
consensus			

Figura 5.40: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *FST* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 91% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 92% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

5. Resultados

En la gónada masculina, los niveles de transcrito del gen *RSPO1* son muy bajos durante todo el desarrollo. En la gónada XX, la expresión es muy baja en el primordio gonadal (s4c-s5a), pero a partir de s5b comienzan a aumentar progresivamente, siendo siempre mayor que en la XY ($1,010 \cdot 10^{-6} < p < 0,03652$). En los estadios s10-s11, alcanzan su máximo nivel en la corteza siendo mayores que en la médula ($p = 0.02626$), donde se mantienen en niveles constantes a los registrados anteriormente. En s12, esta expresión disminuye en la corteza, equiparándose a los niveles observados en la región medular (Figura 5.41).

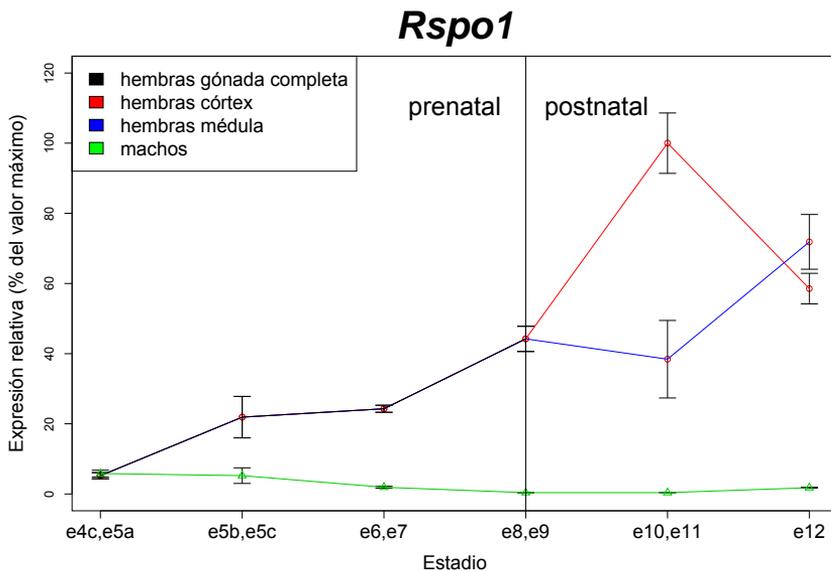


Figura 5.41: Estudio del patrón de expresión cuantitativo de *RSPO1* en gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. En la gónada masculina no se detecta expresión en ninguno de los estadios estudiados. En los estadios s4-s5a se observa que no hay expresión de *RSPO1*. Estos niveles van aumentando progresivamente a partir de s5b-s5c en la gónada femenina para alcanzar niveles máximos a partir de s10-s11 en la región cortical, descendiendo en el estadio s12. En la región medular, la expresión se mantiene en un nivel medio, aumentando posteriormente en s12.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

Los datos de RT-Q-PCR para *WNT4* muestran que se mantiene muy baja en la gónada XY durante todo el desarrollo. En la gónada XX, los niveles de transcrito son muy similares a los registrados en la gónada XY en estadios tempranos, pero a partir de s5b-5c son siempre mayores que los observados en la gónada masculina ($0.0005139 < p < 0.03074$). Durante los estadios s8-s9 aumentan drásticamente, alcanzando su máximo, en ambas regiones, en torno al estadio s10-s11 y disminuyendo a partir de s12.

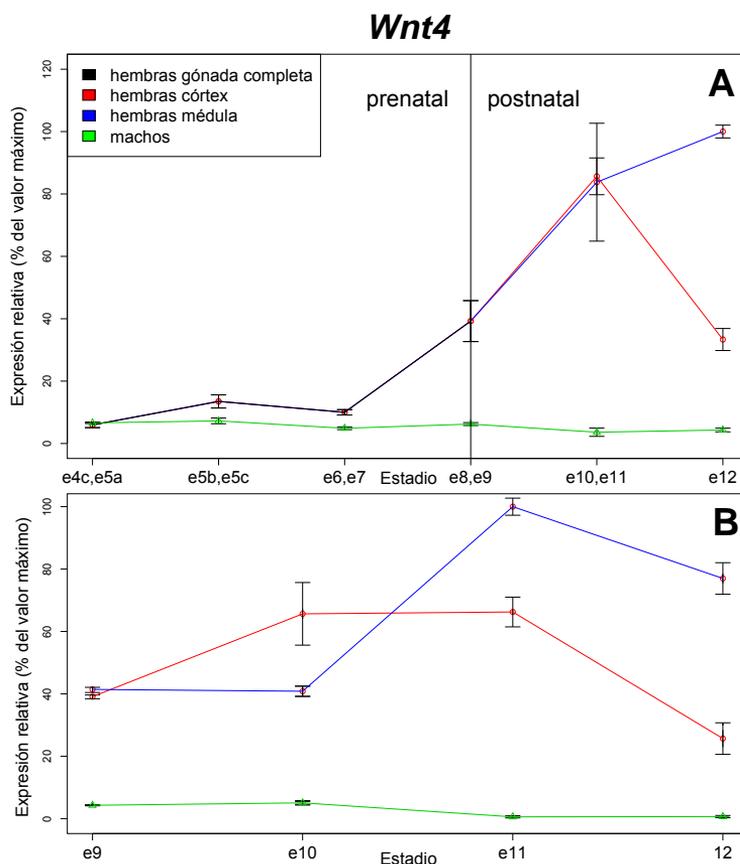


Figura 5.42: Estudio del patrón de expresión cuantitativo de *WNT4* en gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. En la gónada masculina no se detecta expresión en ninguno de los estadios estudiados (A). En los estadios s4-s5a se observa que no hay expresión de *WNT4* (A). En el resto de estadios prenatales los niveles en hembras son bajos, aunque levemente mayores que en machos. En s8-9 la expresión comienza a aumentar, alcanzando niveles máximos en el estadio s10-11 tanto en médula como en corteza (A). El estudio individualizado de los estadios postnatales muestra que tras el estadio s11, los niveles comienzan a decrecer en médula y corteza (B).

5. Resultados

El estudio de RT-Q-PCR muestra que en la gónada XY, la expresión de *FST* es muy baja durante todo el desarrollo, mientras que en el ovoteste, los niveles son nulos en estadios tempranos (s4c-s5a) y van aumentando progresivamente, siendo siempre mayores a los de la gónada masculina durante todo el desarrollo pre-natal ($4.876 \cdot 10^{-5} < p < 0.04566$). Tras el nacimiento (s9) los niveles se disparan en la región cortical hasta alcanzar su máximo en el estadio s10 y decreciendo progresivamente en estadios posteriores. Los valores registrados en este estadio son mucho mayores que los observados en la región medular ($p = 0.008407$) y la gónada masculina ($p = 0.008638$), en los que se registran valores similares.

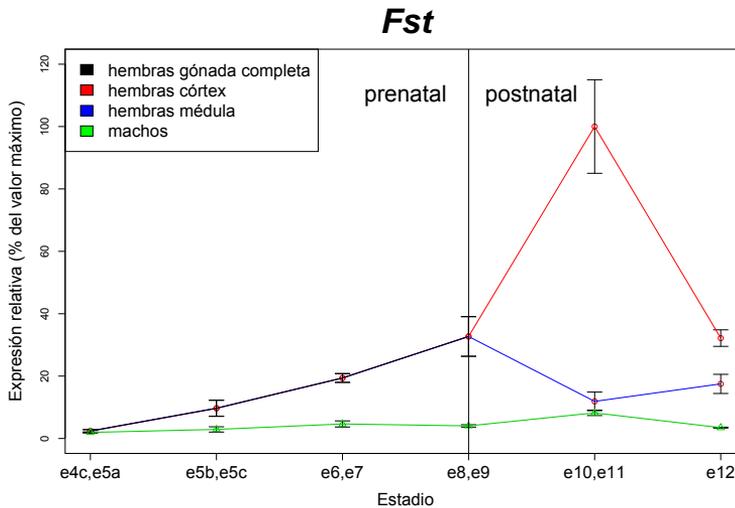


Figura 5.43: Estudio del patrón de expresión cuantitativo de FST en gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. En los estadios s4-s5a se observa que no hay expresión de FST. Estos niveles van aumentando progresivamente a partir de s5b-s5c en la gónada femenina y alcanzan niveles máximos a partir de s10-s11 en la región cortical, descendiendo en el estadio s12. En la región medular, la expresión se mantiene en un nivel bajo, similar al observado en machos.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

5.3.3. Genes de referencia RT-Q-PCR: *18S*, *GAPDH*, *GPI*

Diferentes fragmentos de los genes 18S, GAPDH y GPI fueron amplificados y secuenciados con el fin de obtener cebadores específicos para normalizar los datos obtenidos mediante RT-Q-PCR del resto de genes (Figuras 5.44, 5.45 y 5.46).

T. occidentalis	GGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCC	35
H. sapiens	GGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCC	35
M. musculus	GGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCC	35
consensus	*****	
T. occidentalis	GACGGGCGCcGACCCCCTTTCC..GGGGGGGAcGC	68
H. sapiens	GACGGGCGCTGACCCCCTTcgC..GGGGGGGATGC	68
M. musculus	GACGGGCGCTGACCCCcTTCCcgGGGGGGGATGC	70
consensus	*****	
T. occidentalis	GTGCATTTATCAGATCAAAACCAACCCGGTCAGCC	103
H. sapiens	GTGCATTTATCAGATCAAAACCAACCCGGTCAGCC	103
M. musculus	GTGCATTTATCAGATCAAAACCAACCCGGTgAGCt	105
consensus	*****	
T. occidentalis	ttCgTCCGGCTtCCGGCCGGGcGgtGGGCGCCGGC	138
H. sapiens	CctcTCCGGCc.CCGGCCGGGGGGCGGGCGCCGGC	137
M. musculus	CCCtcCCGGCT.CCGGCCGGGGgtCGGCGCCGGC	139
consensus	*****	
T. occidentalis	GGCTTTGGTGACTCTAGATAACCTCGGGCCGATCG	173
H. sapiens	GGCTTTGGTGACTCTAGATAACCTCGGGCCGATCG	172
M. musculus	GGCTT.GGTGACTCTAGATAACCTCGGGCCGATCG	173
consensus	*****	
T. occidentalis	CACGCCCCCGTGGCGGCGACGACCCATTGGAACG	208
H. sapiens	CACGCCCCCGTGGCGGCGACGACCCATTGGAACG	207
M. musculus	CACGCCCCCGTGGCGGCGACGACCCATTGGAACG	208
consensus	*****	

5. Resultados

T. occidentalis	TCTGCCCTATCAACTTTC	226
H. sapiens	TCTGCCCTATCAACTTTC	225
M. musculus	TCTGCCCTATCAACTTTC	226
consensus	*****	

Figura 5.44: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *18S* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 95% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 93% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

T. occidentalis	AAGCAGGCcTCacAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCT	35
H. sapiens	AAGCAGGCgTCgGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCT	35
M. musculus	AAGCAGGCaTCtGAGGGCCCactgAAGGGCATCtT	35
consensus	*****	
T. occidentalis	GGGCTACACcGAGGACCAGGTcGTgTCCTGCGAtT	70
H. sapiens	GGGCTACACTGAGcACCAGGTgGTCTCCTctGACT	70
M. musculus	GGGCTACACTGAGGACCAGGTtGTCTCCTGCGACT	70
consensus	*****	
T. occidentalis	TCAACAGtGACACCCAtTCCTctACCTTCGATGCT	105
H. sapiens	TCAACAGCGACACCCACTCCTCGACCTTtGAcGCT	105
M. musculus	TCAACAGCaActCCCActctTCCACCTTCGATGCc	105
consensus	*****	
T. occidentalis	GGGGCTGGCATcGCCCTCAATGACCACTTTGT	137
H. sapiens	GGGGCTGGCATTGCCCTCAAcGACCACTTTGT	137
M. musculus	GGGGCTGGCATTGctCTCAATGACaACTTTGT	137
consensus	*****	

Figura 5.45: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *GAPDH* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 88% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 86% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

5.3. Genes implicados en el desarrollo ovárico

T. occidentalis	TGCCCCCGTcCTGCTGGCTCTGCTGGGTgTCTGGT	35
H. sapiens	cGCCCCCGTctTGCTGGCcCTGCTGGGTATCTGGT	35
M. musculus	TGCCCCCGTcCTGCTGGCTCTaCTGGGcATCTGGT	35
consensus	*****	
T. occidentalis	ACATCAACTGCTTTGaGTcTGAGACgCACGCCATG	70
H. sapiens	ACATCAACTGCTTTGGGTGTGAGACaCACGCCATG	70
M. musculus	ACATCAACTGCTacGGcTGTGAGACcCACGCCtTG	70
consensus	*****	
T. occidentalis	CTGCCCTATGACCAGTACATGCACCGtTTTGCTGC	105
H. sapiens	CTGCCCTATGACCAGTAcTGCACCGCTTTGCTGC	105
M. musculus	CTGCCCTATGACCAGTACATGCACCGCTTTGCTGC	105
consensus	*****	
T. occidentalis	CTACTTCCAGCAGGGTGACATGGAGTCCAATGGGA	140
H. sapiens	gTACTTCCAGCAGGGcGACATGGAGTCCAATGGGA	140
M. musculus	CTAtTTCCAGCAGGGTGACATGGAGTCCAacGGaA	140
consensus	*****	
T. occidentalis	AGTACgTCACCAAGTCTGGcGCCCGcGTaGACCAC	175
H. sapiens	AaTACATCACCAAaTCTGGaaCCCCTGTGGACCAC	175
M. musculus	AGTACATCACCAAGTcGGgGCCCGTGTGGACCAC	175
consensus	*****	
T. occidentalis	CAGACgGGCCCCATTGTGTGGGGGAGCCAGGGAC	210
H. sapiens	CAGACAGGCCCCATTGTGTGGGGGAGCCAGGGAC	210
M. musculus	CAGACAGGCCCCATcGTGTGGGGGAaCCAGGGAC	210
consensus	*****	
T. occidentalis	CAATGGCCAGCATGCcTTCTACCA	234
H. sapiens	CAATGGCCAGCATGctTTtTACCA	234
M. musculus	CAATGGtCAaCATGCaTTCTACCA	234
consensus	*****	

Figura 5.46: Comparación de secuencias nucleotídicas de un fragmento del gen *GPI* de *T. occidentalis*, *Homo sapiens* y *Mus musculus*. El fragmento de topo comparte una homología del 92% con la secuencia de *Homo sapiens* y un 90% con la secuencia de *Mus musculus*. Los bloques rojos con * indican coincidencia en la secuencia consenso, mientras que las diferencias están representadas con distintas tonalidades de rojo y verde.

5.4. Caracterización de las células de Leydig en *Talpa occidentalis*

La observación de cortes semifinos muestra que en machos juveniles, las células de Leydig son de tipo adulto ya que suelen ocupar los espacios intersticiales entre cordones de manera individualizada y presentan muy pocas gotas lipídicas (Figura 5.47 A, C). En hembras, estas células son de tipo fetal, ya que siempre se presentan en agrupaciones y muestran abundantes gotas lipídicas y son de mayor tamaño que las observadas en las células de Leydig adultas de los machos (Figura 5.47 B, D).

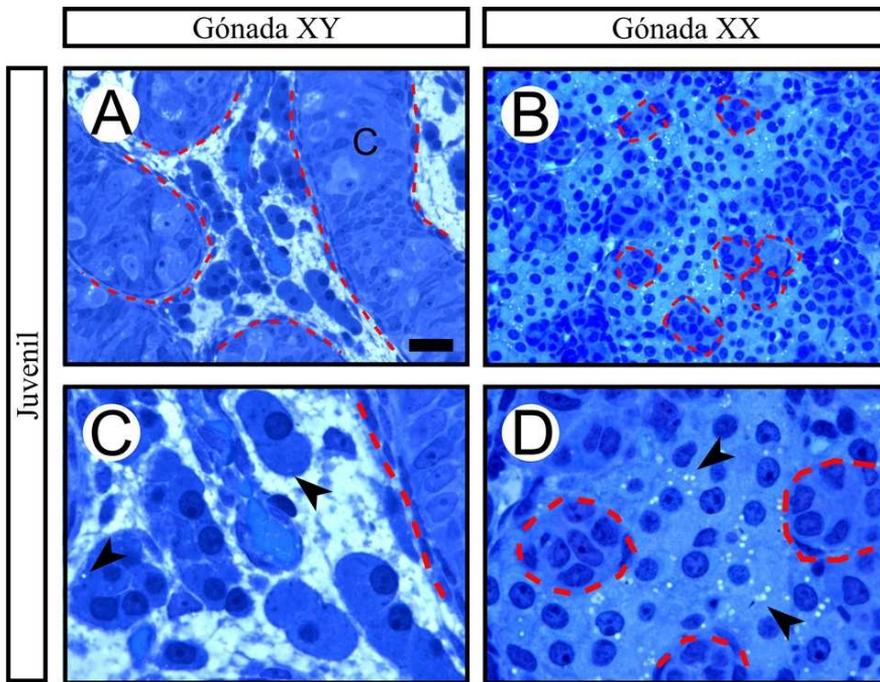


Figura 5.47: Caracterización de las células de Leydig en gónadas juveniles de *Talpa occidentalis* mediante la observación de cortes semifinos (A, B, C, D). En la gónada XY las células de Leydig se disponen en la periferia de los cordones de forma individualizada y contienen muy pocas gotas lipídicas (puntas de flecha) (A, C). En la gónada XX, las células de Leydig se disponen en agrupaciones y ocupan todo el espacio intersticial de manera compacta. Además presentan numerosas gotas lipídicas y de mayor tamaño que las observadas en la gónada XY (B, D). Las líneas discontinuas rojas delimitan cordones testiculares en la gónada XY y esférulas en la XX. Las puntas de flecha señalan gotas lipídicas. La barra de escala representa 20 μm en A y B, y 8 μm en C y D.

5.5. Diferenciación de células mioides peritubulares

5.5.1. Expresión de DES

En machos, la expresión de la desmina (DES) muestra un patrón difuso en la periferia de los cordones en todos los estadios estudiados. Esta expresión se localiza en el intersticio y alrededor de los cordones (Figura 5.48 A, C; Figura 5.49 A, D, G; Figura 5.50 A). A partir del estadio s10, esta expresión se concentra preferentemente en las células mioides que rodean los cordones, delimitando éstos perfectamente (Figura 5.50 B; Figura 5.51 A, B; Figura 5.52 A, B).

En los estadios s5b y s5c de la gónada femenina, la expresión se localiza también de manera difusa en la periferia de los cordones, en el tejido mesenquimático, asemejándose a la expresión observada en machos del mismo estadio (Figura 5.48 B, D) (Figura 5.49 B, E, H; Figura 5.50 C). A partir del estadio s10 se observa expresión alrededor de las esférulas en la médula, delimitandolas de una manera clara (Figura 5.50 D; Figura 5.51 C, D; Figura 5.52 C, D). La región cortical siempre muestra tinción positiva en los espacios intersticiales que separan los cordones. Durante la foliculogénesis, DES se dispone alrededor de los folículos, pero no en células foliculares (Figura 5.49 C, F, I; Figura 5.50 E, F, G, H; Figura 5.51 E, F, G, H; Figura 5.52 E, F, G, H).

5. Resultados

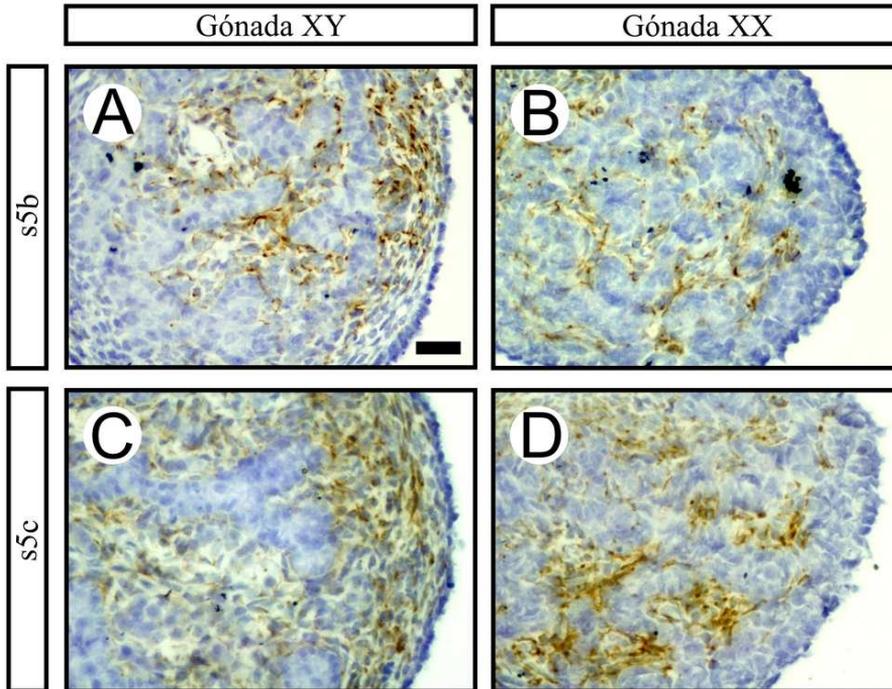


Figura 5.48: Detección de DES mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s5b (A, B) y s5c (C, D), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY DES muestra un patrón difuso en el intersticio en s5b(A) y s5c (C). En la gónada XX se detecta la proteína de manera difusa en el tejido mesenquimático que rodea a los cordones en los estadios s5b (B) y s5c (D). La barra de escala representa 20 μm .

5.5. Diferenciación de células mioides peritubulares

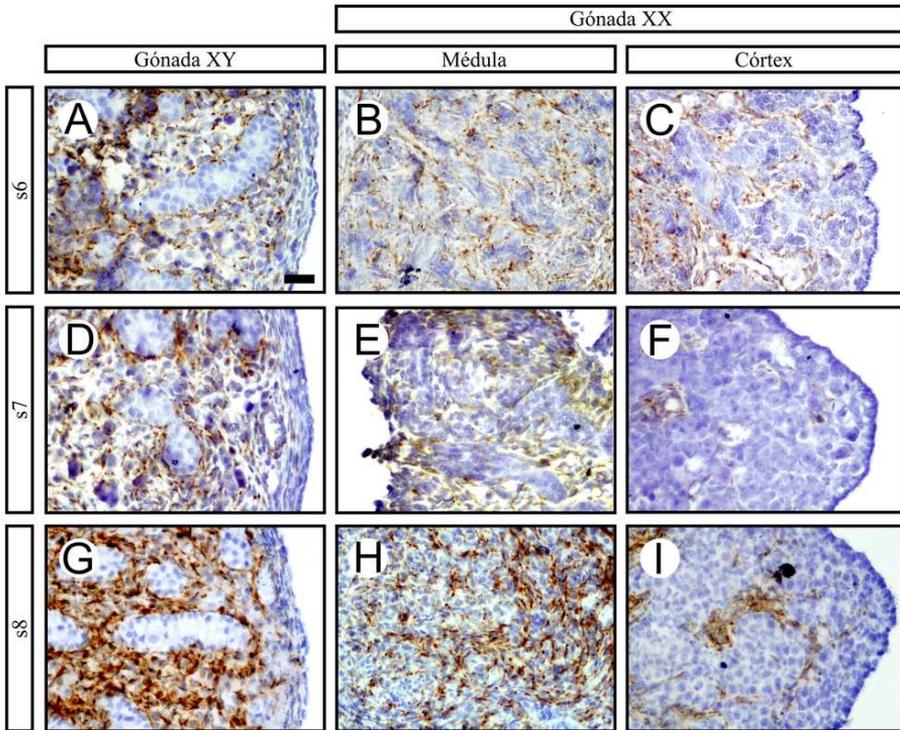


Figura 5.49: Detección de DES mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s6 (A, B, C), s7 (D, E, F) y s8 (G, H, I), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY DES muestra un patrón difuso en el intersticio en todos los estadios estudiados (A, D, G), acumulándose preferentemente en la periferia de los cordones y delimitando los mismos. En la gónada XX se detecta la proteína de manera difusa en el tejido mesenquimático que rodea a los cordones medulares en todos los estadios estudiados (B, E, H). En la región cortical se observa expresión en la periferia de los cordones corticales en todos los estadios estudiados (C, F, I). La barra de escala representa 20 μm .

5. Resultados

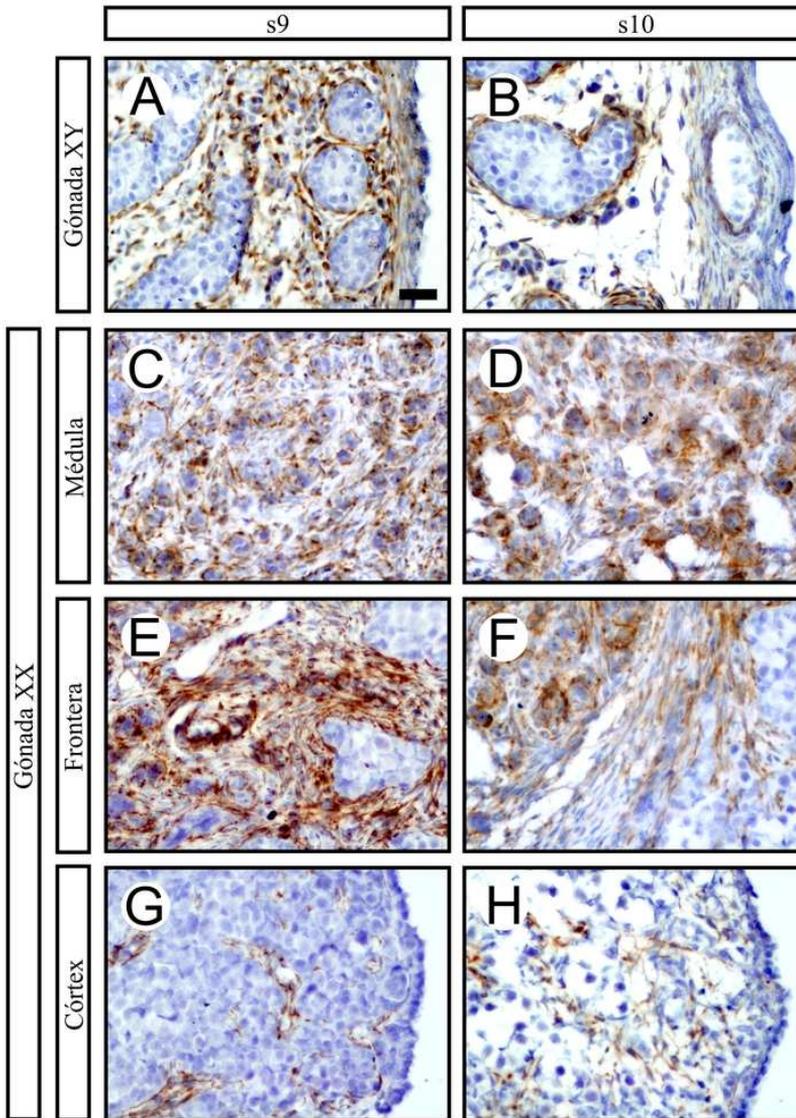


Figura 5.50: Detección de DES mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s9 (A, C, E, G) y s10 (B, D, F, H), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY DES muestra un patrón difuso en el intersticio en ambos estadios (A, B), acumulándose preferentemente en la periferia de los cordones y delimitando los mismos. En la gónada XX se detecta la proteína de manera difusa en el tejido mesenquimático que rodea a las esférulas en estos estadios (C, D), concentrándose en la periferia de éstos y delimitándolos. En la región frontera se observa un patrón difuso en todo el tejido mesenquimático en los estadios estudiados (E, F). En la región cortical se observa expresión en la periferia de los cordones corticales (G, H). La barra de escala representa 20 μm .

5.5. Diferenciación de células mioides peritubulares

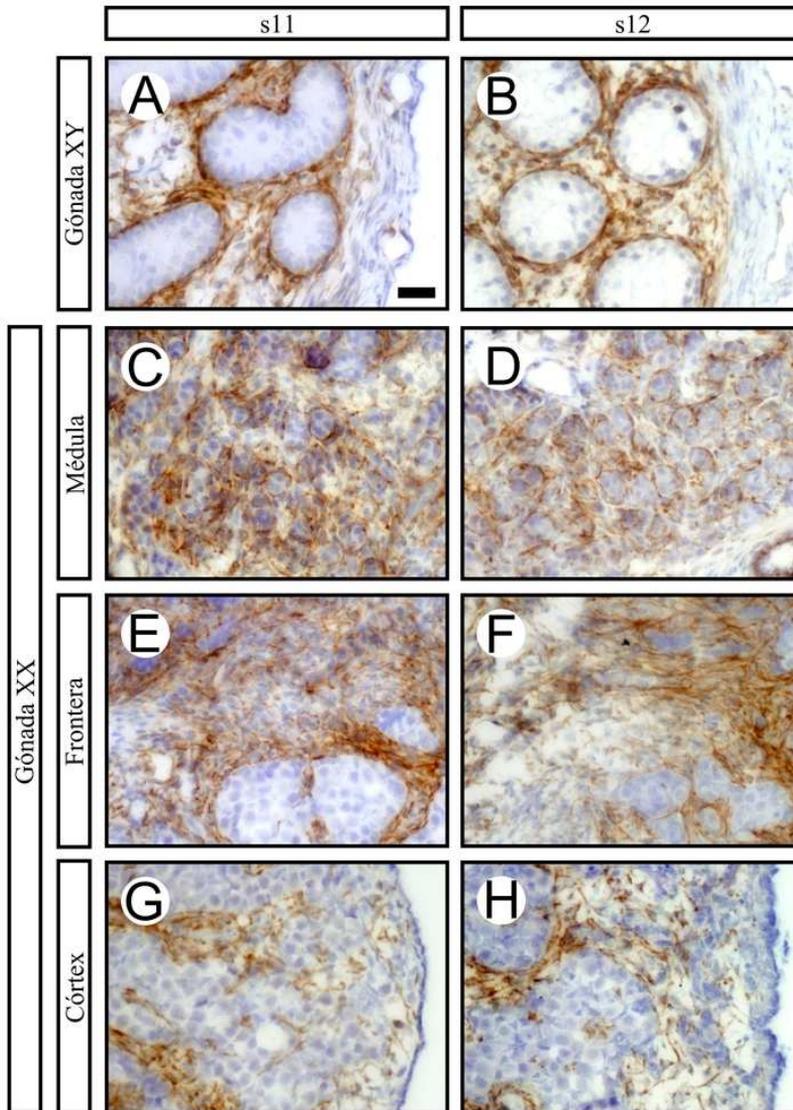


Figura 5.51: Detección de DES mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s11 (A, C, E, G) y s12 (B, D, F, H), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY DES muestra un patrón difuso en el intersticio en ambos estadios (A, B), acumulándose preferentemente en la periferia de los cordones y delimitando los mismos. En la gónada XX se detecta la proteína de manera difusa en el tejido mesenquimático que rodea a las esférulas medulares (C, D), concentrándose en la periferia de éstos y delimitándolos. En la región frontera se observa un patrón difuso en todo el tejido mesenquimático en estos estadios (E, F). En la región cortical se observa expresión en la periferia de los cordones corticales (G, H). La barra de escala representa 20 μm .

5. Resultados

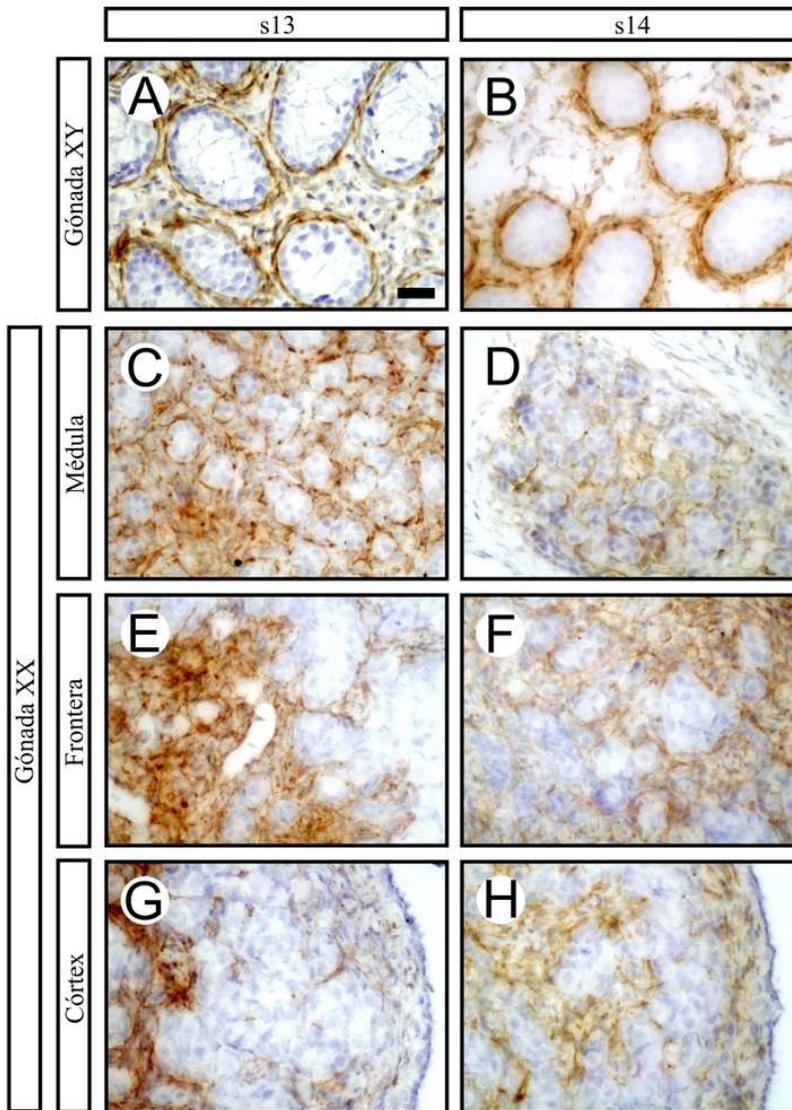


Figura 5.52: Detección de DES mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s13 (A, C, E, G) y s14 (B, D, F, H), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY DES muestra un patrón difuso en el intersticio en ambos estadios (A, B), acumulándose preferentemente en la periferia de los cordones y delimitando los mismos. En la gónada XX se detecta la proteína de manera difusa en el tejido mesenquimático que rodea a las esférulas medulares (C, D), concentrándose en la periferia de éstos y delimitándolos. En la región frontera se observa un patrón difuso en todo el tejido mesenquimático (E, F). En la región cortical se observa expresión en la periferia de los cordones corticales (G, H). La barra de escala representa 20 μm .

5.5.2. Expresión de α -SMA

La proteína α -SMA se detecta en el intersticio de la gónada s5b y s5c de los machos mostrando un patrón de expresión difuso (Figura 5.53 A, C). En el estadio s6 comienza a observarse, además de en el intersticio, en la periferia de la gónada, concretamente en la túnica albugínea en formación (Figura 5.53 E). Hasta s8, el patrón de expresión intersticial se muestra difuso (Figura 5.54 A, D), pero a partir del siguiente estadio, se concentra justo en la periferia de los cordones testiculares, en células mioides peritubulares, y en la túnica albugínea, que se encuentra totalmente formada (Figura 5.54 G). En posteriores estadios, lo único que se observa es un engrosamiento en la capa de células positivas en la túnica albugínea (Figura 5.55 A, D, G).

En la región medular de la gónada XX, sólo se observa α -SMA en vasos durante estadios tempranos (Figura 5.53 B, D, F; Figura 5.54 B, E). A partir de s9, se comienza a observar además en la túnica albugínea que se forma en la periferia de la región medular (Figura 5.54 H, Figura 5.55 B). Desde s11 en adelante, la expresión se localiza en las células mioides peritubulares que rodean a las esférulas medulares (Figura 5.55 E, H). En la corteza, además de en vasos sanguíneos, se detecta una leve expresión en las zonas intersticiales desde s5b (Figura 5.53 B, D, F) (Figura 5.54 C, F), aumentando su intensidad a partir de s9 en adelante (Figura 5.54 I; Figura 5.55 C, F). En s12, la expresión es bastante intensa, coincidiendo con la foliculogénesis (Figura 5.55 I).

5. Resultados

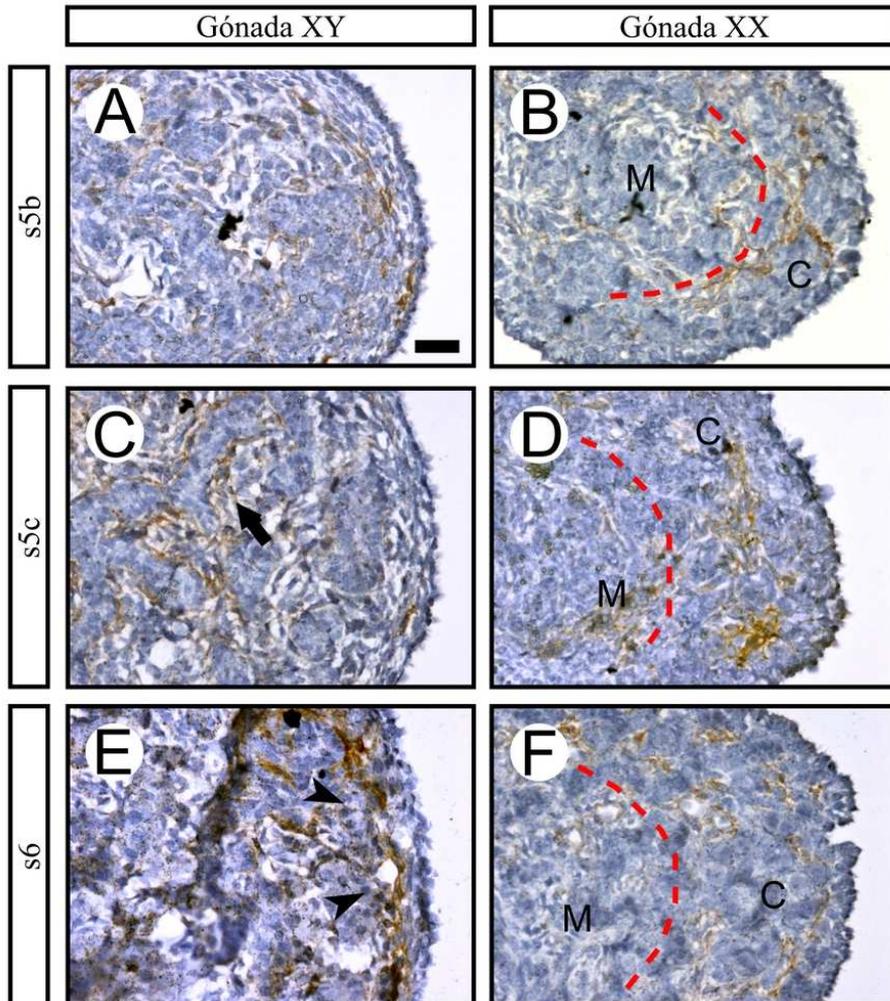


Figura 5.53: Detección de α -SMA mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s5b (A, B), s5c (C, D) y s6 (E, F), utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa una leve expresión rodeando los cordones testiculares en todos los estadios estudiados (A, C, E). Además en s6, se comienza a observar expresión en la túnica albugínea en formación (E). En la gónada XX se detecta la proteína de manera difusa en la región cortical. Las líneas discontinuas rojas delimitan la región cortical de la gónada femenina. Las flechas señalan cordones testiculares. Las puntas de flecha señalan la túnica albugínea. La barra de escala representa 20 μ m. (M) Médula; (C) Córtex.

5.5. Diferenciación de células mioides peritubulares

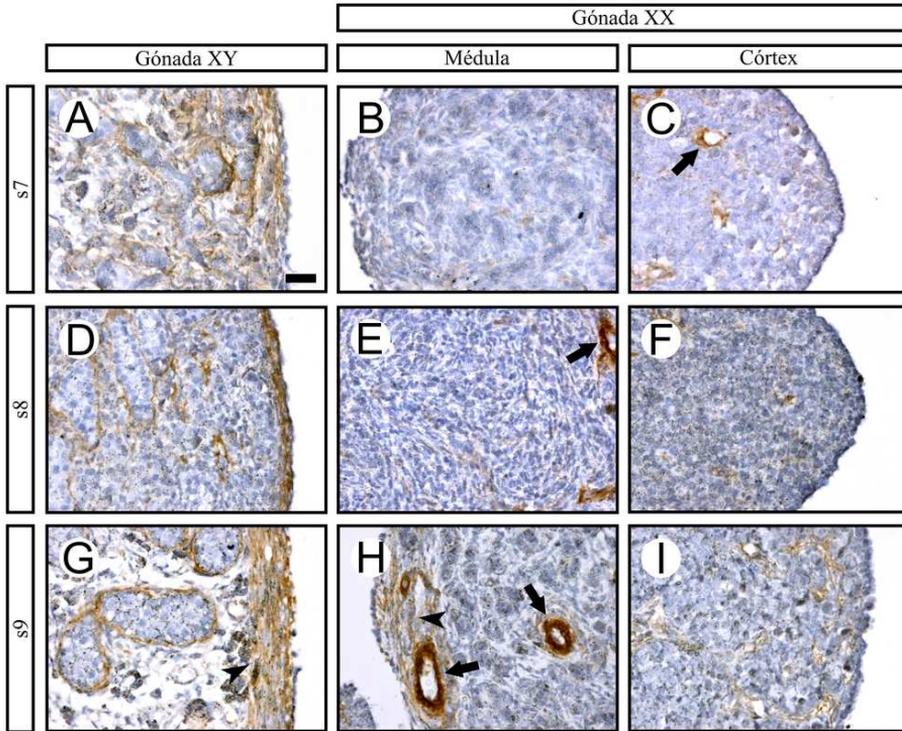


Figura 5.54: Detección de α -SMA mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s7 (A, B, C), s8 (D, E, F) y s9 (G, H, I) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa expresión en la túnica albugínea y en vasos sanguíneos de gran calibre en todos los estadios estudiados (A, D, G). En s7 (A) y s8 (D) se observa una expresión leve rodeando los cordones. Esta expresión se hace más intensa en s9 (G). En la región medular de la gónada XX sólo se observa expresión en vasos sanguíneos de gran calibre y a partir de s9 en la túnica albugínea en formación (B, E, F). En la región cortical se observa expresión en algunos vasos sanguíneos de gran calibre y de forma leve en los espacios que rodean grupos de células germinales en todos los estadios estudiados (C, F, I). Las puntas de flechas señalan la túnica albugínea. Las flechas señalan vasos sanguíneos. La barra de escala representa 20 μ m.

5. Resultados

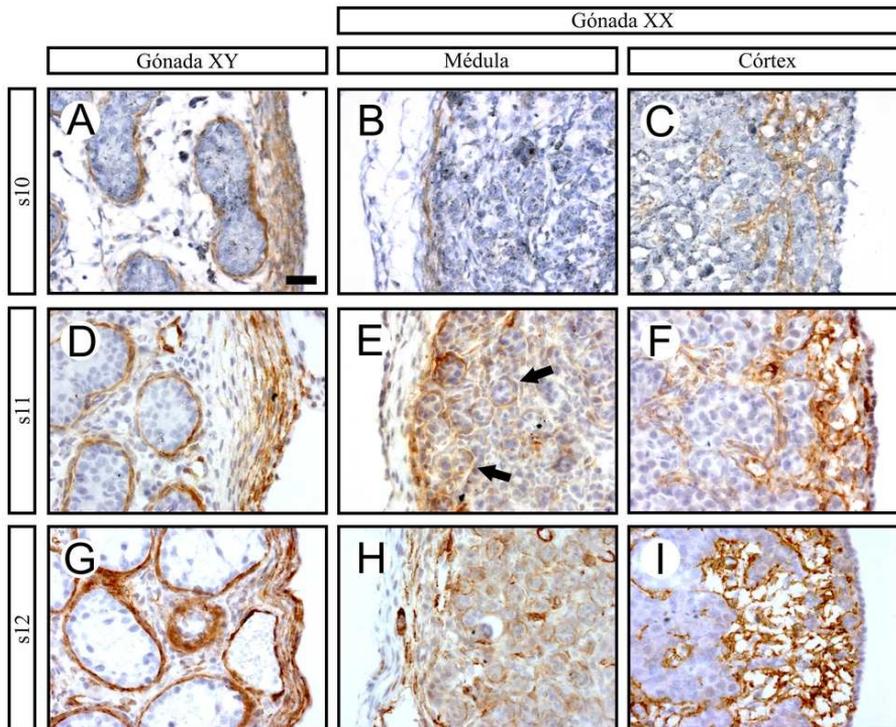


Figura 5.55: Detección de α -SMA mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas postnatales de *Talpa occidentalis* correspondientes a los estadios s10 (A, B, C), s11 (D, E, F) y s12 (G, H, I) utilizando diaminobenzidina (marrón). En la gónada XY se observa expresión alrededor de los cordones, en la túnica albugínea y en vasos sanguíneos de gran calibre en todos los estadios estudiados (A, D, G). En la región medular de la gónada XX se observa expresión en vasos sanguíneos de gran calibre y en la túnica albugínea en formación en todos los estadios estudiados (B, E, F). A partir de s11 se detecta la proteína rodeando las esférulas medulares (E, H). En la región cortical se observa expresión en algunos vasos sanguíneos de gran calibre y de forma muy intensa en el intersticio (C, F, I). Las flechas señalan esférulas medulares. La barra de escala representa 20 μ m.

5.6. Desarrollo vascular en la gónada

La vasculogénesis es un proceso que se encuentra influenciado por la naturaleza dimórfica de la gónada. Las hembras de la especie *Talpa occidentalis* presentan ovotestes bilaterales cuya porción testicular se desarrolla según un patrón de desarrollo gonadal masculino. Estudios macroscópicos sugieren que la vasculatura de este tejido testicular XX en topos es similar al que se observa en gónadas XY. Para el estudio de este proceso se analizaron cortes semifinos de gónadas de diferentes estadios del desarrollo en *Talpa occidentales*. También se analizó el patrón de expresión de CAV1 en gónadas de topo y ratón. Para analizar la formación del vaso celómico en topo se estudió la expresión de α -SMA, una proteína que se deposita en la pared de las arterias. Por último se visualizó el sistema vascular mediante perfusión *in toto* de animales pre y post-natales utilizando una solución de contraste y aclarando el órgano posteriormente.

5.6.1. Descripción morfológica

En la gónada XY no se observan vasos sanguíneos ni en s4c ni en s5a (Figura 5.56 A). En algunos individuos se ven capilares en la región frontera entre gónada y mesonefros. En s5b, la región homóloga de la zona cortical se encuentra separada de la región medular por vasos sanguíneos (Figura 5.56 B). En la frontera entre mesonefros y gónada hay capilares bastante grandes y muchos penetran por los septos mesenquimáticos en el testículo. En el tejido intersticial también se observan pequeños capilares. Durante los estadios s5c y s6, se observan vasos cerca de la periferia de la gónada (Figura 5.56 C), en lo que será la túnica albugínea, además de vasos ocupando el intersticio. En s7, s8 y s9, encontramos vasos de tamaño mediano-pequeño repartidos por toda la gónada, aunque los de mayor calibre se encuentran debajo de la túnica albugínea, que se encuentra bastante bien formada. En el estadio s10 hay grandes vasos imbricados en la túnica albugínea. En el tejido intersticial se comienzan a observar arterias en formación en las que la capa muscular se encuentra muy poco desarrollada y el calibre es pequeño. En s11, el tejido intersticial presenta un mayor número de arterias imbricadas en la túnica albugínea (Figura 5.56 E). Hay también grandes venas, principalmente en el seno de la túnica albugínea. Algunas pueden considerarse senos venosos, debido a su calibre (Figura 5.56 F). Este patrón continúa de manera similar en posteriores estadios. A partir de s14, las grandes arterias se localizan justo debajo de la túnica albugínea mientras que las intersticiales son de menor calibre.

En la gónada XX, al igual que en la XY, no se observa ningún signo de desarrollo vascular gonadal ni en s4c ni en s5a. El septo que separa la región medular de la cortical no contiene células sanguíneas, lo que implica que no se trata de un vaso sanguíneo. En el estadio s5b no se visualizan capilares en la región medular de la gónada femenina, en la que sí se observan

5. Resultados

cordones. Sin embargo, en la frontera entre córtex y médula sí hay capilares con eritrocitos ocupando la posición que tenía el septo de tejido laxo (Figura 5.57 A). Los capilares originan una red vascular en esta zona, formando una estructura análoga al vaso celómico observado en la gónada XY y que se describirá posteriormente. Durante los estadios s5c, s6 y s7, los vasos localizados en la frontera córtex-médula de la gónada XX son ahora de mayor calibre y numerosos y comienzan a aparecer algunos más pequeños en la médula, mientras que la corteza continúa desprovista de ellos (Figura 5.57 B). En s8 se siguen observando vasos grandes y abundantes en la región frontera y otros de discreto tamaño en la médula. Sin embargo, se ven por primera vez vasos en la región cortical, delimitando el córtex interno del externo (Figura 5.57 C). Probablemente estos vasos provienen de intrusiones de tejido mesenquimático que separa la región medular de la cortical.

Tras el nacimiento (s9), la región medular del ovoteste está provista de vasos sanguíneos discretos en el tejido intersticial, mientras que hay grandes vasos justo debajo de la incipiente túnica albugínea (Figura 5.56 D), además de grandes vasos adheridos a la zona externa de ésta y que probablemente ya existían en el mesonefros. La región frontera con la región cortical es muy poco extensa por lo que no contiene grandes vasos. Por el contrario, el córtex profundo contiene extensas áreas de tejido mesenquimático muy vascularizado. Por primera vez, el córtex externo contiene abundante mesénquima que está igualmente vascularizado, aunque estos vasos, nunca se aproximan al epitelio celómico. En s11 aparecen arterias de mayor calibre que en estadios anteriores en la región medular del ovoteste. Los capilares de la región cortical son más numerosos y de mayor calibre, siendo muy abundantes en la frontera córtex-medula. Algunas arterias se proyectan desde la región medular hacia la frontera, pero sin llegar a penetrar en el córtex. Alrededor de la región testicular se forman grandes senos venosos (Figura 5.57 D). En el estadio s13, la región medular de la gónada femenina presenta arterias de calibre bastante superior a las observadas en estadios previos. En la porción ovárica se observan diversos tipos de vasos pero no arterias. En s14 y s15, la región testicular del ovoteste no presenta grandes espacios de mesénquima, por lo que los vasos sanguíneos se encuentran inmersos en la masa de folículos primordiales que ocupa casi todo el tejido ovárico. La porción testicular contiene numerosas arterias de gran calibre, y los vasos y la mayoría de senos venosos continúan localizados bajo la túnica albugínea, aunque hay algunos intersticiales. Esta porción parece más vascularizada que en machos. En la región ovárica se comienzan a observar arterias (Figura 5.57 E).

5.6.2. Expresión de α -SMA

La proteína α -SMA se encuentra en células contráctiles de la pared de los vasos sanguíneos, por lo tanto es un marcador idóneo para el estudio de la formación del vaso celómico en *Talpa occidentalis*.

5.6. Desarrollo vascular en la gónada

En el estadio s5b y anteriores no se observa ninguna señal positiva en la zona donde debería ubicarse el incipiente vaso celómico (Figura 5.56 G). En los estadios s5c y s6 comienza a detectarse una expresión moderada de α -SMA (Figura 5.56 H-I) En estadios posteriores, la expresión se hace más fuerte y este vaso comienza a aumentar en grosor (Figura 5.56 J-O)

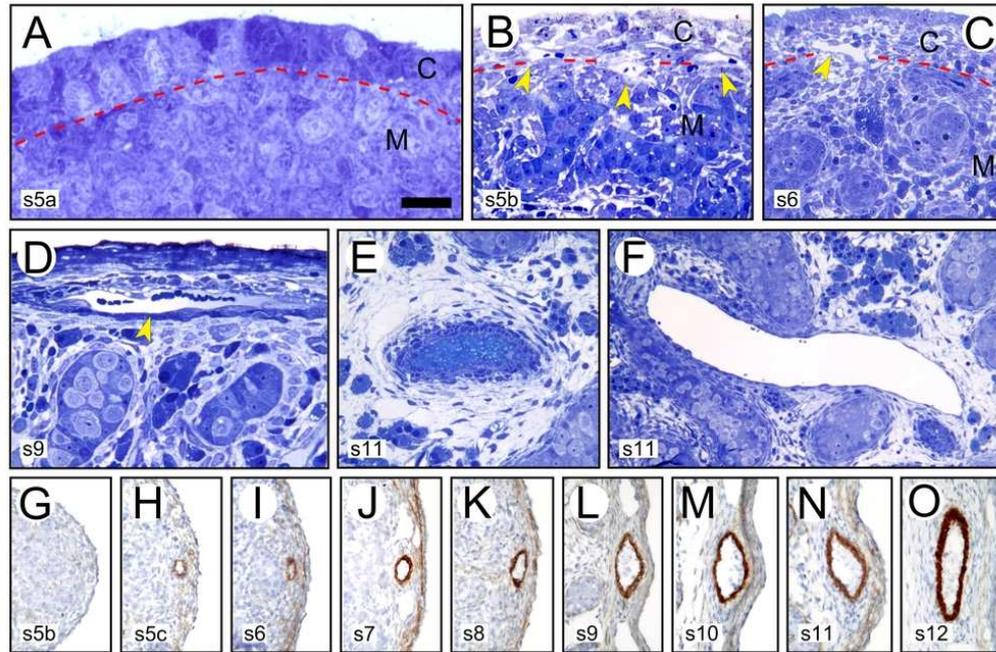


Figura 5.56: Desarrollo de la vasculatura en secciones transversales de gónadas XY embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*. Para este estudio se observaron cortes semifinos (A-F) y se detectó la proteína SMA en cortes transversales de parafina utilizando diaminobenzidina (marrón) (G-O). En s5a (A) no se observan vasos en toda la gónada. En s5b (B) se observan capilares en la región frontera entre entre córtex y médula. En s6 (C) se observan vasos en la región frontera pero de mayor calibre. En s9 (D) aparecen grandes vasos debajo de la túnica albugínea en formación. En s11 aparecen arterias de gran calibre en intersticio y túnica (E) y grandes venas, principalmente en el seno de la túnica albugínea (G). Formación del vaso celómico (G-O). Este vaso comienza a aparecer en e5c (H) y va aumentando progresivamente su calibre. La línea discontinua roja marca la frontera entre médula y córtex. Las puntas de flecha amarillas señalan capilares. La barra de escala representa 15 μm en A, 35 μm en B, 40 μm en C, 28 μm en D, 37 en E, 28 en F y 60 μm en G-O. (M) Médula; (C) Córtex.

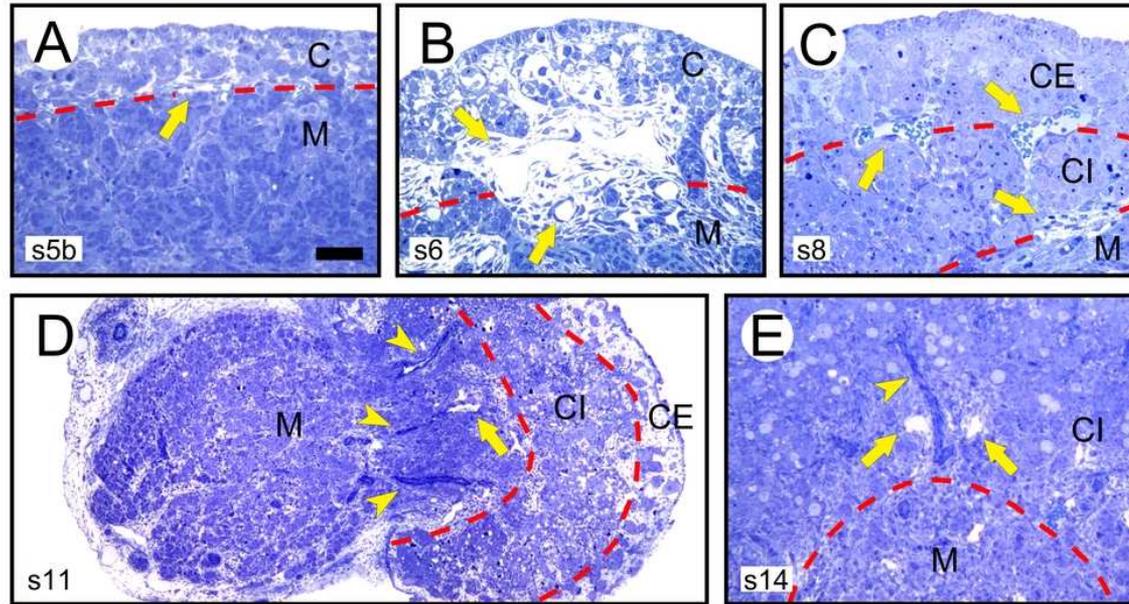


Figura 5.57: Desarrollo de la vasculatura en secciones transversales de gónadas XX embrionarias y postnatales de *Talpa occidentalis*, mediante la observación de cortes semifinos. En s5b (A) se observan capilares en la región frontera entre córtex y médula (línea discontinua) . En s6 (B) se observan vasos en la región frontera pero de mayor calibre y aparecen algunos capilares pequeños en la médula. En s8 (C) aparecen grandes vasos en las regiones frontera entre médula y córtex y entre córtex interno y externo (líneas discontinuas). En s11 aparecen arterias de gran calibre en la región medular adyacente al córtex (puntas de flecha) (E) y grandes venas, principalmente en región medular (G). Las puntas de flecha señalan capilares. La línea discontinua roja marca la frontera entre médula y córtex y entre córtex y córtex externo. Las puntas de flecha amarillas señalan capilares. Las flechas amarillas señalan arterias. La barra de escala representa $40 \mu\text{m}$ en A-C, $140 \mu\text{m}$ en D y $77 \mu\text{m}$ en E. (M) Médula; (C) Córtex; (CI) Córtex interno; (CE) Córtex externo

5. Resultados

5.6.3. Expresión de CAV1

En el primordio gonadal masculino (s4c), no se observa expresión de CAV1, ni tampoco en el estadio s5a (Figura 5.58 A). En el estadio s5b, CAV1 se expresa principalmente en células de la frontera mesonefros-gónada, aunque también aparece en células intersticiales dispersas de la región medular. También se observa expresión en la corteza, en donde se formará la túnica albugínea (Figura 5.58 C). En s5c, la gónada XY muestra un patrón parecido al estadio anterior aunque ya se comienzan a distinguir algunos pequeños vasos positivos tanto en la periferia de la gónada como en el intersticio. En s7, se distinguen numerosas células endoteliales que forman vasos sanguíneos en el intersticio de toda la gónada (Figura 5.58 E). En la incipiente túnica albugínea se detectan numerosas células endoteliales aisladas mientras que otras forman parte de arterias y venas (Figura 5.58 G). En s9 el número de células endoteliales aisladas en la túnica albugínea se reduce drásticamente y se observa un gran número de vasos imbricados en ésta, además de en el intersticio. A partir de este estadio, el patrón de expresión de CAV1 no varía significativamente.

En hembras tampoco se detecta expresión en s4c. En el estadio s5a comienza a aparecer una expresión difusa en toda la gónada (Figura 5.58 B). En s5b se sigue observando una expresión difusa en la médula y otra expresión mas fuerte en la separación entre corteza y médula. En la corteza aparecen también células fuertemente positivas para CAV1 (Figura 5.58 D). En el estadio s5c se detecta expresión a lo largo de toda la corteza y asociada a células germinales, mientras que en la médula se observa una fuerte expresión de CAV1 en la periferia de los cordones. En s6, s7 y s8, la médula del ovoteste contiene células positivas para CAV1 en el intersticio y formando pequeños vasos. También se distinguen abundantes vasos positivos en la frontera médula-córtex. En la corteza se detecta una expresión de menor intensidad asociada a células germinales y observándose algún capilar aislado en la región cortical interna (Figura 5.58 F, H).

5.6. Desarrollo vascular en la gónada

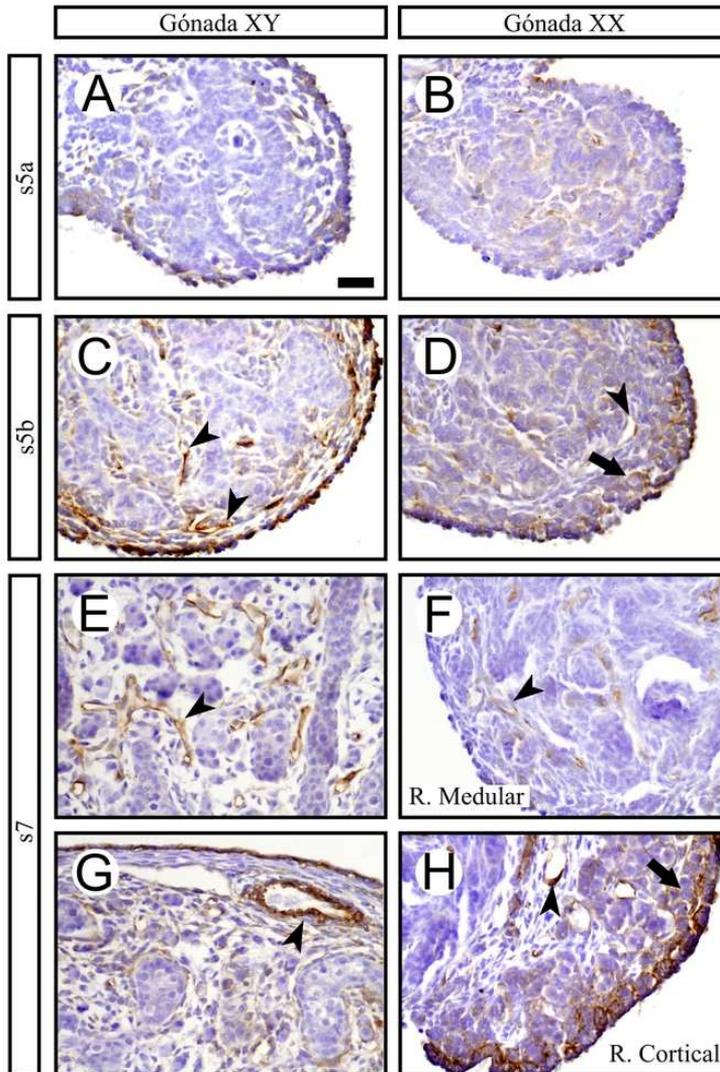


Figura 5.58: Detección de CAV1 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de *Talpa occidentalis*, utilizando diaminobenzidina (marrón). En el estadio s5a se detecta la proteína de manera difusa pero sin observarse vasos sanguíneos en ninguno de los dos sexos (A, B). En s5b se observan pequeños capilares tanto en el intersticio como en la zona periférica de la gónada XY (C). En la gónada XX se visualizan capilares en la zona que separa córtex y médula y expresión citoplasmática difusa en la corteza asociada a células germinales (flechas) (D). En s7, la gónada XY se observan vasos de tamaño mediano-pequeño en las zonas intersticiales (E), mientras que en la periferia se concentran los de mayor tamaño (G). En la gónada XX ya se observan vasos en la región medular (F) además de en la región frontera entre córtex y médula, y expresión en células germinales (H). Las puntas de flecha señalan vasos sanguíneos. Las flechas señalan células germinales. La barra de escala representa 20 μ m.

5. Resultados

En el estadio s9, la región medular de la gónada XX presenta algunos vasos fuertemente positivos en lo que será la túnica albugínea, además de numerosas venas y arterias en la zona intersticial (Figura 5.59 A, C). La zona cortical aparece positiva para células germinales con la presencia de algunas arterias y venas en el córtex interno (Figura 5.59 A, B). En s10, la región medular del ovoteste muestra numerosos vasos de diferente calibre en la túnica albugínea, así como en la *rete testis* y en el intersticio, mientras que la corteza sigue mostrando una expresión en células germinales. Este patrón de expresión persiste en los siguientes estadios, produciéndose únicamente una variación en el número y el calibre de los vasos.

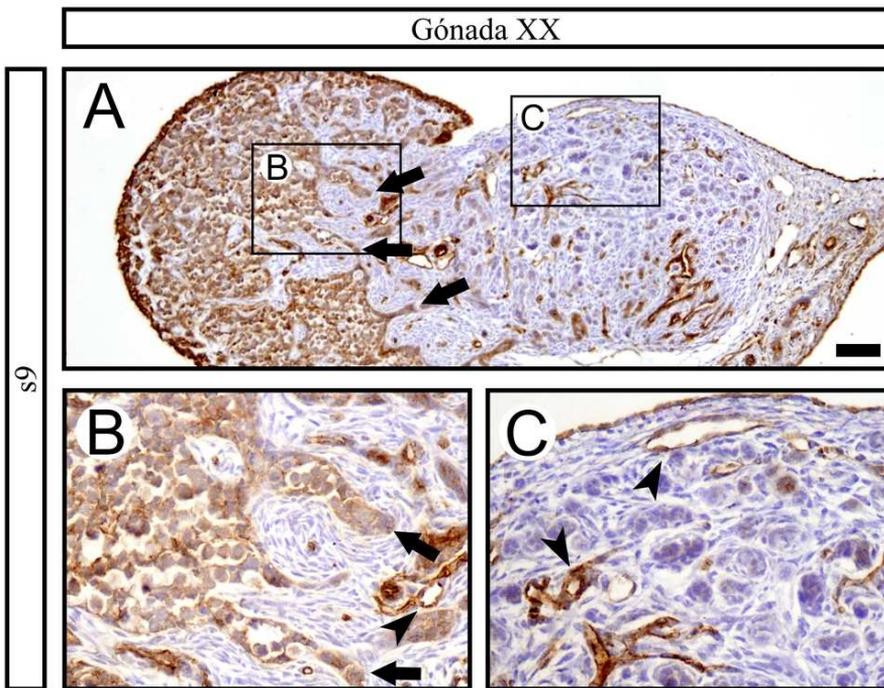


Figura 5.59: Detección de CAV1 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas XX del estadio s9 de *Talpa occidentalis*, utilizando diaminobenzidina (marrón). En la región cortical se observa como las células germinales muestran una intensa expresión citoplasmática (A, B). En ambas regiones se visualizan vasos de diferente tamaño (A, B, C). Las puntas de flecha señalan vasos sanguíneos. Las flechas señalan proyecciones de cordones corticales. La barra de escala representa 160 μm en A y 20 μm en B y C.

5.6. Desarrollo vascular en la gónada

Con el fin de investigar si el patrón de expresión de CAV1 observado en topo está conservado también en ratón, realizamos el correspondiente estudio inmunohistoquímico en esta especie. En las gónadas XY de ratón 12.5 dpc se observan células endoteliales que expresan CAV1 formando vasos tanto cerca de la corteza, como en el intersticio. Este patrón continúa en sucesivos estadios (Figura 5.60 A, C).

En el ovario de ratón en 12.5 dpc se observa una expresión fuerte en células endoteliales y otra algo más débil en células germinales. Este patrón persiste en estadios posteriores y hasta poco después del nacimiento (Figura 5.60 B, D)

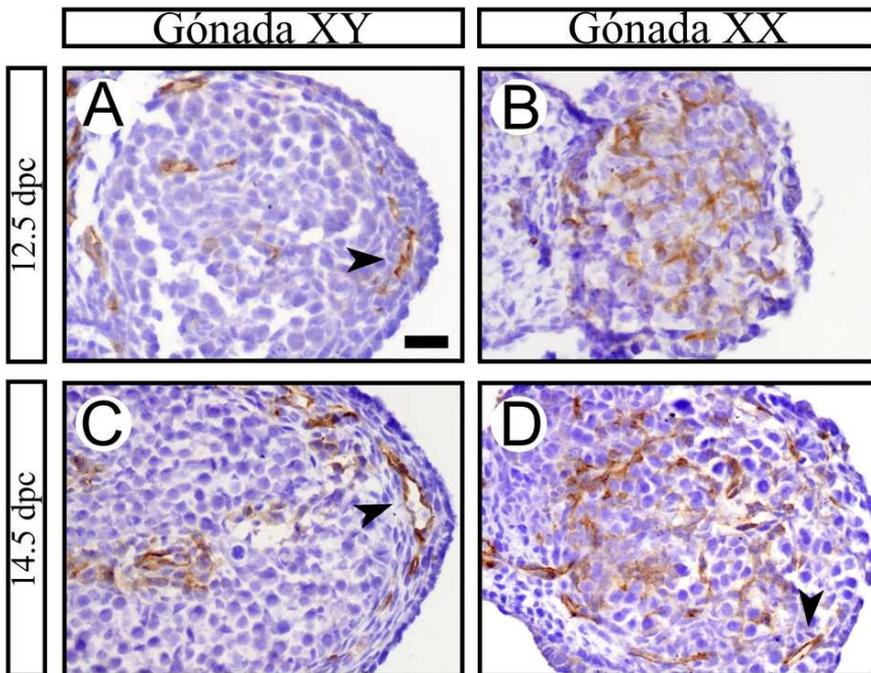


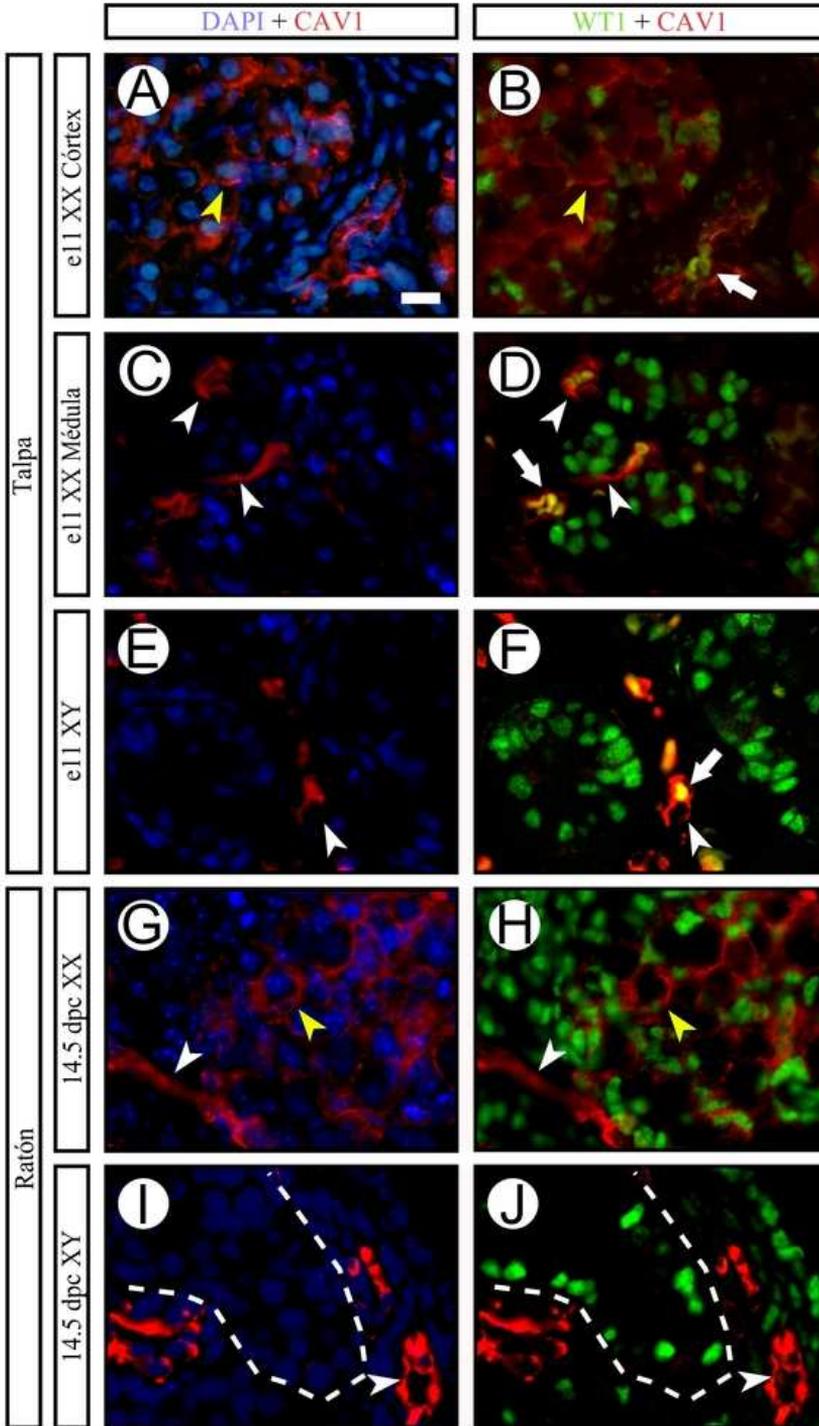
Figura 5.60: Detección de CAV1 mediante inmunohistoquímica en secciones transversales de gónadas embrionarias de ratón, utilizando diaminobenzidina (marrón). En gónadas XY de 12.5 y 14.5 dpc se detecta la proteína en vasos sanguíneos (A, C). En la gónada XX de 12.5 y 14.5 dpc, además de observarse expresión en vasos sanguíneos, también se observa una expresión difusa en la región central de la gónada (B, D). Las puntas de flecha señalan vasos sanguíneos. La barra de escala representa 20 μm .

5. Resultados

En la zona cortical del ovoteste de *Talpa occidentalis*, la expresión de CAV1 se restringe a células endoteliales y en menor intensidad en las células germinales, sin llegarse a apreciarse en otro tipo celular (Figura 5.61 A, B). En la región testicular del ovoteste y en la gónada masculina sólo se observa expresión en células endoteliales (Figura 5.61 C-F). Lo mismo ocurre en la gónada en desarrollo de ratón, encontrándose expresión en células endoteliales de ambos sexos además de células germinales en la gónada femenina (Figura 5.61 G-J).

Figura 5.61: Detección de WT1 (verde) y CAV1 (rojo) mediante inmunofluorescencia en secciones transversales de gónadas de *Talpa occidentalis* y ratón, utilizando DAPI (azul) para detectar los núcleos celulares. En la región cortical de la gónada XX del estadio s11 de *Talpa occidentalis* se observa fuerte expresión citoplasmática de CAV1 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (puntas de flecha blancas) y también algo más débil en células germinales (puntas de flecha amarillas). Las células somáticas corticales muestran expresión nuclear de WT1 (A, B). En la región medular de la gónada XX del estadio s11 de *Talpa occidentalis* se observa fuerte expresión citoplasmática de CAV1 en las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Las células somáticas de las esferulas testiculares muestran expresión nuclear de WT1 (C, D). En la gónada XY del estadio s11 de *Talpa occidentalis* se observa fuerte expresión citoplasmática de CAV1 en vasos sanguíneos, mientras que las células germinales aparecen negativas. Las células de Sertoli muestran expresión nuclear de WT1 (E, F). En la gónada XX de 14.5 dpc de ratón se observa fuerte expresión citoplasmática de CAV1 en vasos sanguíneos y también algo más débil en células germinales. Las células somáticas muestran expresión nuclear de WT1 (G, H). En la gónada XY de 14.5 dpc de ratón se observa fuerte expresión citoplasmática de CAV1 en vasos sanguíneos, mientras que las células germinales aparecen negativas. Las células de Sertoli muestran expresión nuclear de WT1 (I, J). Las puntas de flecha amarillas señalan células germinales. Las puntas de flecha blancas señalan vasos sanguíneos. Las flechas blancas señalan eritrocitos autofluorescentes. La línea discontinua en (J) marca el contorno de los cordones testiculares. La barra de escala representa 10 μm .

5.6. Desarrollo vascular en la gónada



5. Resultados

5.6.4. Visualización *whole-mount* de la gónada

La perfusión de la gónada con una solución de contraste y su posterior aclarado, permite una visión del sistema vascular completo del órgano.

En la gónada XY de ratón de 13.5 dpc se observa un alto grado de vascularización en toda la gónada, especialmente en la porción distal de la misma (Figura 5.62 A, C), donde se observa una red microvascular aplanada de la que surgen numerosas ramificaciones hacia el interior de la gónada, y que es el precursor del vaso celómico que se hará patente en estadios posteriores. En la gónada femenina se observa una vascularización menos profusa que no incluye la formación de un vaso celómico (Figura 5.62 B, D). El grado de vascularización del mesonefros es, sin embargo, similar en ambos sexos (Figura 5.62 A, D).

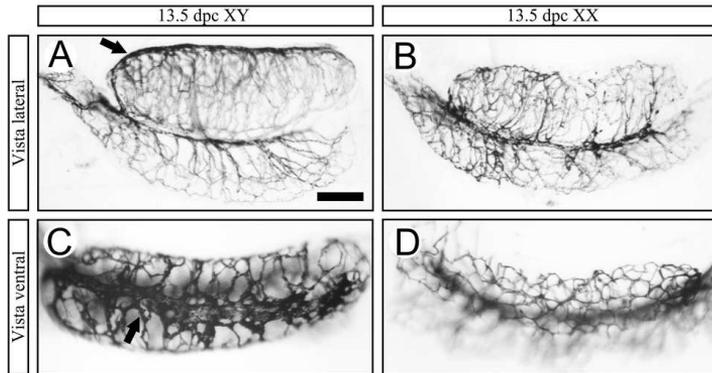


Figura 5.62: Visualización de la vasculatura en gónadas embrionarias de 13.5 dpc de ratón, mediante perfusión con tinta china. En la gónada XY se aprecia un alto grado de vascularización, especialmente en la porción distal (A), en donde se observa el vaso celómico (flecha) que aparece como una red vascular aplanada que recorre la gónada de un polo a otro (C). En la gónada XX se observa un grado de vascularización mucho menor que el observado en la gónada XY (B, D). Las flechas señalan el vaso celómico. La barra de escala representa 100 μm en A y B y 85 μm en C y D.

Los testículos de ratones 30 dpp muestran una compleja red vascular que ocupa toda la gónada, con numerosos vasos de mayor calibre en el interior de la misma. De entre ellos, el de mayor calibre es el vaso celómico, que recorre la gónada a lo largo de todo el epitelio celómico para, antes de llegar al otro polo, desviar su trayectoria hacia el interior de la gónada (Figura 5.63 A, B). En la gónada femenina se aprecia también una intensa vascularización sobre todo en la zona central del ovario. Asimismo se distinguen los folículos en la corteza, que presentan una menor vascularización que la zona medular (Figura 5.63 C).

5.6. Desarrollo vascular en la gónada

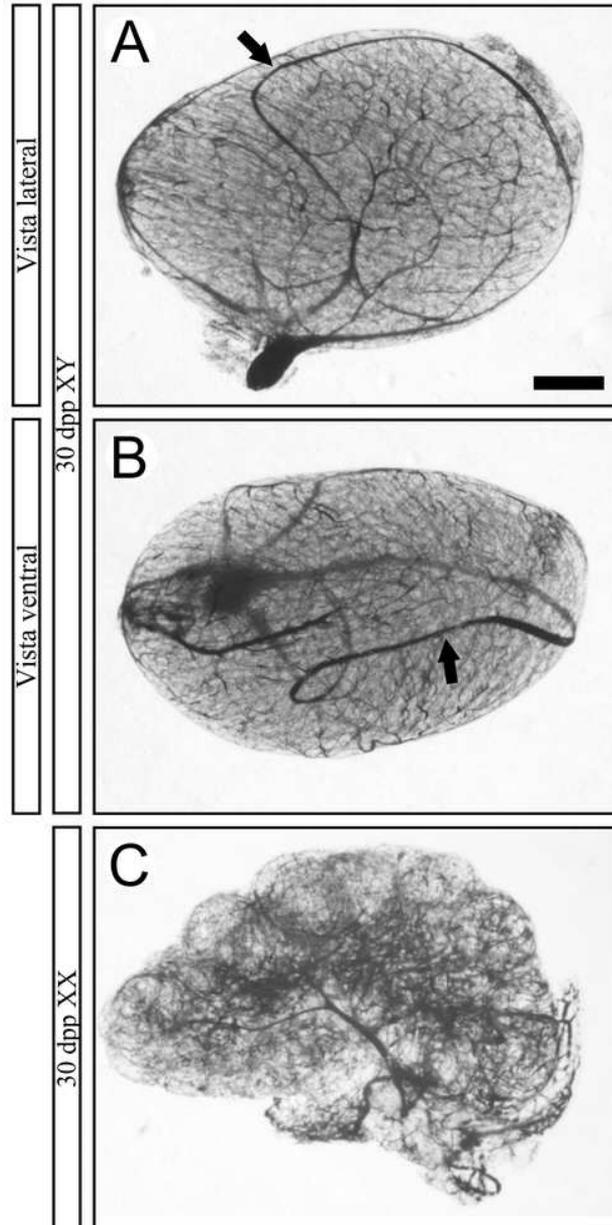


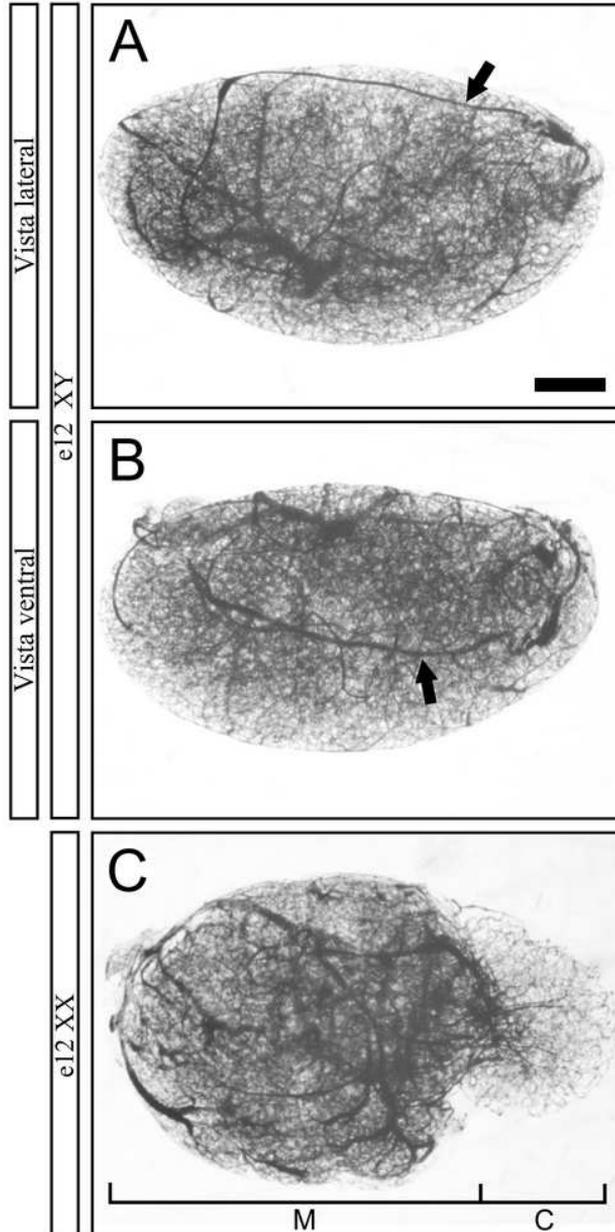
Figura 5.63: Visualización de la vasculatura en gónadas postnatales de 30 dpp de ratón, mediante perfusión con tinta china. En la gónada XY se aprecia un alto grado de vascularización. En la porción distal se visualiza un vaso de mayor calibre, identificado como el vaso celómico (flecha) que recorre la gónada a lo largo del epitelio celómico, desviándose hacia el interior de la gónada antes de llegar al otro polo (A, B). En la gónada XX se observa un alto grado de vascularización en la zona medular e identificándose los folículos en la zona periférica, los cuales presentan una menor vascularización (C). Las flechas señalan el vaso celómico. La barra de escala representa 1000 μm en A y B, y 370 μm en C.

5. Resultados

En topo del estadio 12, la gónada masculina muestra un patrón similar al observado en el testículo de ratón de 30 dpp, distinguiéndose el vaso celómico, que también desvía su trayectoria para introduciéndose en el interior de la gónada. En el ovoteste, la porción testicular muestra un nivel de vascularización similar al observado en el testículo, con vasos de gran calibre recorriendo la superficie (Figura 5.64 A, B). En la porción ovárica se observa un menor grado de vascularización que en la testicular (Figura 5.64 C).

Figura 5.64: Visualización de la vasculatura en gónadas postnatales del estadio s12 de *Talpa occidentalis*, mediante perfusión con tinta china. En la gónada XY se aprecia un alto grado de vascularización. En la porción distal se visualiza un vaso de mayor calibre, identificado como el vaso celómico (flecha) que recorre la gónada a lo largo del epitelio celómico, desviándose hacia el interior de la gónada antes de llegar al otro polo (A, B). En la gónada XX se observa que la región medular de la gónada presenta un alto grado de vascularización mientras que la región cortical aparece mucho menos vascularizada (C). Las flechas señalan el vaso celómico. La barra de escala representa 770 μm en A y B, y 430 μm en C. (M) Médula; (C) Córtex.

5.6. Desarrollo vascular en la gónada



5.7. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano

Los experimentos de migración celular realizados mediante marcaje de células mesonefricas con CFDA y su recombinación con gónadas en desarrollo mostraron que tanto en ratón como en topo, la gónada masculina sufre una invasión masiva de células procedentes del mesonefros durante el desarrollo temprano de la gónada. No obstante, la migración detectada en estos experimentos fue claramente más intensa en la gónada de ratón que en la de topo (Figura 5.65 A, C). En ambos casos, las células migrantes tienden a agruparse formando grupos compuestos por varias de ellas, que no se distinguen individualmente en las imágenes de microscopía confocal tomadas al aumento requerido para llevar a cabo este experimento. Este fenómeno fué especialmente intenso en el caso del ratón

En la gónada femenina de ratón se observan muy pocas células marcadas en el interior de la gónada (Figura 5.65 B), mientras que en la de topo migraron muchas más células en términos comparativos. No obstante esta migración nunca llega a ser tan abundante como la que se observa en la gónada masculina (Figura 5.65 D).

Debido a las diferencias cuantitativas existentes entre las gónadas masculinas de ambas especies se procedió a relativizar el número de células observadas en la gónada femenina con el número de células positivas en la masculina. Estas células muestran que la proporción entre el número de células migrantes en las gónadas XX y XY, fue 4,25 veces mayor en el caso del topo que en el del ratón. Por tanto, en términos relativos, en la gónada XX de topo entran 4,25 veces más células mesonefricas que en la de ratón.

5.7. Migración celular durante el desarrollo gonadal temprano

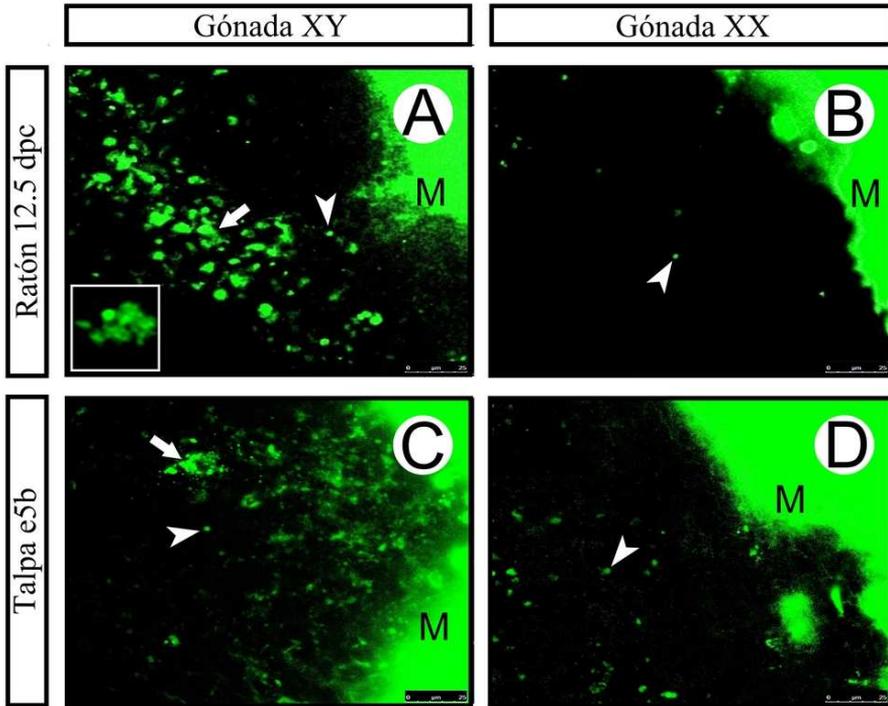


Figura 5.65: Migración de células mesonéfricas al interior de la gónada de ratón 12.5 dpc (A, B) y de topo s5b (C, D). Las células fueron marcadas con CFDA (verde). En la gónada XY de ratón 12.5 dpc (A) se observa una migración masiva de células desde el mesonefros. En la gónada XX de ratón 12.5 dpc (B) solamente unas pocas células han migrado al interior de la gónada. En la gónada XY de topo s5b (C) han migrado un gran número de células desde el mesonefros. En la gónada XX de topo s5b (D) se observa menor migración que en el macho pero mucha más que la que ocurre en la gónada XX de ratón. Las flechas blancas señalan agrupaciones de varias células. Las puntas de flecha blancas señalan células individuales. El cuadro insertado en la figura A muestra a mayor aumento uno de los grupos de células que han migrado al interior de la gónada XY de ratón. La barra de escala representa 25 μm en A-D y 6, 25 μm en el cuadro insertado. (M) Agregados de células mesonéfricas de ratón.

5. Resultados

6. Discusión

Contenidos

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular . . .	204
6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico	215
6.3. Diferenciación de células mioides peritubulares .	223
6.4. Formación de la vasculatura	224
6.5. Migración celular hacia la gónada desde el mesonefros	227

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular

-Los cambios en la expresión de *SOX9* y en los niveles de andrógenos marcan el final del desarrollo infantil en la gónada XY de *T. occidentalis*

Tal como ya se ha indicado anteriormente, *SOX9* es, aparte de *SRY*, el único gen necesario para iniciar la diferenciación testicular (Vidal *et al.*, 2001). Su inactivación en gónadas de ratones XY origina un desarrollo ovárico en lugar de testicular (Chaboissier *et al.*, 2004; Barrionuevo *et al.*, 2006), y su ablación tardía en ratones 14.0 dpc demuestra que es necesario asimismo para el mantenimiento de la espermatogénesis (Barrionuevo *et al.*, 2009). Estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación muestran que, contrariamente a los que ocurre en ratón, el gen *SOX9* de *T. occidentalis* inicia su expresión de forma muy temprana. Coincidiendo con la formación de la cresta genital en s4b, *SOX9* se detecta en la mayoría de las células medulares. Además, la presencia de AMH en estas células indica que la diferenciación de las células de Sertoli comienza en esta especie hasta dos días antes de que se formen los cordones testiculares (Carmona *et al.*, 2009a). Además, en topes adultos *SOX9* se expresa dependiendo del estadio espermatogénico y está sujeto a variaciones estacionales (Dadhich *et al.*, 2011). La intensidad de esta expresión es mayor en individuos sexualmente inactivos, tal como mostraron los estudios de RT-Q-PCR. Dadhich *et al.* (2010) también encontraron diferencias de expresión entre túbulos seminíferos, siendo los túbulos que se encontraban en los estadios I-VI los que mostraron mayor inmunoreactividad, y los que se encontraban en los estadios VII-X aquellos en que era menor, hecho que también se ha observado en ratón.

Nuestros resultados confirman los obtenidos mediante inmunofluorescencia en estadios tempranos del desarrollo de *T. occidentalis*. El estudio realizado mediante RT-Q-PCR en individuos en estadios pre- y post-natales muestra que la expresión de *SOX9* va aumentando a lo largo del desarrollo, alcanzando niveles muy elevados a partir de los estadios s11-12. El hecho de que los niveles altos de *SOX9* no se observen durante los primeros estadios de diferenciación testicular indican que no es necesario un elevado nivel de expresión para que ocurra la diferenciación sexual.

El incremento en los niveles de *SOX9* observado en topes juveniles puede relacionarse con los detectados en individuos adultos (Dadhich *et al.*, 2010), que son menores en los machos sexualmente activos. Por tanto, el aumento de los niveles de *SOX9* al final del periodo de desarrollo infantil (s11-12) podría considerarse como una transición desde un periodo de desarrollo testicular hacia otro en el que el testículo podría considerarse que entra en su primera etapa de inactividad como testículo adulto.

Aunque diversos estudios *in vitro* han indicado que los andrógenos son capaces de disminuir los niveles de transcrito de AR (Krongrad *et al.*, 1991; Wolf *et al.*, 1993; Yeap *et al.*, 1999), otros, han puesto de manifiesto un efecto de estabilización de la correspondiente proteína (Kemppainen *et al.*, 1992; Zhou

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular

et al., 1995). En coherencia con estos últimos, los estudios llevados a cabo en topo en nuestro laboratorio muestran una clara correlación positiva entre el aumento en los niveles de testosterona tanto sérica como intratesticular y los del AR (Dadhich, 2008). Ambos niveles son altos en machos sexualmente activos, bajando significativamente en los individuos inactivos. Por otra parte hemos descrito que los niveles de testosterona sérica permanecen muy altos durante los dos primeros estadios de desarrollo postnatal (s9 y 10), descendiendo notablemente en estadios posteriores (Zurita *et al.*, 2003). El hecho de que este descenso en los niveles de testosterona coincida en el tiempo con un aumento significativo en los niveles de *SOX9* sugiere que este último podría ser una consecuencia del citado descenso de andrógenos. Esta hipótesis es coherente con los resultados obtenidos en este trabajo en relación con la expresión del AR (Figura 5.22J; Figura 5.23A, D, G, J, M).

Éste aparece por primera vez en las células de Sertoli de los testículos infantiles justo después del nacimiento, mostrando una localización citoplasmática y coincidiendo con el último pico de producción de testosterona. En el estadio siguiente se observa claramente una localización nuclear de AR, lo que indica que las células de Sertoli se hacen sensibles a la testosterona después del nacimiento (s9-10), ya que el paso de la proteína al núcleo es un indicativo de que la célula está recibiendo de forma efectiva la señal endocrina (Wong *et al.*, 1993; Heemers and Tindall, 2007). Resultados similares se han descrito en otras especies (You and Sar, 1998; Rey *et al.*, 2009). Puesto que éstas células de Sertoli ya son sensibles a los niveles de andrógenos, nuestros resultados apuntan a una posible relación causa-efecto entre el descenso de los niveles de testosterona que tienen lugar entre s10 y 11 (Zurita *et al.*, 2003) y el incremento en la expresión de *SOX9* que hemos detectado inmediatamente después (s11-12). Esta idea es coherente con nuestras observaciones en testículos de topo adulto, a lo largo del ciclo reproductivo estacional de *T. occidentalis*, puesto que existe una clara correlación entre los niveles de testosterona y los niveles de *SOX9* en distintos estadios de este ciclo mencionado anteriormente (Dadhich, 2008; Dadhich *et al.*, 2011).

-SOX9 no participa en ninguno de los procesos de desarrollo de tejido testicular XX en T. occidentalis

En gónadas embrionarias XX de ratón no se detecta la presencia de *SOX9* debido a que éste queda inhibido como resultado de la expresión de diversos genes de la ruta ovárica a pesar de que en 11.5, momento en el que *SOX9* se comienza a expresar en machos, no hay ningún signo morfológico de desarrollo ovárico (Brennan and Capel, 2004). WNT4 es capaz de degradar la proteína *SOX9*, probablemente a través de β CAT (Akiyama *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran que en *T. occidentalis*, como ocurre en ratón, no se detecta proteína *SOX9* en la gónada femenina durante el desarrollo temprano (s4b-5c; (Carmona *et al.*, 2009b)). Durante el desarrollo gonadal XX de *T. occidentalis*, la región medular

6. Discusión

experimenta numerosos eventos propios del desarrollo testicular, tales como la diferenciación de células de Leydig, que expresan p450SCC y SF1, la diferenciación de células mioideas peritubulares, que expresan α -SMA (smooth muscle actin) y DES, la formación de un sistema vascular y una túnica albugínea muy similares a los observados en testículos y la migración celular desde el mesonefros adyacente (Jiménez *et al.*, 1993; Zurita *et al.*, 2003; Barrionuevo *et al.*, 2004b; Zurita *et al.*, 2007). Además, en la gónada XX se detecta la formación de cordones medulares en el estadio s5b, que es cuando aparecen los cordones testiculares en la gónada XY. No obstante, esta porción medular es disgenésica, ya que estos cordones medulares no dan lugar a verdaderos cordones testiculares durante el desarrollo posterior.

En ratón, la expresión de *Sry* inicia el desarrollo testicular provocando que determinadas células del primordio gonadal se diferencien como células de Sertoli (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991), las cuales dirigen la mayor parte de los procesos del desarrollo testicular (Magre and Jost, 1980; Swain and Lovell-Badge, 1999). La formación de cordones medulares es una característica específica del desarrollo testicular en ratón y depende de la migración de células procedentes del mesonefros (Merchant-Larios and Taketo, 1991; Capel *et al.*, 1999; Tilmann and Capel, 1999; Cool *et al.*, 2008). La formación de estos cordones testiculares en la gónada XX también se ha observado en mutantes *Wnt4*^{-/-} recién nacidos, donde se produce la activación de *Sox9* (Vainio *et al.*, 1999) o en ratones que sufren depleción de oocitos, produciéndose una transdiferenciación de células foliculares a células de Sertoli (Guigon *et al.*, 2005). En éste último caso, la aparición de los cordones se retrasa y ocurre sin que se produzca la activación de *Sox9*. En ratones mutantes Ods XX, que expresan *Sox9* de manera constitutiva, y en ratones transgénicos para este gen también, se ha descrito la formación de cordones testiculares entre 11,5 y 12,5 dpc (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001).

Puesto que durante el desarrollo prenatal temprano del ovoteste de *T. occidentalis*, la región medular sufre procesos específicos del desarrollo testicular, como la formación de cordones primarios, migración celular desde el mesonefros y diferenciación de células mioideas peritubulares y de Leydig, nuestros resultados muestran que la presencia de SOX9 no es necesaria para que estos eventos ocurran (Carmona *et al.*, 2009b). Además, las células de Leydig, la formación de la túnica albugínea y del sistema vascular de la gónada XX de topo se desarrollan en estadios prenatales tardíos y postnatales, por lo que era necesario comprobar *SOX9* permanecía inactivo también en estos estadios. Nuestros resultados muestran que los niveles de mRNA de este gen en la gónada XX son muy inferiores a los que se observan en gónadas XY. Asimismo, tampoco se detecta proteína SOX9 en ninguno de los estadios del desarrollo gonadal hasta la edad juvenil.

Como se ha indicado, los cordones medulares se forman en gónadas de topos de ambos sexos durante el estadio s5b (Barrionuevo *et al.*, 2004b; Carmona *et al.*, 2009a,b). Sin embargo, estos cordones originan túbulos seminíferos fértiles en los machos en presencia de SOX9, lo que no ocurre en las hembras donde

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular

este gen no se expresa, indicando que aunque SOX9 no es necesario para la formación inicial de los cordones, al menos en el topo, si lo es para su posterior mantenimiento.

-FGF9 se expresa muy temprano en el desarrollo de la gónada XY de *T. occidentalis*

En el primordio gonadal masculino, *FGF9* actúa como factor de crecimiento y mitógeno, siendo producido por células pre-Sertoli y estimulando la proliferación de células que ya expresan *Sf1* (SF1+) en el epitelio celómico. Esto deriva en un incremento en los precursores de células que expresan *SRY*, así como de otros tipos celulares (Schmahl *et al.*, 2004). En ausencia de *Sox9*, se observa un descenso en los niveles de *Fgf9*, lo que sugiere que *Fgf9* está situado aguas abajo de *Sox9*. Sin embargo, la ausencia de *Fgf9* no produce ningún efecto sobre *Sry* ni sobre la regulación que éste ejerce sobre *Sox9*, aunque sí afecta al mantenimiento de éste último después de que se produzca la determinación sexual, además de verse disminuidos marcadores sertolianos como *Amh* y *Dhh* (Kim *et al.*, 2006). Además, una activación ectópica de *FGF9* en gónadas XX in vitro origina un aumento en la expresión de *SOX9*, lo que sugiere que esta proteína podría tener un efecto positivo sobre la diferenciación de células de Sertoli. En estas gónadas también se detectan otros marcadores testiculares como *AMH* y *p450SCC* (Schmahl *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006). Sin embargo, a partir de los estudios realizados en ratón, no queda claro si el bucle de feedback positivo formado entre *Sox9* y *Fgf9* se mantiene en el tiempo y cuanto lo hace, puesto que en ratón sólo se han estudiado a este respecto la ventana temporal que incluye la determinación sexual (11.5-13.5 dpc).

Nuestros resultados en topo indican que los niveles de *FGF9* son muy altos en estadios tempranos del desarrollo testicular (s4c y 5a), lo cual es coherente con la presencia de altos niveles de *SOX9* y bajos de *WNT4* (Kim *et al.*, 2006), pero estos niveles caen bruscamente en el estadio s5b a niveles inferiores incluso a los observados en la gónada XX y siguen descendiendo en estadios posteriores. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que marcadores típicamente sertolianos durante el desarrollo, tales como *SOX9* y *AMH* se expresan desde los primeros momentos de la formación del primordio gonadal (s4b), adelantándose tres días a la formación de los cordones testiculares (en s5b), mientras que en ratón todos estos eventos ocurren en 24 horas (11.5-12.5 dpc). Esto indica que *FGF9* es necesario sólomente en los primeros estadios del proceso de determinación sexual y deja de serlo muy pronto. De hecho, en topo, la inactivación del gen ocurriría coincidiendo con la formación de los cordones testiculares en el estadio s5b. Puesto que se sabe que una función importante de *FGF9* en este periodo es contribuir al mantenimiento de *SOX9*, estableciendo un bucle de retroalimentación positivo (Kim *et al.*, 2006), la rápida inactivación de *FGF9* indica que esta función sólo es necesaria durante un breve periodo tras la activación de *SOX9*. Esto es coherente con la demostración de que en testículos de embriones de ratón de 15.5 dpc, la expresión de *Fgf9* ya no depende de la de *Sox9* (Barrionuevo *et al.*, 2009).

6. Discusión

Otra función importante de *FGF9* consiste en antagonizar la expresión de *WNT4* impidiendo así que se promueva el desarrollo ovárico en la gónada XY. En gónadas de ratones XY *Fgf9*^{-/-} se produce un aumento en los niveles de *Wnt4* y en gónadas XX cultivadas en presencia de proteína FGF9 exógena tiene lugar una disminución de *WNT4*, lo que demuestra que *FGF9* y *WNT4* actúan como antagonistas en la determinación sexual (Kim *et al.*, 2006). Por tanto, la rápida inactivación de *FGF9* en la gónada masculina de *T. occidentalis* indica que no es necesario mantener el antagonismo con *WNT4* más que en los primeros estadios del desarrollo testicular.

-FGF9 no es responsable del desarrollo testicular XX de *T. occidentalis*, pero podría tener un papel en la función ovárica

Se ha descrito que *FGF9* podría jugar un papel en la regulación de la función ovárica, ya que en rata se han detectado el mismo en ovario, además de observarse que es capaz de inducir la producción de progesterona en células de la granulosa in vitro (Drummond *et al.*, 2007). El perfil de expresión de este gen en la gónada XX de *T. occidentalis* se mantiene en niveles de medios durante todo el desarrollo prenatal, observándose una clara divergencia en los estadios postnatales, derivada principalmente de la inactivación casi completa que tiene lugar en la región medular, lo que no ocurre en la región cortical, donde se alcanzan los niveles más altos.

No se tiene información de cual podría ser la función de *FGF9* en el ovario prenatal de ratón o de otra especie de mamífero. Sin embargo existen datos que demuestran que este gen actúa como un regulador de la función ovárica durante el desarrollo postnatal de la gónada XX (Drummond *et al.*, 2007), estando implicado en la síntesis de progesterona, probablemente a través de la regulación de proteínas como p450SCC y STAR. En el caso de *T. occidentalis*, dado el carácter protesticular de *FGF9* durante el desarrollo embrionario de los machos se podría hipotetizar que este gen podría promover en el topo el desarrollo de ciertas estructuras típicamente testiculares en la región medular de la gónada XX. Sin embargo, el patrón de expresión observado en este trabajo permite descartar esta posibilidad ya que este desarrollo testicular XX del ovoteste, que incluye la diferenciación de células mioideas peritubulares, células de Leydig y un sistema vascular y una túnica albugínea de tipo testicular (Jiménez *et al.*, 1993; Zurita *et al.*, 2003; Barrionuevo *et al.*, 2004b; Zurita *et al.*, 2007), tiene lugar principalmente durante el desarrollo postnatal de la región medular, coincidiendo con la práctica inactivación total de *FGF9* en esta región gonadal. En los estadios prenatales de desarrollo, cuando los niveles de *FGF9* alcanzan niveles superiores a los anteriores, ninguno de estos eventos tiene lugar, permaneciendo la región medular prácticamente indiferenciada. Sin embargo, la región cortical muestra valores ascendentes en la expresión de *FGF9*, siendo máximos en el estadio s12, lo que podría indicar la participación de este gen, también en el topo, en la regulación de determinadas funciones del ovario juvenil y adulto.

-SF1 es el único marcador sertoliano detectado en la gónada XX de *T. occidentalis*

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular

SF1 es un gen implicado en la diferenciación sexual y el desarrollo gonadal y en la síntesis de esteroides (Ikeda *et al.*, 1993; Morohashi *et al.*, 1994; Barnhart and Mellon, 1994; Ingraham *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1994; Shinoda *et al.*, 1995). En vertebrados, *SF1* se expresa en el primordio gonadal masculino y femenino antes y durante la diferenciación sexual. Sin embargo se han encontrado diferencias interespecíficas en relación con su expresión en estadios posteriores. En ratón, aumenta en gónadas XY a partir de 11.5 dpc, disminuyendo en la gónada XX. En la gónada masculina, esta expresión se localiza en células de Leydig y de Sertoli (Ikeda *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1994). Sin embargo, en pollo o caimán, se han detectado altos niveles de *SF1* en la gónada femenina tras la diferenciación sexual (Smith y col., 1999b; Western y col., 2000). En *T. occidentalis* la expresión de *SF1* es normal en los testículos, observados en coincidencia con *SRY*, *SOX9* y *AMH* (Zurita *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2009a). Estos resultados son coherentes con el hecho de que *SF1* y *SRY* colaboran sinérgicamente para activar *SF1* en el primordio gonadal masculino (Sekido and Lovell-Badge, 2008).

En ratón el mantenimiento de esta expresión de *SF1* tras el periodo de determinación del sexo hace que este gen se considere como un marcador sertoliano (Ikeda *et al.*, 1994; Shen *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1994). De forma similar, en el topo se detecta expresión de la proteína *SF1* en la gónada temprana en ambos sexos, pero no se inactiva por completo en la gónada femenina tras la diferenciación gonadal. La expresión de *SF1* se mantiene en los cordones de la región medular en s5b, a niveles similares a los observados en la gónada XY. A partir de entonces, la expresión de *SF1* en esta región de la gónada XX es idéntica a la observada en los testículos de los machos: la expresión dentro de los cordones se mantiene alta hasta la diferenciación de las células de Leydig (s9-10) en que disminuye dentro de los cordones y aumenta en las células intersticiales. Estos datos indican, por tanto, que *SF1* es el único marcador del desarrollo testicular cuyo patrón de expresión está conservado en los ovotestes de *T. occidentalis*.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que *SF1* se encuentra en los cordones corticales, mientras que no está en células intersticiales. Esta expresión se mantiene durante todo el desarrollo prenatal y cesa alrededor del nacimiento (s9). Este patrón temporal de expresión difiere de lo observado en ratón, puesto que el descenso en la expresión de *Sf1* en la gónada XX ocurre en embriones 11.5 dpc, 10 días antes del nacimiento. Sin embargo, esta controversia sólo es aparente, puesto que en ambos casos, este descenso ocurre justo antes del inicio de la meiosis por parte de las células germinales que en ratón ocurre en 13.5 dpc (8 días antes del nacimiento) (Menke *et al.*, 2003), mientras que en topo se inicia en s9 (justo tras el nacimiento) (Zurita *et al.*, 2007). Por tanto, el patrón de expresión de *SF1* durante el desarrollo ovárico de ratón y de topo no es significativamente diferente.

-Los patrones de expresión de DHH y PTGDS en testículos de topo sugieren su implicación en la formación de los cordones testiculares.

6. Discusión

En ratón, *Dhh* comienza a expresarse en células de Sertoli poco tiempo después de la detección de *Sry* (Bitgood *et al.*, 1996), expresión que continúa hasta la edad adulta. Los testículos de ratones prepuberales y adultos mutantes para *Dhh* mostraban un fenotipo en el que podían observarse bien signos de masculinización o bien características de feminización. En ambos casos, se observaba en estas gónadas un tejido peritubular anormal y graves defectos en la espermatogénesis. Los testículos de individuos adultos carecían de células de Leydig de tipo adulto, la lámina basal se encontraba además repartida irregularmente y mostraban defectos en células peritubulares (Clark *et al.*, 2000). De forma similar, se ha demostrado que *PTGDS* también es necesario para la correcta formación de los cordones testiculares en ratones mutantes, ya que algunos de ellos aparecen severamente malformados (Moniot *et al.*, 2009). Estos hechos han llevado a proponer que tanto *DHH* como *PTGDS* podrían estar implicados en la formación de los cordones testiculares aunque no se han proporcionado otros datos adicionales que corroboren esta hipótesis.

Los datos de nuestro estudio en *T. occidentalis* permiten establecer una clara asociación entre la formación de los cordones y la expresión de *DHH* y de *PTGDS*. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la especificación de las células de Sertoli de esta especie (expresión de marcadores sertolianos como *SF1*, *SOX9* y *AMH*) tiene lugar coincidiendo con la formación del primordio gonadal (estadio s4c, 15 dpc), ocurriendo por tanto más temprano que en ratón (Carmona *et al.*, 2009a). Sin embargo los cordones testiculares no aparecen hasta 3 días después, en el estadio s5b (18 dpc), lo cual indica que la expresión de esos marcadores sertolianos no es suficiente para inducir a las células de Sertoli a formar los túbulos seminíferos. En ratón, *Sox9* y *Dhh* se expresan en embriones 11.5 dpc y los cordones testiculares se forman tan sólo medio día después (12 dpc), lo que impide discriminar de forma clara cual de estos genes es responsable de la formación de estas estructuras (Carmona *et al.*, 2009a). En *T. occidentalis* hemos comprobado que los cordones comienzan a formarse coincidiendo con la expresión de *DHH* y *PTGDS*, lo que refuerza la hipótesis de que estos genes tienen un papel activo en este proceso. La implicación de *DHH* en este proceso es coherente con el hecho de que, en ese periodo de desarrollo de la gónada masculina, se comienza a detectar una mayor abundancia de transcritos del receptor de DHH, *PTCH1*, que la observada en la gónada femenina. Por otra parte, las hembras de topo proporcionan otra evidencia en favor de ésta hipótesis. Sus ovotestes, que no expresan *DHH* ni *PTGDS* en sus gónadas, tal como hemos observado en éste trabajo, desarrollan cordones medulares homólogos de los cordones testiculares en los machos, pero son imperfectos apareciendo frecuentemente anastomosados (Carmona *et al.*, 2009b), lo que reproduce el fenotipo observado en los cordones testiculares de los ratones *knockout* para *Dhh* (Clark *et al.*, 2000).

-Nuevos datos sobre la relación molecular entre *SOX9* y *PTGDS*

Diversos estudios en ratón han demostrado que *PTGDS* juega un importante papel en la amplificación de la expresión de *SOX9* y en la translocación de la proteína resultante al núcleo en las células de Sertoli, lo que es necesario para

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular

que SOX9 lleve a cabo su efecto masculinizante (Malki *et al.*, 2005b; Wilhelm *et al.*, 2005; Moniot *et al.*, 2009). Nuestras observaciones en *T. occidentalis* han puesto de manifiesto que *SOX9* se expresa y tiene localización nuclear en células gonadales XY de embriones en el estadio s4b (Carmona *et al.*, 2009a), lo que implica que esta activación ocurre 3 días antes de que comience la expresión de PTGDS, que ocurre en s5b, tal como hemos demostrado en este trabajo. Por otra parte, *AMH*, un gen que en mamíferos se ha demostrado que requiere de *SOX9* para su transcripción (Morais da Silva *et al.*, 1996; De Santa Barbara *et al.*, 1998; Arango *et al.*, 1999), se activa también en s4b, coincidiendo con *SOX9*, lo que demuestra que éste ya es funcional 3 días antes de la activación de PTGDS. Por tanto, nuestros resultados demuestran que, además de *PTGDS*, debe de haber algún otro gen implicado en la translocación de *SOX9* al núcleo de las células de pre-Sertoli.

Moniot y col. (2009) mostraron que la proteína *SOX9* de ratón estimula la expresión de *Fgf9*, lo que inicia un bucle de retroalimentación positiva *Sox9/Fgf9*, y que prostaglandin D2, cuya producción está catalizada por el enzima PTGDS, estimula la expresión de *Sox9* formando un segundo bucle de retroalimentación *Sox9/Ptgds*. Tanto *Fgf9* como *Ptgds* muestran expresión específica de la gónada XY en torno a 11.5 dpc y comienzan a estimular la expresión de *Sox9*, aunque ambos bucles de retroalimentación actúan de forma independiente. Sin embargo, los datos de Moniot *et al.* (2009) no establecen si estos dos bucles ocurren simultáneamente o lo hacen de forma secuencial y, en este caso, en qué orden se activan. Nuestros datos en *T. occidentalis* muestran claramente que el bucle *SOX9/FGF9* ocurre antes y que el bucle *SOX9/PTGDS* sustituye al anterior, puesto que el gen *FGF9* se inactiva progresivamente a partir del estadio s5a-5b.

-DHH y PTGDS no son responsables de la masculinización de la región medular de la gónada XX de *T. occidentalis*

La hembra de topo desarrolla un ovoteste cuya porción medular presenta numerosas características testiculares en ausencia de marcadores sertolianos como *SOX9* y *AMH* (Zurita *et al.*, 2003; Carmona *et al.*, 2009b). Debido a esto, hemos estudiado otros marcadores testiculares como *DHH* y *PTGDS* para comprobar si una posible expresión ectópica de los mismos podría ser responsable de la aparición de este tejido. Además, dado que las células de Sertoli activan la producción de testosterona por parte de las células de Leydig via *Dhh* (Yao *et al.*, 2002), investigar si *DHH* se expresa en las células que forman parte de las esférulas medulares de los ovotestes de topo podría dar una explicación a la producción de testosterona en estos ovotestes. De manera similar, puesto que *PTGDS* es otro marcador sertoliano durante el proceso de diferenciación de las células de Sertoli de ratón, también merecía la pena realizar un estudio de su expresión en gónadas de topo.

Nuestros resultados han demostrado que ninguno de estos genes se expresa en los estadios del desarrollo investigados en la región medular del ovoteste de *T. occidentalis*, lo que permite descartarlos como posibles inductores de

6. Discusión

las estructuras testiculares que contienen estas gónadas. No obstante, hemos observado expresión de PTGDS en las células de la *rete testis* del ovoteste, lo que es coherente con el origen ontogenético de estas células, ya que esta estructura proviene directamente de los cordones medulares primitivos que se forman en la gónada XX al mismo tiempo que los cordones medulares XY que originan los túbulos seminíferos de los testículos de los machos. Por tanto, podemos afirmar que las células de la *rete testis* de la gónada XX son homólogas de las células de Sertoli XY (Barrionuevo *et al.*, 2004b), que también expresan PTGDS. En cualquier caso, esta expresión de PTGDS en la *rete testis*, en nuestra opinión, no explica el desarrollo testicular de la región medular de la gónada XX de *T. occidentalis*.

-La ausencia de DHH en la gónada XX de T. occidentalis explica la ausencia de células de Leydig de tipo adulto

En roedores se han descrito dos poblaciones de células de Leydig diferentes, que difieren en su morfología y en la síntesis de andrógenos. La primera de estas poblaciones son las células de Leydig de tipo fetal (CLF), que se agrupan en racimos, y se observan en el testículo de rata desde 14.5 dpc hasta 25 dpp cuando desaparecen. Este tipo celular es necesario para la producción de testosterona durante la vida fetal, la cual masculiniza el embrión XY. La segunda población son las células de Leydig de tipo adulto (CLA) que se originan a partir de fibroblastos peritubulares y perivasculares. Estas células no se observan exclusivamente en racimos, como ocurre con las CLF. En torno a 10 dpp comienzan a observarse los primeros precursores de estas células, que alcanzan su madurez total en torno a 90 dpp, produciendo testosterona y otros andrógenos. En ratones prepuberales y adultos mutantes para *DHH*, la población de CLA esta ausente, observándose en su lugar clusters de CLF (Clark *et al.*, 2000; Pierucci-Alves *et al.*, 2001). Además parece que aunque el número de precursores de CLF se mantiene intacto, la diferenciación de las mismas se ve reducida durante la edad fetal (Yao *et al.*, 2002).

Debido a esto, resultaba interesante investigar el tipo de células de Leydig presentes en los ovotestes de las hembras de *T. occidentalis*. Los resultados obtenidos indican que estas células de Leydig son de tipo fetal y se mantienen como tales durante toda la vida del animal. Por tanto, el tipo de células presente en el ovoteste es coherente con la ausencia de *DHH* y apoyan la hipótesis de que este gen es indispensable para la diferenciación de células de Leydig de tipo adulto. De hecho, el fenotipo del tejido intersticial de la porción medular de la gónada XX de topo es muy parecido al descrito en los ratones mutantes para *Dhh* (Clark *et al.*, 2000; Pierucci-Alves *et al.*, 2001), observándose numerosos racimos de CLF, además de numerosas células de tipo fibroblasto.

-La diferenciación de células de Leydig de tipo fetal en la gónada XX de T. occidentalis es independiente de la ruta de señalización DHH/PTCH1

Como se ha indicado, los ratones mutantes para *Dhh* no presentan CLA, pero si CLF, aunque su diferenciación se ve alterada (Yao *et al.*, 2002). Una drástica reducción en el número de precursores que expresan *Sf1* y *p450Sc*,

6.1. Genes implicados en el desarrollo testicular

marcadores de la diferenciación de CLF, indica que *Dhh* podría tener un papel en este proceso.

Como hemos comentado anteriormente, aunque en la porción medular del ovoteste XX de topo no se observan CLA si contiene abundantes CLF, que comienzan a diferenciarse progresivamente unos días después del nacimiento (estadio 10, 3-7 dpp), expresando tanto *SF1* como *p450SCC*, ambos implicados en la producción de testosterona (Carmona *et al.*, 2009b). Tras comenzar este evento, se detectan niveles crecientes de testosterona en sucesivos estadios, llegando a superar en la pubertad los detectados en machos del mismo estadio (Zurita *et al.*, 2003). Estos resultados demuestran que la presencia de *DHH* no es indispensable para que se produzca la diferenciación de estas CLF y que éstas comiencen a producir testosterona. Sin embargo nuestros resultados de RT-Q-PCR para el gen *PTCH1*, que codifica el receptor de la ruta de señalización "Hedgehog" (Hh), muestran que en el estadio 12, la región medular contiene abundante transcrito de este gen. En gónadas XX de ratón se ha demostrado que la ruta Hh se encuentra activa y que podría tener un importante papel en procesos de foliculogénesis (Wijgerde *et al.*, 2005; Russell *et al.*, 2007). Esto podría indicar que, si bien *DHH* no es responsable de la diferenciación de células de Leydig en el tejido medular de ovoteste de topo, no se puede descartar que la ruta Hh se encuentre activa, quizás por la presencia en la gónada de otro ligando de la familia Hh como *IHH* o *SHH*, lo que deberá investigar en el futuro.

El papel de AR en el desarrollo testicular parece estar bien conservado en mamíferos

El receptor de andrógenos (*AR*) codifica una proteína perteneciente a la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. *AR* se localiza en el citoplasma celular formando parte de un complejo multiproteínico (Heemers and Tindall, 2007), y al penetrar la testosterona en el interior de la célula e interactuar con el mismo, se produce la liberación del *AR* de este complejo y su migración hacia el núcleo, donde puede regular la expresión de diversos genes. Se ha comprobado que los andrógenos son capaces de estimular la expresión de *AR* mediante la estabilización de la propia proteína *AR* (Kempainen *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1995). En ratón, la producción de testosterona por parte de las células de Leydig, que comienza en 13 dpc, estimula la expresión de *AR* en este estadio, mientras que en las células de Sertoli la activación de este gen ocurre alrededor del nacimiento (You and Sar, 1998; Rey *et al.*, 2009). En ratones adultos, *AR* es detectado en células de Sertoli, células mioides peritubulares, células de Leydig y células musculares perivasculares (Sar *et al.*, 1990; Zhu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2002). En algunas especies también se ha descrito expresión en células germinales (para una revisión, ver Wang *et al.*, 2009). Nuestros resultados en *T. occidentalis* muestran que el patrón de expresión de *AR* en esta especie no es significativamente diferente del descrito en otras, por lo que al desarrollo testicular se refiere, lo que indica que el papel de *AR* en este proceso está muy bien conservado.

No obstante merece ser destacado el hecho de que la translocación de *AR* desde el citoplasma al núcleo de las células de Sertoli ocurre entre los estadios

6. Discusión

s9 y s10, coincidiendo, por tanto, con el pico de mayor testosterona detectado durante el desarrollo de esta especie, que ocurre en s10 (Zurita *et al.*, 2003). Este dato es coherente con el papel de la testosterona en inducir la translocación al núcleo de la proteína AR que se ha descrito en otras especies (Heemers and Tindall, 2007).

-La expresión de AR coincide con la diferenciación de las células de Leydig XX y XY de topo

Varios estudios han mostrado que *AR* también tiene alguna función en el ovario, concretamente en la maduración de oocitos y en la formación de los folículos ováricos, aunque esto cambia según la especie estudiada (Eppig, 1991; Lutz *et al.*, 2001; Gill *et al.*, 2004; Fan and Sun, 2004; Hammes, 2004; Jamnongjit *et al.*, 2005), de modo que conforme se sube en la escala evolutiva, *AR* y los andrógenos parecen ir perdiendo importancia en la función en folículos ováricos. En ratón se han detectado mensajeros o proteína AR en células de la granulosa, de la teca, del estroma y en oocitos (Cheng *et al.*, 2002; Gill *et al.*, 2004). Nuestros datos en topo muestran una expresión continua en el citoplasma de los oocitos, expresión que se hace más intensa a partir del nacimiento y que se mantiene durante todo el periodo analizado. Este patrón sugiere un papel para *AR* en el desarrollo de las células germinales XX, sobre todo en el inicio de la meiosis, puesto que la intensidad de expresión aumenta en este periodo. En contraste con lo observado en ratón, no hemos detectado expresión en células somáticas de la porción ovárica durante el desarrollo de la gónada XX de *T. occidentalis*.

En relación con la expresión de AR en la región medular del ovoteste, nuestros datos indican que este receptor no debe tener ninguna función durante el desarrollo prenatal puesto que no hemos detectado expresión en este periodo. Sin embargo, tras el nacimiento, se observa un paralelismo en la expresión de AR entre las células de Sertoli de la gónada XY y las células de las esferulas de la región medular de la gónada XX. En ambos casos, se inicia en s9 una expresión citoplasmática de AR que se mantiene y se hace nuclear en las células de Sertoli en el estadio siguiente (s10), mientras que termina desapareciendo en la gónada femenina. El hecho de que *AR* se active de forma simultánea en ambos tipos celulares podría ser indicio de un mismo mecanismo de regulación compartido en ambos casos. Sin embargo, existen claras diferencias en cuanto a los requerimientos para el mantenimiento de esta expresión ya que éste sólo ocurre en las células de Sertoli. La coincidencia en esta región gonadal de bajos niveles de testosterona y la falta de mantenimiento de la expresión de AR sugiere que la testosterona podría ser necesaria no sólo para translocar AR al núcleo sino también para garantizar el mantenimiento de su expresión, tal como ocurre en células de Sertoli XY.

No obstante, esta regulación no parece ocurrir de la misma manera ni en células de Leydig ni en células mioides peritubulares. Esto se deduce del hecho de que sus patrones de expresión son distintos a los observados en células de Sertoli. Las primeras células mioides peritubulares positivas para AR aparecen

6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico

en torno a s11 tanto en machos como en hembras, mostrando que, en el topo, el comienzo de esta expresión es simultánea en ambos sexos y parece independiente de los niveles de testosterona, ya que en este estadio son bajos en machos y prácticamente indetectables en hembras. En relación con las células de Leydig XY, su expresión nuclear comienza en torno a s5c, justo cuando estas células muestran marcadores esteroidogénicos y probablemente comiencen a producir testosterona (Carmona *et al.*, 2009a), ocurriendo algo similar en las hembras donde las primeras células de Leydig que muestran expresión de *AR* aparecen en el estadio s11, cuando comienza la diferenciación de este tipo celular (Carmona *et al.*, 2009b).

6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico

-La expresión de FOXL2 define la presencia de 2 subpoblaciones de células provenientes del epitelio celómico en la gónada XX de T. occidentalis

Los estudios realizados en ratón muestran que *FOXL2* es esencial para la diferenciación de células de la granulosa y la consecuente formación de los folículos ováricos (Schmidt y col, 2004), ya que se expresa en la gónada femenina temprana, su inactivación origina reversión sexual de hembra a macho y su expresión transgénica impide la diferenciación de túbulos seminíferos normales en el testículo XY (Ottolenghi *et al.*, 2007). Por otra parte, estudios más recientes han demostrado que el mantenimiento de la expresión de *FOXL2* es imprescindible para impedir la transdiferenciación de las células ováricas en células testiculares de ratones adultos (Uhlenhaut *et al.*, 2009). Nuestros resultados en *T. occidentalis* coinciden sólo parcialmente con estos hechos observados en ratón. Por una parte, la expresión de *FOXL2* durante todo el desarrollo prenatal en los cordones medulares de la gónada XX de *T. occidentalis*, junto con el hecho de que estos cordones no se desarrollan finalmente como verdaderos cordones testiculares, podría sugerir un efecto anti-testicular de *FOXL2* en esta fase del desarrollo gonadal de la hembra de topo, en coherencia con lo observado en ratón.

Sin embargo, nuestros resultados demuestran también que la expresión continuada de *FOXL2* en esta región medular no es suficiente para impedir que tengan lugar determinados eventos típicamente testiculares que ocurren en esta región tanto antes (migración celular desde el mesonefros), como después del nacimiento: desarrollo de un sistema vascular de tipo testicular, formación de túnica albugínea, rete testis y epididimo rudimentario y diferenciación de células de Leydig y células mioides peritubulares (Barrionuevo *et al.*, 2004b; Carmona *et al.*, 2009b). En coherencia con esta observación, nuestros resultados de RT-Q-PCR muestran que los niveles de expresión de *FOXL2* son muy bajos en los primeros estadios del desarrollo gonadal y que van aumentando paulatinamente durante todo el desarrollo prenatal, alcanzando valores altos en estadios postnatales tanto en la región medular como en la cortical. Además,

6. Discusión

se pone de manifiesto la ausencia total de expresión en la gónada masculina, coincidiendo igualmente con el estudio inmunohistoquímico llevado a cabo en todos los estadios del desarrollo y con lo observado en testículos de ratón (Schmidt *et al.*, 2004a; Uda *et al.*, 2004).

En la mayoría de especies de mamíferos, la diferenciación ovárica incluye la formación de cordones corticales (también llamados cordones sexuales o de Pfluger, en el caso del ovario humano) constituidos por células germinales pre- y/o post-meioticas y células somáticas de naturaleza epitelial (Odor and Blandau, 1969; Motta and Makabe, 1982; Byskov, 1986; Fröjdman *et al.*, 1989; Merchant-Larios and Chimal-Monroy, 1989; Hirshfield, 1991; Guigon and Magre, 2006). Sin embargo, el ratón, que es el modelo de estudio general en mamíferos, representa la única excepción conocida a esta regla, puesto que la región cortical carece de tales cordones en cualquier momento de su desarrollo (Jiménez, 2009). Byskov (1986) propuso que la presencia o ausencia de cordones corticales podía estar relacionada con la duración del periodo transcurrido entre el momento de la diferenciación sexual de la gónada y el inicio de la meiosis por parte de las oogonias, de manera que aquellas especies en donde este intervalo es muy corto, por ejemplo en ratón, no formarían los cordones, mientras que si lo harían el resto de las especies. Sin embargo, Byskov incluyó en el primer grupo al ratón y la rata, si bien Merchant-Larios (1975) demostró que en esta última especie también se forman cordones corticales aunque su presencia no resulta evidente por falta de tejido mesenquimático intersticial. Basándose en la naturaleza epitelial de las células somáticas de los cordones corticales y en el hecho de que acompañan continuamente a las células germinales desde la colonización de la gónada, todos los autores anteriormente mencionados han asumido el paradigma de que son las células somáticas del interior de estos cordones corticales los precursores de las células foliculares.

En ratón, la expresión de *Foxl2* comienza en 12.5 dpc en células somáticas de la gónada XX. En hembra adulta, se detecta expresión en células de la granulosa, mostrando unos altos niveles en los folículos tempranos y disminuyendo conforme avanza la foliculogénesis (Schmidt *et al.*, 2004a; Uda *et al.*, 2004). Aunque *FOXL2* se expresa tanto en la médula como en córtex, el patrón de expresión es diferente en ambas regiones de la gónada XX de *T. occidentalis*. Mientras que en la región medular la expresión ocurre principalmente en células de tipo epitelial de los cordones medulares tanto primarios como secundarios descritos por Barrionuevo *et al.* (2004b), y en menor medida en las células mesenquimáticas intersticiales, en la región cortical la expresión esta limitada exclusivamente a este último tipo celular y nunca se observa en las células de tipo epitelial que constituyen los cordones corticales que contienen las células germinales.

Nuestros resultados muestran que estas células de tipo mesenquimático son los verdaderos precursores de las células foliculares y no las células de dentro de los cordones que mantienen el estatus epitelial, en contra de la idea comúnmente aceptada de que son estos últimos los precursores de las células foliculares. Nuestros datos no sugieren que las células foliculares no provengan

6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico

del epitelio celómico puesto que sus precursores expresan *WT1*, sino que estos precursores deben de sufrir dos procesos de transformación celular: una primera transformación epitelial-mesenquimática, probablemente muy temprana y que también experimentan las células de Sertoli en los testículos (Albrecht and Eicher, 2001), y una segunda transformación mesenquimática-epitelial cuando se diferencian como células foliculares.

Por tanto, nuestro estudio demuestra la existencia de dos subpoblaciones de células somáticas en el córtex de la gónada femenina de mamíferos, que en el caso del topo se diferencian en tres aspectos fundamentales: (1) su localización, intersticial o intracordonal, (2) el tipo celular, que es mesenquimático en el caso de las células intersticiales y epitelial en el de las intracordonaes, y (3) la expresión de *FOXL2*, que sólo se produce en células mesenquimáticas intersticiales. Estos dos tipos celulares, probablemente provienen del epitelio celómico, puesto que ambos mantienen de forma continua la expresión de *WT1*, un marcador característico de este epitelio (Pritchard-Jones *et al.*, 1990; Pelletier *et al.*, 1991; Rackley *et al.*, 1993; Armstrong *et al.*, 1993). Aunque todavía no tenemos datos de otras especies, la similitud entre el patrón de desarrollo del tejido ovárico entre el topo y humano, por ejemplo, sugiere que en esta especie deben existir también ambos tipos celulares. Por lo que respecta al ratón, los estudios que hemos llevado a cabo en este trabajo demuestran que en esta especie también existen 2 subpoblaciones de células que expresan *WT1*, que se diferencian en cuanto a la expresión de *FOXL2*. En este caso, esta diferencia de expresión sería el único criterio para discriminar entre ambos tipos celulares, puesto que la inexistencia de cordones corticales elimina la posibilidad de diferenciarlos según su localización y tipo celular. En nuestra opinión, es precisamente la falta de cordones lo que ha impedido hasta ahora la identificación de estos dos tipos celulares en el ratón.

Merece la pena destacar otro fenómeno que también hemos observado durante el desarrollo gonadal de la hembra de topo: cuando las células somáticas intracordonaes más profundas, que expresan *WT1* pero no *FOXL2*, se proyectan hacia la región medular, dando lugar a nuevos cordones medulares que finalmente se transforman en esférulas testiculares (Barrionuevo *et al.*, 2004b), comienzan a expresar *FOXL2*, igual que lo hacen todas las células medulares de tipo epitelial, desde la formación de los cordones medulares primarios. La presencia de células germinales en los cordones corticales, que están en estrecho contacto con las células somáticas intracordonaes, y su ausencia en los cordones medulares, sugiere que las células germinales pre- y post-meióticas podrían inducir la inhibición de *FOXL2* en las células somáticas epiteliales adyacentes durante todo el periodo previo a la foliculogénesis. Esta hipótesis es coherente con el hecho de que las células mesenquimáticas que ocupan los espacios intersticiales existentes entre los cordones corticales, y que en consecuencia no están en contacto directo con las células germinales, sí expresan *FOXL2*. Estudios futuros en ratones carentes de células germinales pueden permitir contrastar esta hipótesis.

-Una hipótesis sobre la organogénesis ovárica en mamíferos.

6. Discusión

Los datos morfológicos y moleculares disponibles actualmente sugieren que la gónada de mamíferos se origina a partir de sucesivas oleadas de proliferación del epitelio celómico, tal como propuso Janosik en 1885 (para una revisión, ver Jiménez, 2009)). La primera fase proliferativa origina la región medular de la gónada, mientras que la segunda daría lugar al córtex. Durante el desarrollo testicular, esa primera fase proliferativa da lugar a la formación de cordones medulares, precursores de los túbulos seminíferos, mientras que la segunda fase de proliferación, o no tiene lugar, o es muy poco relevante; el delgado córtex formado se diferencia en la túnica albugínea del testículo. Por el contrario, durante el desarrollo ovárico siempre ocurren las 2 fases proliferativas, la segunda de las cuales origina un grueso córtex a partir del cual se diferencia el tejido ovárico definitivo. Existen evidencias directas de que las células de Sertoli del testículo y las células foliculares del ovario comparten un mismo precursor celular proveniente del epitelio celómico (Karl and Capel, 1998; Albrecht and Eicher, 2001). Las células pre-Sertoli rápidamente expresan marcadores genéticos como *SRY* o *SOX9* (Sekido y Lovell-Badge, 2009), e incluso AMH en el caso del topo (Carmona *et al.*, 2009a), mientras que las células pre-foliculares expresan genes típicos del desarrollo ovárico como *WNT4*, *RSPO1* y *FOXL2* entre otros (Vainio *et al.*, 1999; Uda *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2004a; Parma *et al.*, 2006; Chassot *et al.*, 2008a).

Los datos de nuestro estudio en topo y en ratón muestran que ambos tipos celulares se localizan inicialmente en la región medular y que, por tanto, probablemente aparecen en la primera fase proliferativa del epitelio celómico. Si bien esto es evidente para el caso de las células pre-Sertoli, no lo es así para el de las células pre-foliculares. No obstante, la localización medular de las células que expresan *FOXL2* durante todo el desarrollo prenatal del ovoteste de topo y durante los primeros estadios del desarrollo del ovario de ratón, ha quedado patente en este estudio. Estos estudios en topo también demuestran que las células somáticas que se derivan de la segunda fase proliferativa (córtex), que dan lugar a los cordones corticales en la mayoría de las especies de mamíferos, no expresan *FOXL2*. De igual forma, el estudio que hemos realizado en ratón demuestra que el córtex contiene células somáticas que no expresan *FOXL2*, aunque en este caso no se forman cordones ovígeros.

Nuestras observaciones ponen de manifiesto que las células prefoliculares son de tipo mesenquimático, tal como indicaron Albrecht and Eicher (2001), y se localizan en los septos mesenquimáticos que rellenan el espacio intersticial entre los cordones corticales, encontrándose localizados exclusivamente en la médula al principio del desarrollo ovárico. Existen varios hechos que sugieren que estas células penetran en el córtex por migración desde la médula. Estos hechos son: (1) las primeras células inmunorreactivas que se observan en el córtex se localizan en las regiones próximas a la médula; (2) la última región cortical en poblarse con estas células es la más externa, localizada justo bajo el epitelio celómico; (3) el proceso de foliculogénesis se produce en forma de oleada, comenzando en la región más profunda del córtex (junto a la médula) y terminando en la más externa, entre los estadios s12 y s14 y (4) mientras la

6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico

región cortical se va poblando de células mesenquimáticas inmunorreactivas, la región medular las va perdiendo hasta carecer completamente de ellas, coincidiendo con la emancipación (s15a). Estudios posteriores con marcadores de migración celular y/o análisis de video en microscopio confocal realizados en gónadas en cultivo permitirán dilucidar este proceso.

Por otra parte, la evolución de la densidad de células que expresan FOXL2 en la región cortical de la gónada XX de *Talpa* a lo largo de su desarrollo postnatal nos proporciona datos relevantes acerca de la verdadera naturaleza de los precursores de las células foliculares. Nuestros estudios muestran claramente que el número de células inmunorreactivas en el córtex se incrementa entre los estadios s10 y s11 (5 días de intervalo), alcanzándose un número máximo de células que ya no aumenta en los estadios posteriores. Puesto que la foliculogénesis comienza en s12, ésto implica que la masa crítica de células que expresan FOXL2 se alcanza justo antes del inicio de este proceso. Puesto que todas las células que expresan este gen terminan formando parte de los folículos (son células foliculares) durante los estadios s12 y s14, es razonable pensar que eran esas mismas células las que expresaban FOXL2 en s11, cuando se fragmentan los cordones corticales, ya que su número no varía en todo el periodo s11-s14. Estos datos permiten concluir que las verdaderas células prefoliculares son las células mesenquimáticas que ocupan las regiones intersticiales entre los cordones ovígeros del córtex ovárico, y no las células epiteliales que constituyen estos cordones corticales, junto con las células germinales. Esto contradice la idea comunmente aceptada de que las células prefoliculares son las que componen los cordones ovígeros.

Basándonos en estos resultados podemos asumir que el proceso de foliculogénesis es realmente más complejo de lo inicialmente asumido y que implica al menos 2 transformaciones celulares significativas. Por un lado, las células prefoliculares han de sufrir una transición mesenquimática-epitelial para convertirse en células foliculares propiamente dichas y por otra parte, las células epiteliales que forman los cordones ovígeros probablemente sufren la transición contraria a la de las anteriores, ya que finalmente quedan en el espacio intersticial y adquieren un fenotipo mesenquimático. Todo este proceso implica por tanto una reorganización completa de la estructura tisular del ovario durante la cual tiene lugar el fraccionamiento de los cordones ovígeros, necesario para que las células prefoliculares accedan a disponerse alrededor de los oocitos. No tenemos datos concretos acerca del destino final de las células somáticas de los cordones ovígeros (FOXL2-), aunque nuestros estudios sugieren que, probablemente, desaparecen por apoptosis, puesto que el espacio intersticial que finalmente ocupan en el ovario se va reduciendo paulatinamente durante el periodo juvenil, llegando casi a desaparecer antes de la pubertad. Estudios posteriores nos permitirán dilucidar también esta hipótesis.

-El perfil de expresión de RSPO1, WNT4 y FST es coherente con la falta de inhibición del desarrollo testicular durante el periodo prenatal en la gónada XX de topo

6. Discusión

RSPO1, *WNT4* y *FST* son componentes de una misma ruta de señalización en el ovario, cuya principal función es inhibir el desarrollo testicular, produciendo una represión de *SOX9*, e inhibiendo la migración celular desde el mesonefros, evitando así la formación de un sistema vascular profuso y de cordones medulares. La inactivación tanto de *RSPO1* como de *WNT4* origina casos de reversión sexual hembra-macho en ratones y humanos. Así, ratones mutantes para estos genes muestran rasgos vasculares específicos de testículos, como es la presencia de un vaso celómico (Isotani *et al.*, 2005; Ottolenghi *et al.*, 2007; Chassot *et al.*, 2008b; Mandel *et al.*, 2008; Tomizuka *et al.*, 2008). Sin embargo, aunque *RSPO1* se ha propuesto como el activador de la ruta *WNT4* en ovario (Chassot *et al.*, 2008b), los ratones XX mutantes homocigóticos *Rspo1*^{-/-} muestran hermafroditismo en los genitales, mientras que los ratones XX mutantes *Wnt4*^{-/-} presentan una ausencia completa de genitales externos femeninos (Ottolenghi *et al.*, 2007).

Durante la gonadogénesis femenina, la inactivación de *Fst* tiene como consecuencia la formación del vaso celómico, estructura vascular específica del testículo, tal como se observa en ratones mutantes para este gen (Jeays-Ward *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2004). Las gónadas XX *Fst*^{-/-} no presentan células de Leydig, algo que si se observa en los knockout para *Wnt4*, sugiriendo que *WNT4* activa diferentes rutas además de la de *Fst*. En ratón, *Rspo1* se detecta en células somáticas de la gónada XX en 10.5 dpc (Parma *et al.*, 2006; Chassot *et al.*, 2008b), mientras que *Wnt4* y *Fst* aparecen alrededor de 11.5 dpc, alcanzando este último niveles máximos en 12.5 y disminuyendo a partir de 14.5 dpc (Vainio *et al.*, 1999; Menke and Page, 2002; Yao *et al.*, 2004).

Debido a estos hechos, es interesante investigar la expresión de estos genes durante el desarrollo ovárico ya que esta descrito que la región medular de la gónada XX de *Talpa* se desarrolla como tejido testicular disgenésico, en el cual, como ya hemos apuntado anteriormente, ocurren eventos típicos del desarrollo masculino como migración celular desde el mesonefros, formación de cordones medulares y de un sistema vascular típicamente testicular y diferenciación de células de Leydig, entre otros.

El perfil de expresión de estos marcadores ováricos investigados en este estudio resulta llamativamente parecido, comenzando con niveles prácticamente nulos al principio del desarrollo gonadal y aumentando lentamente hasta alcanzar valores medio-bajos en el nacimiento. Esto implica que en el momento en que hubiera sido necesario inhibir la migración de células mesonefricas, impidiendo así la formación de cordones medulares entre s5a y s5b, estos genes mostraban niveles de expresión muy bajos, principalmente *FST*, que se ha postulado como el inhibidor directo de la formación de la vasculatura específica de testículo que se origina como consecuencia de la migración desde el mesonefros (Yao *et al.*, 2004). Por tanto, esta baja expresión podría explicar la migración que desencadena el desarrollo testicular en la gónada XX de topo, principalmente la formación de cordones testiculares y la vasculogénesis.

Por otra parte, los estudios realizados en ratón indican que la ruta de señalización *Wnt4* tiene un efecto antagónico con *Sox9*, inhibiendo probablemente al

6.2. Genes implicados en el desarrollo ovárico

gen *Fgf9* (Kim *et al.*, 2006), puesto que los mutantes para *Wnt4*^{-/-} activan *Sox9* y viceversa. Sin embargo, no se conoce la relación molecular entre estos elementos, aunque se sospecha que esta relación debe de ser indirecta, puesto que los mutantes *Wnt4*^{-/-} sufren una reversión sexual sólo parcial, activando *Sox9* al cabo de un tiempo.

Los datos obtenidos en nuestro estudio en *Talpa* demuestran claramente que *SOX9* puede mantenerse inactivo en la gónada XX en ausencia de actividad de la ruta WNT4. De hecho, *RSPO1* y *WNT4* están completamente inactivos en los estadios iniciales del desarrollo gonadal (s4c y s5a) y ello no implica que *SOX9* se mantenga activo. Estos datos demuestran que la ruta WNT4 no es suficiente por sí sola para mantener inactivo a *SOX9*, siendo necesario algún otro factor adicional.

-El perfil de expresión de los genes de la ruta WNT4 sugiere un papel en el inicio de la meiosis femenina

La ruta WNT4 también se ha considerado necesaria para garantizar la supervivencia de las células germinales durante el desarrollo ovárico. Sin embargo, aunque en los ratones XX *Rspo1*^{-/-}, la mayoría de las células germinales sobreviven hasta el nacimiento si bien nunca llegan a entrar en meiosis, en ratones XX *Wnt4*^{-/-}, sólo el 10% de éstas no llega a desaparecer. Se ha demostrado que en estos mutantes, quedan unos niveles basales de *Wnt4* en ambos sexos, los cuales podrían ser suficientes para permitir esta supervivencia. Parece, por tanto, que en el ovario *WNT4* podría tener también una función independiente de *RSPO1*. Además, en estos ratones se produce una depleción masiva de las células germinales a partir de 16.5 dpc, perdiéndose la mayoría alrededor del nacimiento (Yao *et al.*, 2004). En concordancia con estos hechos, se ha postulado que *Fst* es necesario para garantizar la supervivencia de células germinales, pero únicamente en la región cortical, ya que en la médula de ovarios normales de ratón si ocurre esta depleción.

Sin embargo, los experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio no discriminan en qué etapas del desarrollo prenatal son necesarios estos genes para el mantenimiento de las células germinales. Hemos observado que los máximos niveles de expresión de *RSPO1* y *WNT4* en la gónada XX de topo se alcanzan en estadios postnatales del desarrollo, coincidiendo con el periodo de entrada en meiosis por parte de las células germinales, mientras que esos niveles son significativamente más bajos durante el periodo prenatal, siendo completamente nulos al principio del mismo. Puesto que durante todo el periodo prenatal tiene lugar la proliferación de las células germinales, nuestros datos sugieren que la ruta WNT4 podría ser necesaria para la supervivencia de los oocitos o estar implicada de alguna manera en el inicio de la meiosis, que ocurre en el córtex ovárico de la gónada XX de topo, pero no en la supervivencia de las células germinales premeioticas. Por otra parte, el hecho de que *RSPO1*, *WNT4* y *FST* comienzan a inactivarse rápidamente en la región cortical al final del periodo del inicio de la meiosis (s10 y s11), coincidiendo con el inicio de la foliculogénesis

6. Discusión

(s12) sugiere que estos genes podría estar implicados en el primero pero no en el segundo de estos procesos.

Con la excepción de FST, las células de las esferulas medulares expresan también los marcadores ováricos investigados (WNT4 y FOXL2), denotando así que el origen cortical que hemos propuesto para estas células y su naturaleza ovárica (Barriomuevo *et al.*, 2004b). Sin embargo, es probable que la expresión de estos genes en estas células no obedezca a la realización de una función concreta, sino que más bien sea una inercia de su origen ovárico, puesto que estas células nunca formarán parte de un tejido ovárico bien desarrollado.

En estudios previos de inmunofluorescencia realizados en nuestro laboratorio sobre la expresión de WNT4 y FST (Carmona *et al.*, 2009b) detectamos expresión de WNT4 en los primeros estadios del desarrollo prenatal, aunque nuestros datos actuales de cuantificación mediante RT-Q-PCR muestran que esta expresión realmente alcanza niveles muy bajos. Por otra parte, existe a priori cierta incongruencia entre ambos estudios en relación con el momento en que se inicia la inactivación de estos genes en los estadios postnatales del desarrollo ovárico. Mientras que en el estudio de inmunofluorescencia, la inactivación es patente en el estadio s10, los datos de RT-Q-PCR indican que se inicia después de s11. Teniendo en cuenta que esta cuantificación fue realizada agrupando gónadas de estadios consecutivos dado el alto número de estadios a estudiar y a la escasez de este tipo de material, con objeto de dilucidar esta incongruencia volvimos a realizar el estudio usando en esta ocasión gónadas no agrupadas (Figura 5.42 B).

Este estudio confirmó los datos de cuantificación realizada previamente y puso de manifiesto una clara tendencia decreciente en los niveles de *WNT4* y *FST* tras el estadio s11. En nuestra opinión, la falta de concordancia entre ambos estudios probablemente sea debida a la existencia de variación interindividual en la temporalidad de este proceso y a la probable influencia de la ineludible inexactitud a la hora de determinar en que estadio de desarrollo se encuentra cada camada de topo, teniendo en cuenta que cada estadio postnatal abarca un rango de 5 días y que esta determinación se basa en criterios morfológicos y biométricos.

-WNT4 y FST se expresan en un tipo celular diferente al que expresa FOXL2 en la gónada XX de T. occidentalis

Varias líneas de investigación demuestran que la ruta de señalización WNT4 (activada por *RSPO1*) y *FOXL2* son imprescindibles para el desarrollo ovárico. Aunque los ratones mutantes simples para *Rspo1*, *Wnt4* o *Foxl2* no sufren reversión sexual completa de hembra a macho (Schmidt *et al.*, 2004a; Uda *et al.*, 2004; Ottolenghi *et al.*, 2007; Chassot *et al.*, 2008b), sin embargo, los dobles mutantes *Wnt4*^{-/-} *Foxl2*^{-/-} experimentan una reversión sexual XX completa con la formación de cordones testiculares, expresión de *Sox9* y demás marcadores masculinos (Ottolenghi *et al.*, 2007).

No hay evidencias de la existencia de relación molecular entre la ruta WNT4 y la expresión de *FOXL2* en mamíferos, lo cual es coherente con el

6.3. Diferenciación de células mioides peritubulares

hecho de que en cabra se ha mostrado que *FOXL2* y *RSP01* se expresan en tipos celulares distintos (Kocer *et al.*, 2008). Nuestros estudios en Talpa muestran claramente que la ruta de señalización WNT4-FST se activa en las células somáticas localizadas en el interior de los cordones corticales, mientras que *FOXL2* lo hace en las células mesenquimáticas que ocupan las regiones intersticiales entre estos cordones, demostrando así que la autonomía de ambas rutas esta conservada probablemente en la mayoría de mamíferos. Queda por demostrar si ocurre lo mismo en ratón aunque en este caso ya sabemos que no tiene lugar la organización espacial en forma de cordones corticales que aparecen en los ovarios de muchos mamíferos, incluida la especie humana.

6.3. Diferenciación de células mioides peritubulares

-La desmina (DES) y α -SMA *marcan el desarrollo de las células mioides peritubulares en la gónada XY y XX de Talpa*

La desmina es un componente de los filamentos intermedios en células contráctiles, mientras que α -SMA (*smooth muscle actin*) es una isoforma de la actina que se expresa específicamente en células de músculo liso. En diversos estudios se han utilizado ambos como marcadores de la diferenciación de las células mioides peritubulares (Palombi *et al.*, 1992; Tung and Fritz, 1990). Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos contra estos marcadores, han puesto de manifiesto que en la región medular de las gónada XX y XY de individuos juveniles y adultos, aparecen estas células rodeando a las esférulas medulares y los túbulos seminíferos, respectivamente. Este es un hecho singular, ya que esta población celular es específica de la gónada masculina y constituye otro rasgo testicular adicional en el desarrollo de esta porción gonadal (Barrionuevo *et al.*, 2004b)

Por tanto, DES y α -SMA son marcadores idóneos para el estudio del proceso de diferenciación que sufren las células mioides peritubulares en ambos machos y hembras de topo. En los testículos de los machos, ambos marcadores muestran patrones de expresión muy similares, con la aparición de células con fenotipo contráctil alrededor de los cordones testiculares que se inicia en el estadio s5b, cuando se forman de los mismos, que continúa hasta s9 en que se puede observar una lámina continua de células inmunorreactivas alrededor de estos cordones. A lo largo de este proceso, se observan numerosas células que contienen desmina en la región intersticial, aunque su número va disminuyendo paulatinamente hasta desaparecer en s9, lo que sugiere que probablemente se trate de precursores de células mioides diferenciadas. En líneas generales, este patron de diferenciación de células mioides peritubulares coincide con el descrito previamente en rata (Palombi *et al.*, 1992).

En la región medular de la gónada XX de topo, α -SMA aparece exclusivamente en los vasos sanguíneos durante todo el periodo prenatal y la primera

parte del desarrollo postnatal hasta s11, en que empiezan a observarse células inmunorreactivas alrededor de las esferulas recién formadas, permaneciendo este patrón hasta la edad adulta, tal como describieron [Barrionuevo et al. \(2004b\)](#). Esas células también expresan desmina claramente a partir del estadio s10, observándose en estadios anteriores en el espacio intersticial de manera difusa. Este desfase temporal en la formación de células mioides peritubulares es una de las principales diferencias entre el tejido testicular de machos y hembras de topo, si bien una vez diferenciadas las células mioides peritubulares son muy similares en ambos casos.

Ambos tejidos testiculares comparten además la formación de una túnica albugínea de características muy similares ([Barrionuevo et al., 2004b](#)) que, sin embargo, también se diferencia en estadios distintos, marcados por la expresión de α -SMA. Nuestros resultados demuestran que la túnica albugínea de los testículos XY se diferencia entre los estadios s6 y s9, mientras que la de la porción testicular de la gónada XX lo hace a partir de s9.

En la región cortical, las células inmunorreactivas para desmina y α -SMA se localizan invariablemente en las zonas intersticiales, con un patrón de expresión muy similar al observado en las células prefoliculares. Aunque no tenemos evidencias de que sean estas células las que expresan ambos genes, su posible carácter migratorio podría desvelar su naturaleza, tal como sugirieron [Mayo et al. \(1992\)](#).

6.4. Formación de la vasculatura

-El proceso de vasculogénesis testicular está conservado en mamíferos

La vasculogénesis consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células endoteliales diferenciadas *de novo*, a diferencia de la angiogénesis, en que los vasos se forman a partir de células del mismo tipo que existían previamente en el tejido. Este proceso se desarrolla de manera distinta en testículo y ovario, presentando un claro dimorfismo sexual. En la gónada XY de ratón, los vasos existentes en el mesonefros penetran en la gónada indiferenciada en 11.5 dpc, formando un sistema vascular primitivo. En 12.5 dpc, células endoteliales migran desde el mesonefros al interior de la gónada, disponiéndose en la periferia de los cordones testiculares y formando una gran red vascular. En la superficie ventral de la gónada se origina el vaso celómico, una estructura típica del testículo ([Brennan et al., 2002](#); [Coveney et al., 2008](#); [Cool et al., 2008](#)).

En el presente estudio hemos realizado un análisis pormenorizado del proceso de vascularización del testículo de topo usando 3 métodos diferentes: (1) histología convencional, (2) marcaje inmunohistológico con CAV1 y (3) visualización *in toto* del sistema vascular usando perfusión con un medio de contraste y clarificación del tejido perfundido. Este estudio permite comprobar que este patrón de vascularización es prácticamente idéntico al descrito previamente

en ratón (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008). Puesto que se trata de especies perteneciente a 2 órdenes distintos de mamíferos, esa alta similitud indica que el proceso de vascularización del testículo está probablemente muy conservado desde el punto de vista evolutivo.

Un evento clave durante la vasculogénesis testicular es la formación del vaso celómico, que ocurre tanto en topo como en ratón. El estudio de visualización *in toto* utilizando medio de contraste proporciona imágenes muy claras y nítidas de la morfología que adquiere esta estructura antes de su agregación como un vaso convencional de morfología cilíndrica. Tras el proceso de migración de células endoteliales desde el mesonefros, se origina una red microvascular en el dominio celómico medio de la gónada tal como se observa en la figura 5.62. La existencia de esta red microvascular ha sido previamente descrita (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008). En estos estadios tempranos del desarrollo testicular, el vaso celómico recorre toda la longitud de este dominio gonadal. Sin embargo, nuestros estudios en ratón y en topo ponen de manifiesto que este patrón no se mantiene en los estadios posteriores del desarrollo, puesto que el vaso celómico original deriva en una gran arteria que no recorre este dominio celómico en toda su longitud, sino que partiendo desde el polo posterior del testículo, recorre unos 2/3 de su longitud y penetra profundamente en el interior del mismo, donde se ramifica en vasos de menor calibre. El hecho de que este patrón de desarrollo vascular tardío también se haya conservado evolutivamente sugiere la existencia de un estrecho control de este proceso morfogénico y su posible importancia en la función testicular.

-El sistema vascular de la región medular de la gónada XX de topo representa otro rasgo testicular en el desarrollo de esta región

En ratón, igual que ocurre en muchas otras especies de mamíferos, la formación del sistema vascular del ovario ocurre sin que se produzca migración desde el mesonefros adyacente y el desarrollo del mismo se produce mediante proliferación y remodelado de la vasculatura preexistente en la gónada indiferenciada (Brennan *et al.*, 2002; Coveney *et al.*, 2008). Como ya se ha indicado anteriormente, la gónada XX de *T. occidentalis* es un caso excepcional, puesto que su región medular muestra numerosos rasgos típicamente testiculares. A lo largo de la investigación realizada al respecto en nuestro laboratorio, se han recopilado diversas pruebas del carácter testicular de esta región. Entre otras, se ha sugerido que el patrón vascular de la región medular es similar al de los testículos XY (Barrionuevo *et al.*, 2004b; Carmona *et al.*, 2009b). Sin embargo, era necesario realizar un estudio exhaustivo del proceso de formación de la vasculatura durante el desarrollo prenatal y postnatal de la gónada XX para comprobar si sigue un patrón de desarrollo homólogo al observado en testículo. El estudio detallado a nivel morfológico y mediante el uso de CAV1 como marcador de células endoteliales, ha puesto de manifiesto que el desarrollo vascular de la porción medular de la gónada XX de topo es casi idéntico al observado en los testículos XY de esta especie.

Es especialmente significativo el hecho de que en la gónada XX tiene lugar un proceso similar al que conduce a la formación del vaso celómico en los

6. Discusión

testículo XY. Como ya se ha indicado, la migración de células endoteliales desde el mesonefros hacia el interior de la gónada desencadena el proceso de vasculogénesis testicular y, secundariamente, la formación de cordones medulares (Cool *et al.*, 2011). La primera manifestación de este proceso de vasculogénesis es la formación del vaso celómico, que también ocurre durante el desarrollo testicular del topo. En la hembra de esta especie se produce migración en el estadio s5b, igual que ocurre en el testículo de los machos, y nuestros datos sugieren que este hecho desencadena, de la misma manera, la formación de una estructura similar al vaso celómico, que aparece a modo de una red microvascular que se interpone entre la médula y el incipiente córtex. La principal diferencia entre machos y hembras a este respecto es el grosor de la región cortical que queda entre esta red vascular y el epitelio celómico, que es significativamente mayor en el caso de la hembra. La evolución inmediatamente posterior del desarrollo vascular origina la principal diferencia a este respecto entre ambos sexos, que tiene que ver con la temporalidad del desarrollo vascular. En el macho, este proceso prosigue sin solución de continuidad, a partir de la formación del vaso celómico, observándose la aparición de vasos de un calibre cada vez mayor en el resto de estadios prenatales. Por el contrario, el avance del desarrollo testicular de la región medular de la gónada XX de topo, incluida la vasculogénesis, queda ralentizado durante toda la fase prenatal. A partir del nacimiento (estadio s9) comienzan a aparecer los distintos aspectos del desarrollo testicular en la región medular de las gónadas XX y se reanuda la formación de su vasculatura, incluyendo la aparición de grandes vasos bajo la túnica albugínea y en los espacios intersticiales entre las esferulas medulares. El resultado final es un sistema vascular bastante complejo y muy similar al de los testículos de los machos.

Por el contrario, la región cortical desarrolla una vasculatura mucho menos profusa, tal como queda patente en la figura 5.64.

Podemos concluir, por tanto, que la formación de un sistema vascular muy desarrollado es otro rasgo testicular de la porción medular de la gónada XX de *T. occidentalis*.

-El grado de vascularización del tejido ovárico es menor que el del tejido testicular durante el desarrollo prenatal de los ovotestes de topo

Tradicionalmente se ha aceptado que la vasculatura que se origina en el testículo en desarrollo es mucho más densa que la observada en el ovario. Sin embargo, recientes estudios mediante inmunofluorescencia en gónada completa (*whole-mount*) en ratón utilizando CAV1 como marcador de células endoteliales han puesto en tela de juicio esta idea, sugiriendo que la gónada femenina podría desarrollar un sistema vascular incluso más profuso que el observado en testículo (Bullejos *et al.*, 2002).

CAV1 es una proteína que se encuentra en las invaginación que presenta la membrana plasmática, llamadas *caveolae*. Esta proteína se encuentra implicada en diversos procesos biológicos, tales como señalización molecular o el transporte lipídico (Razani *et al.*, 2001), detectándose en células endoteliales, además de

6.5. Migración celular hacia la gónada desde el mesonefros

en fibroblastos y adipocitos (Scherer *et al.*, 1995). Aunque se ha utilizado como marcador para el estudio de la vasculatura, también se ha hipotetizado que podría estar implicado en la meiosis femenina (Scheel *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2006; Hernández-Bello *et al.*, 2008), aunque los ratones mutantes para este gen son totalmente fértiles (Drab *et al.*, 2001; Razani *et al.*, 2001; Hnasko and Lisanti, 2003).

Nuestros estudios en *T. occidentalis* y en ratón muestran que CAV1 es un excelente marcador molecular no sólo de células endoteliales sino también de células germinales y de las del epitelio celómico. En esta especie, la expresión de CAV1 se observa invariablemente en las células endoteliales y en las del epitelio celómico en todos los estadios del desarrollo, así como en las células germinales a partir del nacimiento, justo antes del inicio de la meiosis (s9) y continuando en estadios posteriores, incluido el periodo de la foliculogénesis. Esta proteína aparece siempre localizada en la membrana citoplásmica en todos los tipos celulares mencionados.

Por tanto, el uso de CAV1 como un marcador del proceso de vascularización en experimentos de inmunodetección en gónada completa (*whole-mount*) no es recomendable, por cuanto la expresión masiva que tiene lugar en las células germinales meióticas desvirtuaría este estudio sobrevalorando el grado de vascularización. En cambio, un estudio más detallado, basado en el análisis de cortes histológicos, que permite identificar qué células son inmunorreactivas para CAV1, junto con la visualización *in toto* utilizando medio de contraste, demuestra claramente que el grado de vascularización prenatal del ovario, tanto de ratón como de topo, es claramente inferior al del testículo, lo que apoya de nuevo la hipótesis clásica a este respecto. Sin embargo, el desarrollo juvenil de la gónada femenina implica un proceso de vasculogénesis mucho más acusado que lleva al ovario a disponer de un sistema vascular casi tan importante como el del testículo.

6.5. Migración celular hacia la gónada desde el mesonefros

- *La migración temprana de células mesonefricas hacia la gónada ocurre tanto en machos como en hembras de topo*

El proceso de migración que ocurre durante la gonadogénesis masculina en mamíferos es esencial para que se desencadenen numerosos eventos específicos de la gónada XY (Buehr *et al.*, 1993; Martineau *et al.*, 1997; Tilmann and Capel, 1999; Uzumcu *et al.*, 2002; Brennan *et al.*, 2002; Jeays-Ward *et al.*, 2003). En ratón, este proceso ocurre en 12.5 dpc y es necesario para la correcta diferenciación del testículo (Merchant-Larios and Moreno-Mendoza, 1998).

Durante el desarrollo del ovoteste de *T. occidentalis*, la porción medular de esta gónada presenta numerosos rasgos testiculares que incluyen la formación

6. Discusión

de cordones medulares, una profusa vascularización y diferenciación de células mioides peritubulares y de Leydig (Barrionuevo *et al.*, 2004b; Carmona *et al.*, 2009b), que en ratón se sabe que dependen directamente de que se produzca un proceso de migración celular desde el mesonefros adyacente hacia el testículo (Buehr *et al.*, 1993; Merchant-Larios *et al.*, 1993; Tilmann and Capel, 1999). Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado evidencias indirectas de que tal migración ocurre durante el desarrollo temprano de la gónada XX de topo. La presencia de células inmunorreactivas para MT1-MPP (un marcador de células migrantes) en la región frontera gónada-mesonefros entre los estadios s4c y s5c, además de la expresión en ese periodo de PDGFR- α en células intersticiales de la gónada [PDGFR- α es un gen necesario para este tipo de migración en la gónada de ratón; (Brennan *et al.*, 2003)], sugieren claramente que la migración de células mesonéfricas hacia la gónada entre los estadios s4c y s5b no sólo ocurre en los machos sino también en las hembras de topo (Carmona *et al.*, 2009b).

Sin embargo, no había hasta el momento evidencias directas de la existencia de este proceso de migración en la gónadas XY y XX de *T. occidentalis*. En ratón, este tipo de evidencias fueron aportadas por Coveney *et al.* (2008), quienes desarrollaron un sistema para la captura de imágenes en serie temporal, utilizando cultivo de gónadas embrionarias de ratones que expresaban la proteína GFP en células endoteliales, mediante microscopía confocal. De esta forma pudieron elaborar videos con esas series de imágenes en donde quedaba patente el proceso de migración de células fluorescentes desde el mesonefros al interior de la gónada masculina, proceso que tenía lugar en mucha menor medida en la gónada femenina.

Puesto que no es posible abordar un estudio idéntico con gónadas embrionarias de topo, desarrollamos una adaptación del este método, utilizando agregados de células mesonéfricas de ratón, previamente teñidas con CFDA, que se adosaron a gónadas embrionarias de topo y se mantuvieron en cultivo de órganos durante dos días. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto que este método permite identificar migración celular al interior de la gónada masculina, tanto de ratón como de topo. En la gónada femenina de *T. occidentalis* pudimos detectar cuatro veces más células migrantes que en la gónada femenina de ratón, indicando que, tal como sugerían nuestros resultados anteriores, existe migración en la gónada XX de topo, lo que permite explicar el subsiguiente desarrollo de estructuras testiculares en la misma. Los resultados de los experimentos realizados con gónadas de ratón fueron más evidentes que los obtenidos con el equivalente en topo, tanto para el macho como para la hembra. Esta diferencia se puede explicar fácilmente considerando que, posiblemente, las células endoteliales de ratón migran mejor en el interior de gónadas de ratón que en las de topo. Por otra parte, la disponibilidad de material de topo embrionario que se encuentra en el estadio de desarrollo idóneo es muy escasa, por lo que fue mucho más fácil poner a punto la técnica en gónadas de ratón, cuya disponibilidad es ilimitada.

7. Conclusiones

Contenidos

7.1. Conclusiones	230
7.2. Conclusions	231

7.1. Conclusiones

1. De acuerdo con sus respectivos perfiles de expresión, *SOX9*, *FGF9*, *PTGDS* y *DHH* no participan en ninguno de los procesos de desarrollo testicular de la porción medular de la gónada XX de *Talpa occidentalis*.
2. *FGF9*, al igual que otros marcadores sertolianos como *SOX9* o *AMH*, se expresa muy temprano en la gónada masculina, 3 días antes de la formación de los cordones testiculares, cuando cesa su expresión, lo que descarta su implicación en dicho proceso. Por tanto, *FGF9* sólo es necesario durante los primeros estadios del desarrollo testicular.
3. El patrón de expresión de *DHH* y *PTGDS* sugiere su implicación en la formación de los cordones testiculares en la gónada XY.
4. La ausencia de expresión de *DHH* en la región medular del ovoteste de *Talpa* explica la falta de células de Leydig de tipo adulto, y el mantenimiento de las células de Leydig de tipo fetal, cuya diferenciación es independiente de la ruta DHH/PTCH1.
5. Los patrones de expresión de *FGF9* y *PTGDS* sugieren que el bucle de retroalimentación FGF9/SOX9 ocurre antes que el bucle PTGDS/SOX9 y que este último sustituye al anterior.
6. El aumento de la expresión de *SOX9* durante el desarrollo postnatal del testículo de topo parece ligado al descenso de los niveles de andrógenos en el destete y marca el final de la etapa infantil.
7. La translocación de AR desde el citoplasma al núcleo en células de Sertoli de la gónada XY esta asociada con incremento en los niveles de testosterona sérica que tiene lugar tras el nacimiento. En las células de las esférulas medulares de la gónada XX, que carecen de testosterona en ese periodo, dicha translocación de la proteína AR al núcleo no tiene lugar.
8. Existen dos subpoblaciones diferentes de células provenientes del epitelio celómico en la gónada XX de Talpa: unas de naturaleza epitelial y que expresan *WNT4* y *FST* situadas dentro de los cordones corticales, y otras de tipo mesenquimático y que expresan además *FOXL2* situadas intersticialmente entre dichos cordones. En contra de la hipótesis clásica asumida hasta ahora, estas últimas son realmente las precursoras de las células foliculares.
9. Las células de las esférulas medulares de la gónada XX, que provienen de proyecciones de los cordones corticales, comienzan a expresar *FOXL2* al pasar al compartimento medular. Este hecho sugiere un posible efecto inhibitorio de la expresión de *FOXL2*, ejercido por las células germinales sobre las células somáticas corticales.

10. La presencia de *FOXL2* en la región medular de la gónada XX no inhibe ninguno de las estructuras típicamente testiculares que se desarrollan en esta región.
11. Los patrones temporal y espacial de la expresión pre-natal de *RSPO1*, *WNT4* y *FST* son coherentes con la falta de inhibición de los eventos propios del desarrollo testicular que tienen lugar en la gónada XX de *Talpa*. Los patrones de expresión post-natal de estos genes sugieren una posible implicación de los mismos en el inicio de la meiosis.
12. La diferenciación de células mioides peritubulares ocurre de forma similar en las gónadas XY y XX de topo, aunque en períodos distintos, que corren paralelos al desarrollo de los respectivos tejidos testiculares en los individuos de cada sexo: entre los estadios s6 y s9 en los machos y entre s9 y s11 en las hembras.
13. El proceso de vaculogénesis del tejido testicular en machos y hembras de topo ocurre de manera similar a la descrita en ratón, aunque en el caso de la gónada femenina se produce en estadios post-natales del desarrollo.
14. El sistema vascular del tejido testicular es más profuso y abundante que el del tejido ovárico, tanto en topo (XX y XY) como en ratón.
15. La formación de cordones medulares en las gónadas de topo viene precedida por un proceso de migración de células mesonefricas hacia el interior de la gónada en ambos sexos, aunque dicha migración no más intensa en la gónada XY.

7.2. Conclusions

1. According to their respective expression profiles, *SOX9*, *FGF9*, *PTGDS* and *DHH* do not participate in any of the processes of testicular development that take place in the medullary region of the XX gonad of *Talpa occidentalis*.
2. *FGF9*, like *SOX9* and *AMH*, initiates its expression very early in the gonad of male moles, at the s4b stages, three days before the formation of testicular cords at s5b, when the transcription levels significantly lower. This expression profile suggests that *FGF9* is not involved in cord formation and that it is necessary to support *SOX9* expression in previous stages.
3. The expression patterns of *DHH* and *PTGDS* are consistent with a role in the formation of the testicular cords of XY gonads.
4. The lack of *DHH* expression in the medullary region of the mole ovotestis explains the absence of adult-type Leydig cells and the maintenance of the

7. Conclusiones

fetal-type Leydig cell population, whose differentiation does not depend of the DHH/PTCH1 pathway.

5. The expression patterns of *FGF9* and *PTGDS* indicate that the FGF9/SOX9 and PTGDS/SOX9 feedback loops occur sequentially, the later replacing their first one.
6. The increase of *SOX9* expression levels during postnatal development of the mole testis seems to be associated to low seric levels of androgens at weaning and marks the end of the infantile period.
7. The translocation of AR from the cytoplasm to the nucleus in Sertoli cells of the mole XY gonad is associated with high levels of testosterone after birth. In the gonads of female moles, which lack testosterone in that period, this translocation does not occur in the cells of the medullary spherules.
8. There are two different subpopulations of cells coming from the coelomic epithelium in the mole XX gonads: epithelial cells expressing *WNT4* y *FST* and located inside the cortical cords, and mesenchymal cells expressing *WNT4* and *FOXL2* and located in the interstitial spaces between these cords. Contrary to the classic hypothesis assumed until now, the later are actually the precursors of follicle cells.
9. Cells composing the medullary spherules of the XX gonad, which come from projections of cortical cords in to the medulla, begin to express *FOXL2* just when they reach the medullary domain. This fact suggests a possible inhibitory effect of *FOXL2* expression, exerted by germ cells over somatic cortical cells.
10. Expression of *FOXL2* in the medullary region of XX gonad does not inhibit any of the testicular structures developed in this region.
11. The spatio-temporal pattern of pre-natal expression of *RSPO1*, *WNT4* y *FST* are consistent with the lack of inhibition of the specific testicular events observed in the XX gonads of *Talpa* moles. The post-natal expression patterns of these genes suggest a possible role in meiosis onset.
12. Peritubular mioid cell differentiation is similar in both XY and XX gonads of the mole, but in a different timing, parallel in each case to the development of their respective testicular tissues: between stages s6 and s9 in males and between s9 y s11 in females.
13. Vasculogenesis of the testicular tissue of both male and female moles is very similar to that described in the mouse, although in the female moles it occurs in post-natal stages of development.
14. The vascular system of testicular tissue is more abundant and profuse than that of the ovarian tissue, in both moles (XX and XY) and mice.

15. The formation of medullary cords in gonads of male and female moles is preceded by migration of mesonephric cells into the gonad, although the process is more intense in the XY gonad.

7. Conclusiones

Bibliografía

- Achermann J., Ito M., Ito M., Hindmarsh P. and Jameson J. (1999) A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet*, **22**:125–6.
- Achermann J., Ito M., Silverman B., Habiby R., Pang S., Rosler A. and Jameson J. (2001) Missense mutations cluster within the carboxyl-terminal region of DAX-1 and impair transcriptional repression. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**:3171–5.
- Achermann J., Ozisik G., Ito M., Orun U., Harmanci K., Gurakan B. and 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**:1829–33.
- Adams I. and McLaren A. (2002) Sexually dimorphic development of mouse primordial germ cells: switching from oogenesis to spermatogenesis. *Development*, **129**:1155–64.
- Akiyama H., Lyons J., Mori-Akiyama Y., Yang X., Zhang R., Zhang Z., Deng J., Taketo M., Nakamura T., Behringer R., McCrea P. and de Crombrughe B. (2004) Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev*, **18**:1072–87.
- Al-Attar L., Noel K., Dutertre M., Belville C., Forest M., Burgoyne P., Josso N. and Rey R. (1997) Hormonal and cellular regulation of Sertoli cell anti-Mullerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest*, **100**:1335–43.
- Albrecht K. and Eicher E. (2001) Evidence that Sry is expressed in pre-Sertoli cells and Sertoli and granulosa cells have a common precursor. *Dev Biol*, **240**:92–107.
- Allan D., Harmon B. and Kerr J. (1987) *Perspectives on Mammalian Cell Death*, chap. Cell death in spermatogenesis., pp. 229–258. London: Oxford University Press.
- Alonso C., Maxton-Kuechenmeister J. and Akam M. (2001) Evolution of Ftz protein function in insects. *Curr Biol*, **11**:1473–8.
- Altincicek B., Tenbaum S., Dressel U., Thormeyer D., Renkawitz R. and 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**:7662–7.
- Anttonen M., Ketola I., Parviainen H., Pusa A. and Heikinheimo M. (2003) FOG-2 and GATA-4 Are coexpressed in the mouse ovary and can modulate mullerian-inhibiting substance expression. *Biol Reprod*, **68**:1333–40.
- Aoyama S., Shibata K., Tokunaga S., Takase M., Matsui K. and Nakamura M. (2003) Expression of Dmrt1 protein in developing and in sex-reversed gonads of amphibians. *Cytogenet Genome Res*, **101**:295–301.
- Arango N., Lovell-Badge R. and Behringer R. (1999) Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*, **99**:409–19.
- Argentaro A., Sim H., Kelly S., Preiss S., Clayton A., Jans D. and Harley V. (2003) A SOX9 defect of calmodulin-dependent nuclear import in campomelic dysplasia/autosomal sex reversal. *J Biol Chem*, **278**:33839–47.
- Armstrong J., Pritchard-Jones K., Bickmore W., Hastie N. and Bard J. (1993) The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev*, **40**:85–97.

Bibliografia

- Austin C. and Edwards R. (1981) *Mechanism of sex differentiation in animals and man*. Academic Press Inc, London.
- Bae D., Schaefer M., Partan B. and 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**:3921–7.
- Bagheri-Fam S., Sim H., Bernard P., Jayakody I., Taketo M.M., Scherer G. and Harley V.R. (2008) Loss of fgfr2 leads to partial xy sex reversal. *Dev Biol*, **314**:71–83.
- Baird P., Groves N., Haber D., Housman D. and Cowell J. (1992) Identification of mutations in the WT1 gene in tumours from patients with the WAGR syndrome. *Oncogene*, **7**:2141–9.
- Balciuniene J., Bardwell V.J. and Zarkower D. (2006) Mice mutant in the dm domain gene dmrt4 are viable and fertile but have polyovular follicles. *Mol Cell Biol*, **26**:8984–8991.
- Barboux S., Niaudet P., Gubler M., Grunfeld J., Jaubert F., Kuttem F., Fekete C., Souleyreau-Therville N., Thibaud E., Fellous M. and McElreavey K. (1997) Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat Genet*, **17**:467–70.
- Bardoni B., Zanaria E., Guioli S., Florida G., Worley K., Tonini G., Ferrante E., Chiumello G., McCabe E., Fraccaro M. and et al. (1994) A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet*, **7**:497–501.
- Barnhart K. and Mellon P. (1994) The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. *Mol Endocrinol*, **8**:878–85.
- Baron D., Cocquet J., Xia X., Fellous M., Guiguen Y. and Veitia R.A. (2004) An evolutionary and functional analysis of foxl2 in rainbow trout gonad differentiation. *J Mol Endocrinol*, **33**:705–715.
- Barrionuevo F., Bagheri-Fam S., Klattig J., Kist R., Taketo M., Englert C. and Scherer G. (2006) Homozygous inactivation of Sox9 causes complete XY sex reversal in mice. *Biol Reprod*, **74**:195–201.
- Barrionuevo F., Georg I., Scherthan H., Lécureuil C., Guillou F., Wegner M. and Scherer G. (2009) Testis cord differentiation after the sex determination stage is independent of sox9 but fails in the combined absence of sox9 and sox8. *Dev Biol*, **327**:301–312.
- Barrionuevo F., Zurita F., Burgos M. and Jimenez R. (2004a) Developmental stages and growth rate of the mole *Talpa occidentalis* (Insectivora, Mammalia). *J Mammal*, **85**:120–25.
- Barrionuevo F., Zurita F., Burgos M. and Jimenez R. (2004b) Testis-like development of gonads in female moles. New insights on mammalian gonad organogenesis. *Dev Biol*, **268**:39–52.
- Barrios F., Filipponi D., Pellegrini M., Paronetto M.P., Siena S.D., Geremia R., Rossi P., Felici M.D., Jannini E.A. and Dolci S. (2010) Opposing effects of retinoic acid and fgf9 on nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *J Cell Sci*, **123**:871–880.
- Barsoum I.B., Bingham N.C., Parker K.L., Jorgensen J.S. and Yao H.H.C. (2009) Activation of the hedgehog pathway in the mouse fetal ovary leads to ectopic appearance of fetal leydig cells and female pseudohermaphroditism. *Dev Biol*, **329**:96–103.
- Batista F., Vaiman D., Dausset J., Fellous M. and Veitia R.A. (2007) Potential targets of foxl2, a transcription factor involved in craniofacial and follicular development, identified by transcriptomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**:3330–3335.
- Behringer R., Cate R., Froelick G., Palmiter R. and Brinster R. (1990) Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature*, **345**:167–70.
- Bell D., Leung K., Wheatley S., Ng L., Zhou S., Ling K., Sham M., Koopman P., Tam P. and Cheah K. (1997) SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet*, **16**:174–8.
- Benayoun B.A., Auer J., Caburet S. and Veitia R.A. (2008) The post-translational modification profile of the forkhead transcription factor foxl2 suggests the existence of

- parallel processive/concerted modification pathways. *Proteomics*, **8**:3118–3123.
- Benayoun B.A., Batista F., Auer J., Dipietromaria A., L'Hôte D., Baere E.D. and Veitia R.A. (2009) Positive and negative feedback regulates the transcription factor *foxl2* in response to cell stress: evidence for a regulatory imbalance induced by disease-causing mutations. *Hum Mol Genet*, **18**:632–644.
- Bennett C., Docherty Z., Robb S., Ramani P., Hawkins J. and Grant D. (1993) Deletion 9p and sex reversal. *J Med Genet*, **30**:518–20.
- Bergstrom D., Young M., Albrecht K. and Eicher E. (2000) Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis*, **28**:111–24.
- Bernard P., Tang P., Liu S., Dewing P., Harley V. and Vilain E. (2003) Dimerization of SOX9 is required for chondrogenesis, but not for sex determination. *Hum Mol Genet*, **12**:1755–65.
- Berta P., Hawkins J., Sinclair A., Taylor A., Griffiths B., Goodfellow P. and Fellous M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, **348**:448–50.
- Bi W., Huang W., Whitworth D., Deng J., Zhang Z., Behringer R. and de Crombrughe B. (2001) Haploinsufficiency of *Sox9* results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**:6698–703.
- Biason-Laubert A. and Konrad D. (2008) *Wnt4* and sex development. *Sex Dev*, **2**:210–218.
- Biason-Laubert A., Konrad D., Navratil F. and Schoenle E. (2004) A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med*, **351**:792–8.
- Biason-Laubert A. and 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**:1563–8.
- Bickmore W., Oghene K., Little M., Seawright A., van Heyningen V. and Hastie N. (1992) Modulation of DNA binding specificity by alternative splicing of the Wilms tumor *wt1* gene transcript. *Science*, **257**:235–7.
- Bishop C., Whitworth D., Qin Y., Agoulnik A., Agoulnik I., Harrison W., Behringer R. and Overbeek P. (2000) A transgenic insertion upstream of *sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet*, **26**:490–4.
- Bitgood M. and McMahon A. (1995) Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, **172**:126–38.
- Bitgood M., Shen L. and McMahon A. (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol*, **6**:298–304.
- Blount A.L., Schmidt K., Justice N.J., Vale W.W., Fischer W.H. and Bilezikjian L.M. (2009) *Foxl2* and *smad3* coordinately regulate follistatin gene transcription. *J Biol Chem*, **284**:7631–7645.
- Bouma G., Albrecht K., Washburn L., Recknagel A., Churchill G. and Eicher E. (2005) Gonadal sex reversal in mutant *Dax1* XY mice: a failure to upregulate *Sox9* in pre-Sertoli cells. *Development*, **132**:3045–54.
- Bouma G.J., Washburn L.L., Albrecht K.H. and Eicher E.M. (2007) Correct dosage of *fog2* and *gata4* transcription factors is critical for fetal testis development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**:14994–14999.
- Bowles J., Knight D., Smith C., Wilhelm D., Richman J., Mamiya S., Yashiro K., Chawengsaksophak K., Wilson M., Rossant J., Hamada H. and Koopman P. (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science*, **312**:596–600.
- Bowles J., Schepers G. and Koopman P. (2000) Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, **227**:239–55.
- Bradford S.T., Hiramatsu R., Maddugoda M.P., Bernard P., Chaboissier M.C., Sinclair A., Schedl A., Harley V., Kanai Y.,

Bibliografía

- Koopman P. and Wilhelm D. (2009) The cerebellin 4 precursor gene is a direct target of *sry* and *sox9* in mice. *Biol Reprod*, **80**:1178–1188.
- Brennan J. and Capel B. (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet*, **5**:509–21.
- Brennan J., Karl J. and Capel B. (2002) Divergent vascular mechanisms downstream of *Sry* establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol*, **244**:418–28.
- Brennan J., Tilmann C. and Capel B. (2003) *Pdgfr*-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev*, **17**: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-Ajusch E., Haaf T., Ropers H., Shima A., Schmid M., Kalscheuer V. and 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**:8–17.
- Buehr M., Gu S. and McLaren A. (1993) Mesonephric contribution to testis differentiation in the fetal mouse. *Development*, **117**:273–81.
- Bullejos M., Bowles J. and Koopman P. (2002) Extensive vascularization of developing mouse ovaries revealed by caveolin-1 expression. *Dev Dyn*, **225**:95–99.
- Bullejos M. and Koopman P. (2001) Spatially dynamic expression of *Sry* in mouse genital ridges. *Dev Dyn*, **221**:201–5.
- Burtis K. and Baker B. (1989) Drosophila doublesex gene controls somatic sexual differentiation by producing alternatively spliced mRNAs encoding related sex-specific polypeptides. *Cell*, **56**:997–1010.
- Byskov A.G. (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev*, **66**:71–117.
- Cabrera A. (1914) *Fauna ibérica. Mamíferos*. Nac Cienc Nat. Madrid.
- Cadigan K. and Nusse R. (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, **11**:3286–305.
- Call K., Glaser T., Ito C., Buckler A., Pelletier J., Haber D., Rose E., Kral A., Yeger H., Lewis W. and et al. (1990) Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, **60**:509–20.
- Camerino G., Parma P., Radi O. and Valentini S. (2006) Sex determination and sex reversal. *Curr Opin Genet Dev*, **16**:289–92.
- Canning C. and Lovell-Badge R. (2002) *Sry* and sex determination: how lazy can it be? *Trends Genet*, **18**:111–3.
- Canto P., Soderlund D., Reyes E. and Mendez J. (2004) Mutations in the desert hedgehog (*DHH*) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**:4480–3.
- Canto P., Vilchis F., Soderlund D., Reyes E. and Mendez J. (2005) A heterozygous mutation in the desert hedgehog gene in patients with mixed gonadal dysgenesis. *Mol Hum Reprod*, **11**:833–6.
- Capel B., Albrecht K., Washburn L. and Eicher E. (1999) Migration of mesonephric cells into the mammalian gonad depends on *Sry*. *Mech Dev*, **84**:127–31.
- Caricasole A., Duarte A., Larsson S., Hastie N., Little M., Holmes G., Todorov I. and Ward A. (1996) RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**:7562–6.
- Carmona F.D., Lupiáñez D.G., Martín J.E., Burgos M., Jiménez R. and Zurita F. (2009a) The spatio-temporal pattern of testis organogenesis in mammals - insights from the mole. *Int J Dev Biol*, **53**:1035–1044.
- Carmona F.D., Lupiáñez D.G., Real F.M., Burgos M., Zurita F. and Jiménez R. (2009b) *Sox9* is not required for the cellular events of testicular organogenesis in xx mole ovotestes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **312**:734–748.

- Carmona F.D., Motokawa M., Tokita M., Tsuchiya K., Jiménez R. and Sánchez-Villagra M.R. (2008) The evolution of female mole ovotestes evidences high plasticity of mammalian gonad development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **310**:259–266.
- Cate R., Mattaliano R., Hession C., Tizard R., Farber N., Cheung A., Ninfa E., Frey A., Gash D., Chow E. and 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**:685–98.
- Chaboissier M., Kobayashi A., Vidal V., Lutzkendorf S., van de Kant H., Wegner M., de Rooij D., Behringer R. and Schedl A. (2004) Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development*, **131**:1891–901.
- Chadi S., Buscara L., Pechoux C., Costa J., Laubier J., Chaboissier M.C., Pailhoux E., Vilotte J.L., Chanat E. and Provost F.L. (2009) R-spondin1 is required for normal epithelial morphogenesis during mammary gland development. *Biochem Biophys Res Commun*, **390**:1040–1043.
- Chai C. and Chan W. (2000) Developmental expression of a novel Ftz-F1 homologue, fl1b (NR5A4), in the zebrafish *Danio rerio*. *Mech Dev*, **91**:421–6.
- Chandra H. (1984) A model for mammalian male determination based on a passive Y chromosome. *Mol Gen Genet*, **193**:384–8.
- Chandra H. (1985) Sex determination: a hypothesis based on noncoding DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**:1165–9.
- Chang H., Gao F., Guillou F., Taketo M.M., Huff V. and Behringer R.R. (2008) Wt1 negatively regulates beta-catenin signaling during testis development. *Development*, **135**:1875–1885.
- Chassot A.A., Gregoire E.P., Magliano M., Lavery R. and Chaboissier M.C. (2008a) Genetics of ovarian differentiation: Rspo1, a major player. *Sex Dev*, **2**:219–227.
- Chassot A.A., Ranc F., Gregoire E.P., Roepers-Gajadien H.L., Taketo M.M., Camerino G., de Rooij D.G., Schedl A. and Chaboissier M.C. (2008b) Activation of beta-catenin signaling by rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet*, **17**:1264–1277.
- Chen J.Z., Wang S., Tang R., Yang Q.S., Zhao E., Chao Y., Ying K., Xie Y. and Mao Y.M. (2002) Cloning and identification of a cDNA that encodes a novel human protein with thrombospondin type I repeat domain, hpwtsr. *Mol Biol Rep*, **29**:287–292.
- Cheng G., Weihua Z., Mäkinen S., Mäkelä S., Saji S., Warner M., Gustafsson J.A. and Hovatta O. (2002) A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod*, **66**:77–84.
- Chiang E., Pai C., Wyatt M., Yan Y., Postlethwait J. and Chung B. (2001) Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev Biol*, **231**:149–63.
- Choi Y. and Rajkovic A. (2006) Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell Mol Life Sci*, **63**:579–590.
- Clark A., Garland K. and 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**:1825–38.
- Cocquet J., Baere E.D., Gareil M., Pannetier M., Xia X., Fellous M. and Veitia R.A. (2003) Structure, evolution and expression of the foxl2 transcription unit. *Cytogenet Genome Res*, **101**:206–211.
- Cocquet J., Pailhoux E., Jaubert F., Servel N., Xia X., Pannetier M., Baere E.D., Messiaen L., Cotinot C., Fellous M. and Veitia R.A. (2002) Evolution and expression of foxl2. *J Med Genet*, **39**:916–921.
- Cohen E., Mariol M., Wallace R., Weyers J., Kamberov Y., Pradel J. and Wilder E. (2002) DWnt4 regulates cell movement and focal adhesion kinase during *Drosophila* ovarian morphogenesis. *Dev Cell*, **2**:437–48.
- Cohen-Haguenaer O., Picard J., Mattei M., Serero S., Nguyen V., de Tand M., Guerrier D., Hors-Cayla M., Josso N. and Frezal

Bibliografía

- J. (1987) Mapping of the gene for anti-mullerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet*, **44**:2–6.
- Colvin J., Feldman B., Nadeau J., Goldfarb M. and Ornitz D. (1999) Genomic organization and embryonic expression of the mouse fibroblast growth factor 9 gene. *Dev Dyn*, **216**:72–88.
- Colvin J., Green R., Schmahl J., Capel B. and Ornitz D. (2001a) Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, **104**:875–89.
- Colvin J., White A., Pratt S. and Ornitz D. (2001b) Lung hypoplasia and neonatal death in Fgf9-null mice identify this gene as an essential regulator of lung mesenchyme. *Development*, **128**:2095–106.
- Combes A.N., Wilhelm D., Davidson T., Dejana E., Harley V., Sinclair A. and Koopman P. (2009) Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol*, **326**:112–120.
- Cool J., Carmona F.D., Szucsik J.C. and Capel B. (2008) Peritubular myoid cells are not the migrating population required for testis cord formation in the xy gonad. *Sex Dev*, **2**:128–133.
- Cool J., DeFalco T.J. and Capel B. (2011) Vascular-mesenchymal cross-talk through vegf and pdgf drives organ patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**:167–172.
- Correa R., Domenice S., Bingham N., Billerbeck A., Rainey W., Parker K. and 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**:1767–72.
- Coveney D., Cool J., Oliver T. and Capel B. (2008) Four-dimensional analysis of vascularization during primary development of an organ, the gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:7212–7217.
- Crawford P., Dorn C., Sadovsky Y. and Milbrandt J. (1998) Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol*, **18**:2949–56.
- Crews D. (1993) The organizational concept and vertebrates without sex chromosomes. *Brain Behav Evol*, **42**:202–14.
- Crews D. (1994) Temperature, steroids and sex determination. *J Endocrinol*, **142**:1–8.
- Crispino J., Lodish M., Thurberg B., Litovsky S., Collins T., Molkentin J. and Orkin S. (2001) Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev*, **15**: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. and Pilia G. (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet*, **27**:159–66.
- Dadhich R.K. (2008) *Genetic control of seasonal reproductive cycle in Talpa occidentalis*. Ph.D. thesis, Universidad de Granada.
- Dadhich R.K., Barrionuevo F.J., Lupiáñez D.G., Real F.M., Burgos M. and Jiménez R. (2011) Expression of genes controlling testicular development in adult testis of the seasonally breeding iberian mole.
- Dadhich R.K., Real F.M., Zurita F., Barrionuevo F.J., Burgos M. and Jiménez R. (2010) Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: a study in the iberian mole, talpa occidentalis. *Biol Reprod*, **83**:83–91.
- 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. and Van Doren M. (2003) Sex-specific apoptosis regulates sexual dimorphism in the Drosophila embryonic gonad. *Dev Cell*, **5**:205–16.
- De Grandi A., Calvari V., Bertini V., Bulfone A., Peverali G., Camerino G., Borsani G. and Guioli S. (2000) The expression pattern of a mouse doublesex-related gene is consistent with a role in gonadal differentiation. *Mech Dev*, **90**:323–6.

- De Santa Barbara P., Bonneaud N., Boizet B., Desclozeaux M., Moniot B., Sudbeck P., Scherer G., Poulat F. and Berta P. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol*, **18**:6653–65.
- De Santa Barbara P., Moniot B., Poulat F. and Berta P. (2000) Expression and subcellular localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH proteins during early human testicular development. *Dev Dyn*, **217**:293–8.
- Deconinck A., Mead P., Tevosian S., Crispino J., Katz S., Zon L. and Orkin S. (2000) FOG acts as a repressor of red blood cell development in *Xenopus*. *Development*, **127**:2031–40.
- DeFalco T. and Capel B. (2009) Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **25**:457–482.
- Denef N., Neubüser D., Perez L. and Cohen S.M. (2000) Hedgehog induces opposite changes in turnover and subcellular localization of patched and smoothened. *Cell*, **102**:521–531.
- Denys P., Malvaux P., Van Den Berghe H., Tanghe W. and Proesmans W. (1967) [Association of an anatomo-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism]. *Arch Fr Pediatr*, **24**:729–39.
- Desclozeaux M., Poulat F., de Santa Barbara P., Capony J., Turowski P., Jay P., Mejean C., Moniot B., Boizet B. and Berta P. (1998) Phosphorylation of an N-terminal motif enhances DNA-binding activity of the human SRY protein. *J Biol Chem*, **273**:7988–95.
- DiNapoli L., Batchvarov J. and Capel B. (2006) FGF9 promotes survival of germ cells in the fetal testis. *Development*, **133**:1519–27.
- Drab M., Verkade P., Elger M., Kasper M., Lohn M., Lauterbach B., Menne J., Lindschau C., Mende F., Luft F.C., Schedl A., Haller H. and Kurzchalia T.V. (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*, **293**:2449–2452.
- Drash A., Sherman F., Hartmann W. and Blizzard R. (1970) A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr*, **76**:585–93.
- Drevet J., Skeiky Y. and Iatrou K. (1994) GATA-type zinc finger motif-containing sequences and chorion gene transcription factors of the silkworm *Bombyx mori*. *J Biol Chem*, **269**:10660–7.
- Drummond A.E., Tellbach M., Dyson M. and Findlay J.K. (2007) Fibroblast growth factor-9, a local regulator of ovarian function. *Endocrinology*, **148**:3711–3721.
- Durlinger A.L., Grijters M.J., Kramer P., Karels B., Kumar T.R., Matzuk M.M., Rose U.M., de Jong F.H., Uilenbroek J.T., Grootegoed J.A. and Themmen A.P. (2001) Anti-müllerian hormone attenuates the effects of fsh on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, **142**:4891–4899.
- Durlinger A.L., Kramer P., Karels B., Grootegoed J.A., Uilenbroek J.T. and Themmen A.P. (2000) Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of preovulatory follicles in the rat. *Hum Reprod*, **15**:2504–2511.
- Eicher E. and Washburn L. (1986) Genetic control of primary sex determination in mice. *Annu Rev Genet*, **20**:327–60.
- Eicher E., Washburn L., Schork N., Lee B., Shown E., Xu X., Dredge R., Pringle M. and Page D. (1996) Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet*, **14**:206–9.
- Eicher E., Washburn L., Whitney 3rd J. and Morrow K. (1982) Mus poschiavinus Y chromosome in the C57BL/6J murine genome causes sex reversal. *Science*, **217**:535–7.
- Elejalde B., Opitz J., de Elejalde M., Gilbert E., Abellera M., Meisner L., Lebel R. and 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**:723–30.
- Ellsworth B.S., Burns A.T., Escudero K.W., Duval D.L., Nelson S.E. and Clay C.M.

Bibliografia

- (2003) The gonadotropin releasing hormone (gnrh) receptor activating sequence (gras) is a composite regulatory element that interacts with multiple classes of transcription factors including smads, ap-1 and a forkhead dna binding protein. *Mol Cell Endocrinol*, **206**:93–111.
- Ellsworth B.S., Egashira N., Haller J.L., Butts D.L., Cocquet J., Clay C.M., Osamura R.Y. and Camper S.A. (2006) Foxl2 in the pituitary: molecular, genetic, and developmental analysis. *Mol Endocrinol*, **20**:2796–2805.
- Eppig J.J. (1991) Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biol Reprod*, **45**:824–830.
- Faber P.W., van Rooij H.C., van der Korput H.A., Baarends W.M., Brinkmann A.O., Grootegoed J.A. and Trapman J. (1991) Characterization of the human androgen receptor transcription unit. *J Biol Chem*, **266**:10743–10749.
- Fan H.Y. and Sun Q.Y. (2004) Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*, **70**:535–547.
- Ferrari S., Harley V., Pontiggia A., Goodfellow P., Lovell-Badge R. and Bianchi M. (1992) SRY, like HMG1, recognizes sharp angles in DNA. *EMBO J*, **11**:4497–506.
- Flejter W., Fergestad J., Gorski J., Varvill T. and Chandrasekharappa S. (1998) A gene involved in XY sex reversal is located on chromosome 9, distal to marker D9S1779. *Am J Hum Genet*, **63**:794–802.
- Fleming A., Wibbels T., Skipper J. and Crews D. (1999) Developmental expression of steroidogenic factor 1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Gen Comp Endocrinol*, **116**:336–46.
- Ford C., Jones K., Polani P., De Almeida J. and Briggs J. (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet*, **1**:711–3.
- Forwood J., Harley V. and 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**:46575–82.
- Fossett N., Tevosian S., Gajewski K., Zhang Q., Orkin S. and 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**:7342–7.
- Foster J., Dominguez-Steglich M., Guioli S., Kowk G., Weller P., Stevanovic M., Weisenbach J., Mansour S., Young I., Goodfellow P. and et al. (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature*, **372**:525–30.
- Fox A., Liew C., Holmes M., Kowalski K., Mackay J. and Crossley M. (1999) Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J*, **18**:2812–22.
- Fröjdman K., Paranko J., Kuopio T. and Pelliniemi L.J. (1989) Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int J Dev Biol*, **33**:99–103.
- Gao F., Maiti S., Alam N., Zhang Z., Deng J., Behringer R., Lecureuil C., Guillou F. and 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**:11987–92.
- Gao S., Zhang T., Zhou X., Zhao Y., Li Q., Guo Y., Cheng H. and 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**:476–83.
- Garces A., Nishimune H., Philippe J., Pettmann B. and deLapeyriere O. (2000) FGF9: a motoneuron survival factor expressed by medial thoracic and sacral motoneurons. *J Neurosci Res*, **60**:1–9.
- Gasca S., Canizares J., De Santa Barbara P., Mejean C., Poulat F., Berta P. and 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**:11199–204.

- Gelmann E.P. (2002) Molecular biology of the androgen receptor. *J Clin Oncol*, **20**:3001–3015.
- Gerena R.L., Eguchi N., Urade Y. and Killian G.J. (2000) Stage and region-specific localization of lipocalin-type prostaglandin synthase in the adult murine testis and epididymis. *J Androl*, **21**:848–854.
- Gessler M., Konig A. and Bruns G. (1992) The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics*, **12**:807–13.
- Giese K., Cox J. and Grosschedl R. (1992) The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, **69**:185–95.
- Giese K., Pagel J. and 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**:3368–72.
- Gill A., Jamnongjit M. and Hammes S.R. (2004) Androgens promote maturation and signaling in mouse oocytes independent of transcription: a release of inhibition model for mammalian oocyte meiosis. *Mol Endocrinol*, **18**:97–104.
- 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.
- Giuli G., Shen W. and Ingraham H. (1997) The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Mullerian Inhibiting Substance, in vivo. *Development*, **124**:1799–807.
- Govoroun M.S., Pannetier M., Pailhoux E., Cocquet J., Brillard J.P., Couty I., Battelier F. and Cotinot C. (2004) Isolation of chicken homolog of the foxl2 gene and comparison of its expression patterns with those of aromatase during ovarian development. *Dev Dyn*, **231**:859–870.
- Guan G., Kobayashi T. and 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**:662–6.
- Gubbay J., Collignon J., Koopman P., Capel B., Economou A., Munsterberg A., Vivian N., Goodfellow P. and 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**:245–50.
- Guellaen G., Casanova M., Bishop C., Geldwerth D., Andre G., Fellous M. and Weissenbach J. (1984) Human XX males with Y single-copy DNA fragments. *Nature*, **307**:172–3.
- Guigon C.J., Coudouel N., Mazaud-Guittot S., Forest M.G. and Magre S. (2005) Follicular cells acquire sertoli cell characteristics after oocyte loss. *Endocrinology*, **146**:2992–3004.
- Guigon C.J. and Magre S. (2006) Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biol Reprod*, **74**:450–458.
- Guioli S., Schmitt K., Critcher R., Bouzyk M., Spurr N., Ogata T., Hoo J., Pinsky L., Gimelli G., Pasztor L. and 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**:905–8.
- Gulino A., Marcotullio L.D., Ferretti E., Smaele E.D. and Screpanti I. (2007) Hedgehog signaling pathway in neural development and disease. *Psychoneuroendocrinology*, **32 Suppl 1**:S52–S56.
- Guo Q., Kumar T.R., Woodruff T., Hadsell L.A., DeMayo F.J. and Matzuk M.M. (1998) Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol*, **12**:96–106.
- Guo W., Lovell R., Zhang Y., Huang B., Burris T., Craigen W. and McCabe E. (1996) Ahch, the mouse homologue of DAX1: cloning, characterization and synteny with GyK, the glycerol kinase locus. *Gene*, **178**:31–4.
- Gurates B., Amsterdam A., Tamura M., Yang S., Zhou J., Fang Z., Amin S., Sebastian S. and Bulun S. (2003) WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom

Bibliografía

- gene expression in gonadal cells. *Mol Cell Endocrinol*, **208**:61–75.
- Gálvez B.G., Matías-Román S., Albar J.P., Sánchez-Madrid F. and Arroyo A.G. (2001) Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling. *J Biol Chem*, **276**:37491–37500.
- Haber D., Sohn R., Buckler A., Pelletier J., Call K. and Housman D. (1991) Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**:9618–22.
- Habert R., Lejeune H. and Saez J. (2001) Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol*, **179**:47–74.
- Hacker A., Capel B., Goodfellow P. and Lovell-Badge R. (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development*, **121**:1603–14.
- Haigh J. and Nagy A. (2004) Whole mount analysis of the embryonic vasculature. In H. Augustin, ed., *Methods in Endothelial Cell Biology. Series : Springer Lab Manuals*, pp. 325–336.
- Hammerschmidt M., Brook A. and McMahon A.P. (1997) The world according to hedgehog. *Trends Genet*, **13**:14–21.
- Hammes A., Guo J., Lutsch G., Leheste J., Landrock D., Ziegler U., Gubler M. and Schedl A. (2001) Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell*, **106**:319–29.
- Hammes S.R. (2004) Steroids and oocyte maturation—a new look at an old story. *Mol Endocrinol*, **18**:769–775.
- Hanley N., Ball S., Clement-Jones M., Hagan D., Strachan T., Lindsay S., Robson S., Ostrer H., Parker K. and Wilson D. (1999) Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev*, **87**: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. and Wilson D. (2000) SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev*, **91**:403–7.
- Haqq C., Lee M., Tizard R., Wysk M., DeMarinis J., Donahoe P. and Cate R. (1992) Isolation of the rat gene for Mullerian inhibiting substance. *Genomics*, **12**:665–9.
- Harley V., Jackson D., Hextall P., Hawkins J., Berkovitz G., Sockanathan S., Lovell-Badge R. and Goodfellow P. (1992) DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. *Science*, **255**:453–6.
- Harley V., Layfield S., Mitchell C., Forwood J., John A., Briggs L., McDowall S. and 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**:7045–50.
- Harley V., Lovell-Badge R. and Goodfellow P. (1994) Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res*, **22**:1500–1.
- Harley V., Lovell-Badge R., Goodfellow P. and Hextall P. (1996) The HMG box of SRY is a calmodulin binding domain. *FEBS Lett*, **391**:24–8.
- Hasegawa T., Fukami M., Sato N., Katsumata N., Sasaki G., Fukutani K., Morohashi K. and 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**:5930–5.
- Hatano O., Takayama K., Imai T., Waterman M., Takakusu A., Omura T. and 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**:2787–97.
- Hawkins J. (1993) Mutational analysis of SRY in XY females. *Hum Mutat*, **2**:347–50.
- Hawkins J., Taylor A., Berta P., Levilliers J., Van der Auwera B. and Goodfellow P. (1992) Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet*, **88**:471–4.

- He X., Semenov M., Tamai K. and Zeng X. (2004) Ldl receptor-related proteins 5 and 6 in wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, **131**:1663–1677.
- Heemers H.V. and Tindall D.J. (2007) Androgen receptor (ar) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the ar transcriptional complex. *Endocr Rev*, **28**:778–808.
- Heikinheimo M., Ermolaeva M., Bielinska M., Rahman N., Narita N., Huhtaniemi I., Tapanainen J. and Wilson D. (1997) Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology*, **138**:3505–14.
- Hernández-Bello R., Bermúdez-Cruz R.M., Fonseca-Liñán R., García-Reyna P., Guerhier F.L., Boireau P. and Ortega-Pierres G. (2008) Identification, molecular characterisation and differential expression of caveolin-1 in trichinella spiralis maturing oocytes and embryos. *Int J Parasitol*, **38**:191–202.
- Hiramatsu R., Matoba S., Kanai-Azuma M., Tsunekawa N., Katoh-Fukui Y., Kurohmaru M., Morohashi K.I., Wilhelm D., Koopman P. and Kanai Y. (2009) A critical time window of sry action in gonadal sex determination in mice. *Development*, **136**:129–138.
- Hirobe S., He W., Lee M. and Donahoe P. (1992) Mullerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology*, **131**:854–62.
- Hirshfield A.N. (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, **124**:43–101.
- Hnasko R. and Lisanti M.P. (2003) The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv*, **3**:445–464.
- Hobert O. and Westphal H. (2000) Functions of lim-homeobox genes. *Trends Genet*, **16**:75–83.
- Hodgkin J. (1992) Genetic sex determination mechanisms and evolution. *Bioessays*, **14**:253–261.
- von Hofsten J., Karlsson J., Jones I. and Olsson P. (2002) Expression and regulation of fushi tarazu factor-1 and steroidogenic genes during reproduction in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Biol Reprod*, **67**:1297–304.
- Hollyday M., McMahon J. and McMahon A. (1995) Wnt expression patterns in chick embryo nervous system. *Mech Dev*, **52**:9–25.
- Holmes M., Turner J., Fox A., Chisholm O., Crossley M. and Chong B. (1999) hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the co-repressor mCtBP2 and modulates GATA-mediated activation. *J Biol Chem*, **274**:23491–8.
- Hoo J., Salafsky I., Lin C. and Pinsky L. (1989) Possible location of a recessive testis forming gene on 9p24. *Am J Hum Genet, Suppl* **45**:A78.
- Houston C., Opitz J., Spranger J., Macpherson R., Reed M., Gilbert E., Herrmann J. and 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**:3–28.
- Hsu H., Lin G. and Chung B. (2003) Parallel early development of zebrafish interrenal glands and pronephros: differential control by wt1 and fl1b. *Development*, **130**:2107–16.
- Huang B., Wang S., Ning Y., Lamb A. and Bartley J. (1999) Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet*, **87**:349–53.
- Huang W., Heng H. and Liew C. (1996) Assignment of the human GATA4 gene to 8p23.1–p22 using fluorescence in situ hybridization analysis. *Cytogenet Cell Genet*, **72**:217–8.
- Hudson Q., Smith C. and Sinclair A. (2005) Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Dev Dyn*, **233**:1052–5.
- Huggins G., Bacani C., Boltax J., Aikawa R. and Leiden J. (2001) Friend of GATA 2 physically interacts with chicken ovalbumin upstream promoter-TF2

Bibliografia

- (COUP-TF2) and COUP-TF3 and represses COUP-TF2-dependent activation of the atrial natriuretic factor promoter. *J Biol Chem*, **276**:28029–36.
- Huret J., Leonard C., Forestier B., Rethore M. and Lejeune J. (1988) Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *J Med Genet*, **25**:741–9.
- Ikeda Y., Lala D., Luo X., Kim E., Moisan M. and Parker K. (1993) Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol*, **7**:852–60.
- Ikeda Y., Shen W., Ingraham H. and Parker K. (1994) Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol*, **8**:654–62.
- Ikeda Y., Swain A., Weber T., Hentges K., Zanaria E., Lalli E., Tamai K., Sassone-Corsi P., Lovell-Badge R., Camerino G. and Parker K. (1996) Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol*, **10**:1261–72.
- Ikeda Y., Takeda Y., Shikayama T., Mukai T., Hisano S. and 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**:363–76.
- Imbeaud S., Carré-Eusèbe D., Rey R., Belleville C., Josso N. and Picard J.Y. (1994) Molecular genetics of the persistent müllerian duct syndrome: a study of 19 families. *Hum Mol Genet*, **3**:125–131.
- Ingham P.W. and McMahon A.P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*, **15**:3059–3087.
- Ingraham H., Lala D., Ikeda Y., Luo X., Shen W., Nachtigal M., Abbud R., Nilson J. and Parker K. (1994) The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev*, **8**:2302–12.
- Ingraham H.A., Hirokawa Y., Roberts L.M., Mellon S.H., McGee E., Nachtigal M.W. and Visser J.A. (2000) Autocrine and paracrine müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction. *Recent Prog Horm Res*, **55**:53–67; discussion 67–8.
- Isotani A., Nakanishi T., Kobayashi S., Lee J., Chuma S., Nakatsuji N., Ishino F. and Okabe M. (2005) Genomic imprinting of xx spermatogonia and xx oocytes recovered from xx_i-_ixy chimeric testes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:4039–4044.
- Ito E., Toki T., Ishihara H., Ohtani H., Gu L., Yokoyama M., Engel J. and Yamamoto M. (1993) Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature*, **362**:466–8.
- Ito M., Masuda A., Yumoto K., Otomo A., Takahashi Y., Takamatsu N., Kanda H., Yamashita S. and Shiba T. (1998) cDNA cloning of a new member of the FTZ-F1 subfamily from a rainbow trout. *Biochim Biophys Acta*, **1395**:271–4.
- Ito M., Miyagishi M., Murata C., Kawasaki H., Baba T., Tachi C. and Taira K. (2006) Down-regulation of endogenous Wt1 expression by Sry transgene in the murine embryonic mesonephros-derived M15 cell line. *J Reprod Dev*, **52**:415–27.
- Ito M., Yu R. and 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**:1476–83.
- Itoh N. and Ornitz D. (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet*, **20**:563–9.
- Jacobs P. and Strong J. (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature*, **183**:302–3.
- Jager R., Anvret M., Hall K. and Scherer G. (1990) A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature*, **348**:452–4.
- Jamnongjit M., Gill A. and Hammes S.R. (2005) Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:16257–16262.

- Janosik (1885) Histologisch-embryologische untersuchungen über das urogenitalsystem. *Sitzungsber Kais Akad Wissensch Wien*, **91**:97–199.
- Jaubert F., Vasiliu V., Patey-Mariaud de Serre N., Auber F., Jeanpierre C., Gubler M., Nihoul-Fekete C. and Fellous M. (2003) Gonad development in Drash and Frasier syndromes depends on WT1 mutations. *Arkh Patol*, **65**:40–4.
- Jeays-Ward K., Dandonneau M. and Swain A. (2004) Wnt4 is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol*, **276**:431–40.
- Jeays-Ward K., Hoyle C., Brennan J., Dandonneau M., Alldus G., Capel B. and Swain A. (2003) Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*, **130**:3663–70.
- Jiang J. and Hui C.C. (2008) Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev Cell*, **15**:801–812.
- Jiménez R., Barrionuevo F. and 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.
- Jiménez R., Burgos M., Caballero L. and 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. and Díaz de la Guardia R. (1990) The reproductive cycle of *Talpa occidentalis* in the Southeastern Iberian Peninsula. *Act Ther*, **35**:165–169.
- Jiménez R., Burgos M., Sanchez A., Sinclair A., Alarcon F., Marin J., Ortega E. and Díaz de la Guardia R. (1993) Fertile females of the mole *Talpa occidentalis* are phenotypic intersexes with ovotestes. *Development*, **118**:1303–11.
- Jiménez R., Sanchez A., Burgos M. and Díaz de la Guardia R. (1996) Puzzling out the genetics of mammalian sex determination. *Trends Genet*, **12**:164–6.
- Jiménez R. (2009) Ovarian organogenesis in mammals: mice cannot tell us everything. *Sex Dev*, **3**:291–301.
- Jordan B., Mohammed M., Ching S., Delot E., Chen X., Dewing P., Swain A., Rao P., Elejalde B. and Vilain E. (2001) Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet*, **68**:1102–9.
- Jordan B., Shen J., Olaso R., Ingraham H. and 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**:10866–71.
- Josso N., Racine C., di Clemente N., Rey R. and Xavier F. (1998) The role of anti-müllerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol*, **145**:3–7.
- Jost A. (1947) Recherches sur la différenciation 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. and Vigier B. (1975) The prenatal development of bovine freemartins. In *Symposium on Intersexuality* (ed R. Reinborn). Berlin, Springer-Verlag, pp. 392–406.
- Kaipia A., Penttilä T.L., Shimasaki S., Ling N., Parvinen M. and Toppari J. (1992) Expression of inhibin beta a and beta b, follistatin and activin-a receptor messenger ribonucleic acids in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology*, **131**:2703–2710.
- Kallio P.J., Poukka H., Moilanen A., Jänne O.A. and Palvimo J.J. (1995) Androgen receptor-mediated transcriptional regulation in the absence of direct interaction with a specific dna element. *Mol Endocrinol*, **9**:1017–1028.
- Kamata T., ichi Katsube K., Michikawa M., Yamada M., Takada S. and Mizusawa H. (2004) R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in wnts mutants. *Biochim Biophys Acta*, **1676**:51–62.

Bibliografia

- Karl J. and Capel B. (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol*, **203**:323–33.
- Katoh-Fukui Y., Tsuchiya R., Shiroishi T., Nakahara Y., Hashimoto N., Noguchi K. and Higashinakagawa T. (1998) Male-to-female sex reversal in M33 mutant mice. *Nature*, **393**:688–92.
- Kawamata M. and Nishimori K. (2006) Mice deficient in *dmrt7* show infertility with spermatogenic arrest at pachytene stage. *FEBS Lett*, **580**:6442–6446.
- Kazanskaya O., Glinka A., del Barco Barrantes I., Stannek P., Niehrs C. and Wu W. (2004) R-spondin2 is a secreted activator of wnt/beta-catenin signaling and is required for xenopus myogenesis. *Dev Cell*, **7**:525–534.
- Kempainen J.A., Lane M.V., Sar M. and Wilson E.M. (1992) Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport, and transcriptional activation. specificity for steroids and antihormones. *J Biol Chem*, **267**:968–974.
- Kent J., Wheatley S., Andrews J., Sinclair A. and Koopman P. (1996) A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, **122**:2813–22.
- Ketola I., Anttonen M., Vaskivuo T., Tapanainen J., Toppari J. and 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**:397–406.
- Ketola I., Pentikainen V., Vaskivuo T., Ilvesmaki V., Herva R., Dunkel L., Tapanainen J., Toppari J. and Heikinheimo M. (2000) Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**:3925–31.
- Ketola I., Rahman N., Toppari J., Bielinska M., Porter-Tinge S., Tapanainen J., Huh-taniemi I., Wilson D. and Heikinheimo M. (1999) Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology*, **140**:1470–80.
- Kettlewell J., Raymond C. and Zarkower D. (2000) Temperature-dependent expression of turtle *Dmrt1* prior to sexual differentiation. *Genesis*, **26**:174–8.
- Kim J., Prawitt D., Bardeesy N., Torban E., Vicaner C., Goodyer P., Zabel B. and Pelletier J. (1999) The Wilms' tumor suppressor gene (*wt1*) product regulates *Dax-1* gene expression during gonadal differentiation. *Mol Cell Biol*, **19**:2289–99.
- Kim J.H., Seibel M.M., MacLaughlin D.T., Donahoe P.K., Ransil B.J., Hametz P.A. and Richards C.J. (1992) The inhibitory effects of müllerian-inhibiting substance on epidermal growth factor induced proliferation and progesterone production of human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **75**:911–917.
- Kim K.A., Kakitani M., Zhao J., Oshima T., Tang T., Binnerts M., Liu Y., Boyle B., Park E., Emtage P., Funk W.D. and Tomizuka K. (2005) Mitogenic influence of human r-spondin1 on the intestinal epithelium. *Science*, **309**:1256–1259.
- Kim S., Kettlewell J., Anderson R., Bardwell V. and Zarkower D. (2003) Sexually dimorphic expression of multiple doublesex-related genes in the embryonic mouse gonad. *Gene Expr Patterns*, **3**:77–82.
- Kim S., Namekawa S.H., Niswander L.M., Ward J.O., Lee J.T., Bardwell V.J. and Zarkower D. (2007a) A mammal-specific doublesex homolog associates with male sex chromatin and is required for male meiosis. *PLoS Genet*, **3**:e62.
- Kim Y., Bingham N., Sekido R., Parker K.L., Lovell-Badge R. and Capel B. (2007b) Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and sertoli differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**:16558–16563.
- Kim Y., Kobayashi A., Sekido R., DiNapoli L., Brennan J., Chaboissier M., Poulat F., Behringer R., Lovell-Badge R. and Capel B. (2006) *Fgf9* and *Wnt4* act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, **4**:e187.
- Kimura F., Sidis Y., Bonomi L., Xia Y. and Schneyer A. (2010) The follistatin-288 isoform alone is sufficient for survival but not for normal fertility in mice. *Endocrinology*, **151**:1310–1319.

- Klattig J. and Englert C. (2007) The müllerian duct: recent insights into its development and regression. *Sex Dev*, **1**:271–278.
- Kocer A., Pinheiro I., Pannetier M., Renault L., Parma P., Radi O., Kim K.A., Camerino G. and Pailhoux E. (2008) R-spondin1 and foxl2 act into two distinct cellular types during goat ovarian differentiation. *BMC Dev Biol*, **8**:36.
- 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. and Shima A. (2002) Molecular cloning and characterization of DMRT genes from the medaka *Oryzias latipes* and the platyfish *Xiphophorus maculatus*. *Gene*, **295**:213–22.
- Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P. and Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, **351**:117–21.
- Koubova J., Menke D., Zhou Q., Capel B., Griswold M. and Page D. (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**:2474–9.
- Kreidberg J., Sariola H., Loring J., Maeda M., Pelletier J., Housman D. and Jaenisch R. (1993) WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, **74**:679–91.
- Kroft T.L., Patterson J., Yoon J.W., Doglio L., Walterhouse D.O., Iannaccone P.M. and Goldberg E. (2001) Gli1 localization in the germinal epithelial cells alternates between cytoplasm and nucleus: upregulation in transgenic mice blocks spermatogenesis in pachytene. *Biol Reprod*, **65**:1663–1671.
- Krongrad A., Wilson C.M., Wilson J.D., Allman D.R. and McPhaul M.J. (1991) Androgen increases androgen receptor protein while decreasing receptor mRNA in Lncap cells. *Mol Cell Endocrinol*, **76**:79–88.
- Kumar S., Chatzi C., Brade T., Cunningham T.J., Zhao X. and Duyster G. (2011) Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. *Nat Commun*, **2**:151.
- Kuo C., Morrisey E., Anandappa R., Sigrist K., Lu M., Parmacek M., Soudais C. and Leiden J. (1997) GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*, **11**:1048–60.
- Lahbib-Mansais Y., Barbosa A., Yerle M., Parma P., Milan D., Pailhoux E., Gellin J. and Cotinot C. (1997) Mapping in pig of genes involved in sexual differentiation: AMH, WT1, FTZF1, SOX2, SOX9, AHC, and placental and embryonic CYP19. *Cytogenet Cell Genet*, **76**:109–14.
- Laitinen M., Anttonen M., Ketola I., Wilson D., Ritvos O., Butzow R. and 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**:3476–83.
- Lala D., Rice D. and 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**:1249–58.
- Lalli E., Bardoni B., Zazopoulos E., Wurtz J., Strom T., Moras D. and Sassone-Corsi P. (1997) A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol*, **11**:1950–60.
- Lalli E., Ohe K., Hindelang C. and Sassone-Corsi P. (2000) Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. *Mol Cell Biol*, **20**:4910–21.
- Larsson S., Charliou J., Miyagawa K., Engelkamp D., Rassoulzadegan M., Ross A., Cuzin F., van Heyningen V. and Hastie N. (1995) Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell*, **81**:391–401.
- Lavorgna G., Ueda H., Clos J. and Wu C. (1991) FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science*, **252**:848–51.
- Lee M.M. and Donahoe P.K. (1993) Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev*, **14**:152–164.

Bibliografia

- Lei N. and Heckert L. (2002) Sp1 and Egr1 regulate transcription of the Dmrt1 gene in Sertoli cells. *Biol Reprod*, **66**:675–84.
- Lei N. and Heckert L. (2004) Gata4 regulates testis expression of Dmrt1. *Mol Cell Biol*, **24**:377–88.
- Lemeh C. (1960) A study of the development and structural relationships of the testis and guernaculum. *Surg Gynecol Obstet*, **110**:164–72.
- Li B., Zhang W., Chan G., Jancso-Radek A., Liu S. and Weiss M. (2001) Human sex reversal due to impaired nuclear localization of SRY. A clinical correlation. *J Biol Chem*, **276**:46480–4.
- Li M., Schatten H. and Sun Q.Y. (2009) Androgen receptor's destiny in mammalian oocytes: a new hypothesis. *Mol Hum Reprod*, **15**:149–154.
- Liang L., Soyal S.M. and Dean J. (1997) Figalpha, a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*, **124**:4939–4947.
- Lin A., Roche A., Wilk J. and 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**:55017–23.
- Lin Y.M., Tsai C.C., Chung C.L., Chen P.R., Sun H.S., Tsai S.J. and Huang B.M. (2010) Fibroblast growth factor 9 stimulates steroidogenesis in postnatal leydig cells. *Int J Androl*, **33**:545–553.
- Little M., Holmes G., Bickmore W., van Heyningen V., Hastie N. and Wainwright B. (1995) DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum Mol Genet*, **4**:351–8.
- Liu D., Le Drean Y., Ekker M., Xiong F. and Hew C. (1997) Teleost FTZ-F1 homolog and its splicing variant determine the expression of the salmon gonadotropin IIbeta subunit gene. *Mol Endocrinol*, **11**:877–90.
- Loffler K.A., Zarkower D. and Koopman P. (2003) Etiology of ovarian failure in blepharophimosis ptosis epicanthus inversus syndrome: Foxl2 is a conserved, early-acting gene in vertebrate ovarian development. *Endocrinology*, **144**:3237–3243.
- Lossky M. and Wensink P. (1995) Regulation of Drosophila yolk protein genes by an ovary-specific GATA factor. *Mol Cell Biol*, **15**:6943–52.
- Lovell-Badge R., Canning C. and Sekido R. (2002) Sex-determining genes in mice: building pathways. *Novartis Found Symp*, **244**:4–18; discussion 18–22, 35–42, 253–7.
- Lubahn D.B., Joseph D.R., Sullivan P.M., Willard H.F., French F.S. and Wilson E.M. (1988) Cloning of human androgen receptor complementary dna and localization to the x chromosome. *Science*, **240**:327–330.
- Ludbrook L. and Harley V. (2004) Sex determination: a 'window' of DAX1 activity. *Trends Endocrinol Metab*, **15**:116–21.
- Lum L. and Beachy P.A. (2004) The hedgehog response network: sensors, switches, and routers. *Science*, **304**:1755–1759.
- Luo X., Ikeda Y. and Parker K. (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, **77**:481–90.
- Lutz L.B., Cole L.M., Gupta M.K., Kwist K.W., Auchus R.J. and Hammes S.R. (2001) Evidence that androgens are the primary steroids produced by xenopus laevis ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**:13728–13733.
- Maatouk D.M., DiNapoli L., Alvers A., Parker K.L., Taketo M.M. and Capel B. (2008) Stabilization of beta-catenin in xy gonads causes male-to-female sex-reversal. *Hum Mol Genet*, **17**:2949–2955.
- Madl J. and Herman R. (1979) Polyploids and sex determination in Caenorhabditis elegans. *Genetics*, **93**:393–402.
- Magre S. and Jost A. (1980) The initial phases of testicular organogenesis in the rat. an electron microscopy study. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*, **69**:297–318.

- Majdic G., McNeilly A.S., Sharpe R.M., Evans L.R., Groome N.P. and Saunders P.T. (1997) Testicular expression of inhibin and activin subunits and follistatin in the rat and human fetus and neonate and during postnatal development in the rat. *Endocrinology*, **138**:2136–2147.
- Malki S., Berta P., Poulat F. and Boizet-Bonhoure B. (2005a) Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res*, **309**:468–75.
- Malki S., Bibeau F., Notarnicola C., Roques S., Berta P., Poulat F. and Boizet-Bonhoure B. (2007) Expression and biological role of the prostaglandin d synthase/sox9 pathway in human ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, **255**:182–193.
- Malki S., Nef S., Notarnicola C., Thevenet L., Gasca S., Mejean C., Berta P., Poulat F. and Boizet-Bonhoure B. (2005b) Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J*, **24**:1798–809.
- Maller J.L. and Krebs E.G. (1980) Regulation of oocyte maturation. *Curr Top Cell Regul*, **16**:271–311.
- Mandel H., Shemer R., Borochowitz Z.U., Okopnik M., Knopf C., Indelman M., Dragan A., Tiosano D., Gershoni-Baruch R., Choder M. and Sprecher E. (2008) Serkal syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in *wnt4*. *Am J Hum Genet*, **82**:39–47.
- Mangelsdorf D., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P. and Evans R. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**:835–9.
- Mansour S., Hall C., Pembrey M. and Young I. (1995) A clinical and genetic study of campomelic dysplasia. *J Med Genet*, **32**:415–20.
- Mansour S., Offiah A., McDowall S., Sim P., Tolmie J. and Hall C. (2002) The phenotype of survivors of campomelic dysplasia. *J Med Genet*, **39**:597–602.
- Manuylov N.L., Smagulova F.O., Leach L. and Tevosian S.G. (2008) Ovarian development in mice requires the *gata4-fog2* transcription complex. *Development*, **135**:3731–3743.
- Manuylov N.L., Smagulova F.O. and Tevosian S.G. (2007) *Fog2* excision in mice leads to premature mammary gland involution and reduced *esr1* gene expression. *Oncogene*, **26**:5204–5213.
- Marca A.L., Giulini S., Tirelli A., Bertucci E., Marsella T., Xella S. and Volpe A. (2007) Anti-müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*, **22**:766–771.
- Marchand O., Govoroun M., D’Cotta H., McMeel O., Lareyre J., Bernot A., Laudet V. and Guiguen Y. (2000) DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta*, **1493**:180–7.
- Marcotullio L.D., Ferretti E., Greco A., Smaele E.D., Screpanti I. and Gulino A. (2007) Multiple ubiquitin-dependent processing pathways regulate hedgehog/gli signaling: implications for cell development and tumorigenesis. *Cell Cycle*, **6**:390–393.
- Martineau J., Nordqvist K., Tilmann C., Lovell-Badge R. and Capel B. (1997) Male-specific cell migration into the developing gonad. *Curr Biol*, **7**: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. and Sakaizumi M. (2002) DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature*, **417**:559–63.
- Matsunaga E. (1981) Genetics of Wilms’ tumor. *Hum Genet*, **57**:231–46.
- Matsuzawa-Watanabe Y., Inoue J. and Semba K. (2003) Transcriptional activity of

Bibliografia

- testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene*, **22**:7900-4.
- Mattei M., Penault-Llorca F., Coulier F. and Birnbaum D. (1995) The human FGF9 gene maps to chromosomal region 13q11-q12. *Genomics*, **29**:811-2.
- Matzuk M.M., Lu N., Vogel H., Sellheyer K., Roop D.R. and Bradley A. (1995) Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature*, **374**:360-363.
- Mayo M.L., Bringas P., Santos V., Shum L. and Slavkin H.C. (1992) Desmin expression during early mouse tongue morphogenesis. *Int J Dev Biol*, **36**:255-263.
- McCabe E.R. (1996) Sex and the single dax1: too little is bad, but can we have too much? *J Clin Invest*, **98**:881-882.
- McClung C. (1902) The accessory chromosome sex determinant? *Biol Bull*, pp. 72-77.
- McDonald M., Flejter W., Sheldon S., Putzi M. and Gorski J. (1997) XY sex reversal and gonadal dysgenesis due to 9p24 monosomy. *Am J Med Genet*, **73**:321-6.
- McLaren A. (1990) Sexual differentiation. Of MIS and the mouse. *Nature*, **345**:111.
- McLaren A. (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*, **262**:1-15.
- McLaren A. and Southee D. (1997) Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev Biol*, **187**:107-13.
- Meeks J., Crawford S., Russell T., Morohashi K., Weiss J. and Jameson J. (2003a) Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development*, **130**:1029-36.
- Meeks J., Crawford S., Russell T., Morohashi K., Weiss J. and Jameson J. (2003b) Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development*, **130**:1029-36.
- Meeks J., Weiss J. and Jameson J. (2003c) Dax1 is required for testis determination. *Nat Genet*, **34**:32-3.
- Meinhardt A., O'Bryan M.K., McFarlane J.R., Loveland K.L., Mallidis C., Foulds L.M., Phillips D.J. and de Kretser D.M. (1998) Localization of follistatin in the rat testis. *J Reprod Fertil*, **112**:233-241.
- Meinke G. and Sigler P. (1999) DNA-binding mechanism of the monomeric orphan nuclear receptor NGFI-B. *Nat Struct Biol*, **6**:471-7.
- Menke D., Koubova J. and Page D. (2003) Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev Biol*, **262**:303-12.
- Menke D. and Page D. (2002) Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr Patterns*, **2**:359-67.
- Merchant-Larios H. (1975) Rat gonadal and ovarioan organogenesis with and without germ cells. An ultrastructural study. *Dev Biol*, **44**:1-21.
- Merchant-Larios H. and Chimal-Monroy J. (1989) The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. *Prog Clin Biol Res*, **296**:55-63.
- Merchant-Larios H. and Moreno-Mendoza N. (1998) Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. *Exp Cell Res*, **244**:230-238.
- Merchant-Larios H., Moreno-Mendoza N. and Buehr M. (1993) The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int J Dev Biol*, **37**:407-15.
- Merchant-Larios H., Ruiz-Ramirez S., Moreno-Mendoza N. and Marmolejo-Valencia A. (1997) Correlation among thermosensitive period, estradiol response, and gonad differentiation in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *Gen Comp Endocrinol*, **107**:373-385.
- Merchant-Larios H. and Taketo T. (1991) Testicular differentiation in mammals under normal and experimental conditions. *J Electron Microscop Tech*, **19**:158-71.
- Micali G., Nasca M.R., Innocenzi D., Frasin L.A., Radi O., Parma P., Camerino G. and Schwartz R.A. (2005) Association of palmo-plantar keratoderma, cutaneous squamous cell carcinoma, dental anomalies, and

- hypogonadism in four siblings with 46,xx karyotype: a new syndrome. *J Am Acad Dermatol*, **53**:S234–S239.
- Middendorff R., Müller D., Mewe M., Mukhopadhyay A.K., Holstein A.F. and Davidoff M.S. (2002) The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic gmp. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**:3486–3499.
- Miyamoto M., Naruo K., Seko C., Matsumoto S., Kondo T. and 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**:4251–9.
- Miyamoto N., Yoshida M., Kuratani S., Matsuo I. and Aizawa S. (1997) Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*, **124**:1653–64.
- Mizusaki H., Kawabe K., Mukai T., Ariyoshi E., Kasahara M., Yoshioka H., Swain A. and 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**:507–19.
- Moffett P., Bruening W., Nakagama H., Bardeesy N., Housman D., Housman D. and Pelletier J. (1995) Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**:11105–9.
- Molkentin J., Lin Q., Duncan S. and Olson E. (1997) Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*, **11**:1061–72.
- Moniot B., Berta P., Scherer G., Sudbeck P. and Poulat F. (2000) Male specific expression suggests role of DMRT1 in human sex determination. *Mech Dev*, **91**:323–5.
- Moniot B., Declosmenil F., Barrionuevo F., Scherer G., Aritake K., Malki S., Marzi L., Cohen-Solal A., Georg I., Klattig J., Englert C., Kim Y., Capel B., Eguchi N., Ura-de Y., Boizet-Bonhoure B. and Poulat F. (2009) The pgd2 pathway, independently of fgf9, amplifies sox9 activity in sertoli cells during male sexual differentiation. *Development*, **136**:1813–1821.
- Moorthy A., Chesney R. and Lubinsky M. (1987) Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Fraser" syndrome—a commentary on reported cases. *Am J Med Genet Suppl*, **3**:297–302.
- Morales C.R., Fox A., El-Alfy M., Ni X. and Argraves W.S. (2009) Expression of patched-1 and smoothened in testicular meiotic and post-meiotic cells. *Microsc Res Tech*, **72**:809–815.
- Moreno-Mendoza N., Harley V. and 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**:705–10.
- Morohashi K., Iida H., Nomura M., Hatano O., Honda S., Tsukiyama T., Niwa O., Hara T., Takakusu A., Shibata Y. and et al. (1994) Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. *Mol Endocrinol*, **8**:643–53.
- Morris J., Madden S., Tournay O., Cook D., Sukhatme V. and Rauscher 3rd F. (1991) Characterization of the zinc finger protein encoded by the WT1 Wilms' tumor locus. *Oncogene*, **6**:2339–48.
- Morrish B. and Sinclair A. (2002) Vertebrate sex determination: many means to an end. *Reproduction*, **124**:447–57.
- Mossman H. and Duke K. (1973) *Comparative morphology of the mammalian ovary*. The University of Wisconsin Press.
- Motta P.M. and Makabe S. (1982) Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus. a correlated study by scanning and transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res*, **226**:493–510.
- Moumné L., Batista F., Benayoun B.A., Nallathambi J., Fellous M., Sundaresan P. and Veitia R.A. (2008) The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor foxl2. *Mol Cell Endocrinol*, **282**:2–11.
- Mueller R. (1994) The Denys-Drash syndrome. *J Med Genet*, **31**:471–7.

Bibliografia

- Mundlos S., Pelletier J., Darveau A., Bachmann M., Winterpacht A. and Zabel B. (1993) Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development*, **119**:1329–41.
- Munsterberg A. and Lovell-Badge R. (1991) Expression of the mouse anti-mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development*, **113**:613–24.
- Murdock C. and Wibbels T. (2003) Expression of Dmrt1 in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Cytogenet Genome Res*, **101**:302–8.
- Murdock C. and 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**:134–9.
- Muroya K., Okuyama T., Goishi K., Ogiso Y., Fukuda S., Kameyama J., Sato H., Suzuki Y., Terasaki H., Gomyo H., Wakui K., Fukushima Y. and Ogata T. (2000) Sex-determining gene(s) on distal 9p: clinical and molecular studies in six cases. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**:3094–100.
- Muscattelli F., Strom T., Walker A., Zanaria E., Recan D., Meindl A., Bardoni B., Guioli S., Zehetner G., Rabl W. and et al. (1994) Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature*, **372**:672–6.
- Nachtigal M., Hirokawa Y., Enyeart-VanHouten D., Flanagan J., Hammer G. and Ingraham H. (1998) Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell*, **93**:445–54.
- Nakamoto M., Matsuda M., Wang D.S., Nagahama Y. and Shibata N. (2006) Molecular cloning and analysis of gonadal expression of foxl2 in the medaka, *oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun*, **344**:353–361.
- Nakamura T., Takio K., Eto Y., Shibai H., Titani K. and Sugino H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science*, **247**:836–838.
- Nakatani A., Shimasaki S., Depaolo L.V., Erickson G.F. and Ling N. (1991) Cyclic changes in follistatin messenger ribonucleic acid and its protein in the rat ovary during the estrous cycle. *Endocrinology*, **129**:603–611.
- Nanda I., Kondo M., Hornung U., Asakawa S., Winkler C., Shimizu A., Shan Z., Haaf T., Shimizu N., Shima A., Schmid M. and 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**:11778–83.
- 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. and Schmid M. (1999) 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. *Nat Genet*, **21**:258–9.
- Nanda I., Zend-Ajusich E., Shan Z., Grutzner F., Scharl M., Burt D., Koehler M., Fowler V., Goodwin G., Schneider W., Mizuno S., Dechant G., Haaf T. and 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**:67–78.
- Natoli T., Alberta J., Bortvin A., Taglienti M., Menke D., Loring J., Jaenisch R., Page D., Housman D. and Kreidberg J. (2004) Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. *Dev Biol*, **268**:429–40.
- Neeper M., Lowe R., Galuska S., Hofmann K., Smith R. and Elbrecht A. (1996) Molecular cloning of an avian anti-Mullerian hormone homologue. *Gene*, **176**:203–9.
- Nef S., Verma-Kurvari S., Merenmies J., Vassalli J., Efstratiadis A., Accili D. and Parada L. (2003) Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*, **426**:291–5.
- Notarnicola C., Malki S., Berta P., Poulat F. and Boizet-Bonhoure B. (2006) Transient expression of sox9 protein during follicular development in the adult mouse ovary. *Gene Expr Patterns*, **6**:695–702.

- Nusse R. (2003) Wnts and hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development*, **130**:5297–5305.
- O'Bryan M.K., Takada S., Kennedy C.L., Scott G., Ichi Harada S., Ray M.K., Dai Q., Wilhelm D., de Kretser D.M., Eddy E.M., Koopman P. and Mishina Y. (2008) Sox8 is a critical regulator of adult sertoli cell function and male fertility. *Dev Biol*, **316**:359–370.
- Odor D.L. and Blandau R.J. (1969) Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. i. histogenesis and organogenesis. *Am J Anat*, **124**:163–186.
- Ogata T., Muroya K., Matsuo N., Hata J., Fukushima Y. and 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**:331–4.
- Orel E., Pieau C., Mattei M., Josso N., Picard J., Carre-Eusebe D. and Magre S. (1998) Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn*, **212**:522–32.
- Ornitz D. and Itoh N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, **2**:REVIEWS3005.
- Osada M., Park H., Nagakawa Y., Begum S., Yamashita K., Wu G., Kim M., Trink B. and Sidransky D. (2006) A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*, **339**:1120–8.
- Ottolenghi C., Fellous M., Barbieri M. and 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**:333–43.
- Ottolenghi C. and McElreavey K. (2000) Deletions of 9p and the quest for a conserved mechanism of sex determination. *Mol Genet Metab*, **71**:397–404.
- Ottolenghi C., Pelosi E., Tran J., Colombino M., Douglass E., Nedorezov T., Cao A., Forabosco A. and Schlessinger D. (2007) Loss of wnt4 and foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells. *Hum Mol Genet*, **16**:2795–2804.
- Ounap K., Uibo O., Zordania R., Kiho L., Ilus T., Oiglane-Shlik E. and 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**:415–23.
- Page D., Fisher E., McGillivray B. and Brown L. (1990) Additional deletion in sex-determining region of human Y chromosome resolves paradox of X,t(Y;22) female. *Nature*, **346**:279–81.
- Page D., Mosher R., Simpson E., Fisher E., Mardon G., Pollack J., McGillivray B., de la Chapelle A. and Brown L. (1987) The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell*, **51**:1091–104.
- Pailhoux E., Vigier B., Chaffaux S., Servel N., Taourit S., Furet J.P., Fellous M., Grosclaude F., Cribiu E.P., Cotinot C. and Vaiman D. (2001) A 11.7-kb deletion triggers intersexuality and polledness in goats. *Nat Genet*, **29**:453–458.
- Pailhoux E., Vigier B., Vaiman D., Servel N., Chaffaux S., Cribiu E. and Cotinot C. (2002) Ontogenesis of female-to-male sex-reversal in XX polled goats. *Dev Dyn*, **224**:39–50.
- Palmer M., Sinclair A., Berta P., Ellis N., Goodfellow P., Abbas N. and Fellous M. (1989) Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature*, **342**:937–9.
- Palombi F., Farini D., Salanova M., de Grosis S. and Stefanini M. (1992) Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. *Anat Rec*, **233**:32–40.
- Pandur P., Maurus D. and Kühl M. (2002) Increasingly complex: new players enter the wnt signaling network. *Bioessays*, **24**:881–884.
- Pannetier M., Servel N., Cocquet J., Besnard N., Cotinot C. and Pailhoux E. (2003) Expression studies of the PIS-regulated genes suggest different mechanisms of sex determination within mammals. *Cytogenet Genome Res*, **101**:199–205.

Bibliografia

- Pannetier M., Tilly G., Kocer A., Hudrisier M., Renault L., Chesnais N., Costa J., Provost F.L., Vaiman D., Vilotte J.L. and Pailhoux E. (2006) Goat sry induces testis development in xx transgenic mice. *FEBS Lett*, **580**:3715–3720.
- Park S., Meeks J., Raverot G., Pfaff L., Weiss J., Hammer G. and Jameson J. (2005) Nuclear receptors Sf1 and Dax1 function cooperatively to mediate somatic cell differentiation during testis development. *Development*, **132**:2415–23.
- Park S.Y., Lee E.J., Emge D., Jahn C.L. and Jameson J.L. (2008) A phenotypic spectrum of sexual development in dax1 (nr0b1)-deficient mice: consequence of the c57bl/6j strain on sex determination. *Biol Reprod*, **79**:1038–1045.
- Parker K. and Schimmer B. (1997) Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*, **18**:361–77.
- Parma P., Pailhoux E. and Cotinot C. (1999) Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of genes involved in gonadal differentiation in pigs. *Biol Reprod*, **61**:741–8.
- Parma P., Radi O., Vidal V., Chaboissier M., Dellambra E., Valentini S., Guerra L., Schedl A. and 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. and Renfree M. (2002) SOX9 has both conserved and novel roles in marsupial sexual differentiation. *Genesis*, **33**:131–9.
- Patan S. (2000) Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol*, **50**:1–15.
- Patel M., Dorman K., Zhang Y., Huang B., Arnold A., Sinsheimer J., Vilain E. and McCabe E. (2001) Primate DAX1, SRY, and SOX9: evolutionary stratification of sex-determination pathway. *Am J Hum Genet*, **68**:275–80.
- Patient R. and McGhee J. (2002) The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev*, **12**:416–22.
- Patrão M.T.C.C., Silva E.J.R. and Avellar M.C.W. (2009) Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, **53**:934–945.
- Pelletier J., Schalling M., Buckler A., Rogers A., Haber D. and Housman D. (1991) Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev*, **5**:1345–56.
- Peltoketo H., Allinen M., Vuosku J., Kujala S., Lundan T., Salminen A., Winqvist R. and 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**:83–90.
- Pendergrass T. (1976) Congenital anomalies in children with Wilms' tumor: a new survey. *Cancer*, **37**:403–8.
- Pepling M.E. and Spradling A.C. (1998) Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development*, **125**:3323–3328.
- Pepling M.E. and Spradling A.C. (2001) Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol*, **234**:339–351.
- Peyre A. (1962) [research on specific intersexuality in galemys pyrenaicus, g. (mammalia, insectivora)]. *Arch Biol (Liege)*, **73**:1–174.
- Pfeiffer R., Rauch A., Trautmann U., Dorr H., Hiort O., Scherer G., Rosch G., Papadopoulos T., v d Hardt K. and 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**:213–6.
- Phelan J.K. and McCabe E.R. (2001) Mutations in nr0b1 (dax1) and nr5a1 (sf1) responsible for adrenal hypoplasia congenita. *Hum Mutat*, **18**:472–487.
- Philibert P., Biason-Lauber A., Rouzier R., Pienkowski C., Paris F., Konrad D., Schoenle E. and Sultan C. (2008) Identification and functional analysis of a new wnt4 gene mutation among 28 adolescent

- girls with primary amenorrhea and müllerian duct abnormalities: a french collaborative study. *J Clin Endocrinol Metab*, **93**:895–900.
- Pierucci-Alves F., Clark A. and Russell L. (2001) A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod*, **65**:1392–402.
- Pinkerton J.H., McKay D.G., E. C. Adams C. and Hertig A.T. (1961) Development of the human ovary—a study using histochemical technics. *Obstet Gynecol*, **18**:152–181.
- Pisarska M.D., Bae J., Klein C. and Hsueh A.J.W. (2004) Forkhead l2 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology*, **145**:3424–3433.
- Polanco J.C., Wilhelm D., Davidson T.L., Knight D. and Koopman P. (2010) Sox10 gain-of-function causes xx sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum Mol Genet*, **19**:506–516.
- Pollock R. and Treisman R. (1990) A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res*, **18**:6197–204.
- Popoff N. (1911) Le tissu interstitiel et les corps jaunes de l'ovarie. *Arch Biol Paris*, **26**:483–556.
- Poulat F., Girard F., Chevron M., Goze C., Rebillard X., Calas B., Lamb N. and Berta P. (1995) Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol*, **128**:737–48.
- Preiss S., Argentaro A., Clayton A., John A., Jans D., Ogata T., Nagai T., Barroso I., Schafer A. and 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**:27864–72.
- Pritchard-Jones K., Fleming S., Davidson D., Bickmore W., Porteous D., Gosden C., Bard J., Buckler A., Pelletier J., Housman D. and et al. (1990) The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, **346**:194–7.
- Privitera O., Vessicchia G., Bernasconi B., Bettio D., Stioui S. and Giordano G. (2005) Prenatal diagnosis of del(9)(p24): a sex reverse case. *Prenat Diagn*, **25**:945–8.
- Qin Y. and Bishop C. (2005) Sox9 is sufficient for functional testis development producing fertile male mice in the absence of Sry. *Hum Mol Genet*, **14**:1221–9.
- Qin Y., Kong L., Poirier C., Truong C., Overbeek P. and Bishop C. (2004) Long-range activation of Sox9 in Odd Sex (Ods) mice. *Hum Mol Genet*, **13**:1213–8.
- Rackley R., Flenniken A., Kuriyan N., Kessler P., Stoler M. and Williams B. (1993) Expression of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 during mouse embryogenesis. *Cell Growth Differ*, **4**:1023–31.
- Radi O., Parma P., Imbeaud S., Nasca M.R., Uccellatore F., Maraschio P., Tiepolo L., Micali G. and Camerino G. (2005) Xx sex reversal, palmoplantar keratoderma, and predisposition to squamous cell carcinoma: genetic analysis in one family. *Am J Med Genet A*, **138A**:241–246.
- Rajah R., Glaser E.M. and Hirshfield A.N. (1992) The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Dev Dyn*, **194**:177–192.
- Rajkovic A., Pangas S.A., Ballow D., Suzumori N. and Matzuk M.M. (2004) No-box deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, **305**:1157–1159.
- Rao M., Pham J., Imam J., MacLean J., Murali D., Furuta Y., Sinha-Hikim A. and Wilkinson M. (2006) Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev*, **20**:147–52.
- Raymond C., Kettlewell J., Hirsch B., Bardwell V. and 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**:208–20.
- Raymond C., Murphy M., O'Sullivan M., Bardwell V. and Zarkower D. (2000) Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev*, **14**:2587–95.

Bibliografia

- Raymond C., Parker E., Kettlewell J., Brown L., Page D., Kusz K., Jaruzelska J., Reinberg Y., Flejter W., Bardwell V., Hirsch B. and 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**:989–96.
- Raymond C., Shamu C., Shen M., Seifert K., Hirsch B., Hodgkin J. and Zarkower D. (1998) Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, **391**:691–5.
- Razani B., Engelman J.A., Wang X.B., Schubert W., Zhang X.L., Marks C.B., Macaluso F., Russell R.G., Li M., Pestell R.G., Vizio D.D., Hou H., Kneitz B., Lagaud G., Christ G.J., Edelmann W. and Lisanti M.P. (2001) Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*, **276**:38121–38138.
- Rey R.A., Musse M., Venara M. and Chemes H.E. (2009) Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech*, **72**:787–795.
- Riccardi V., Sujansky E., Smith A. and Francke U. (1978) Chromosomal imbalance in the Aniridia-Wilms' tumor association: 11p interstitial deletion. *Pediatrics*, **61**:604–10.
- Ricci G., Catizone A. and Galdieri M. (2004) Embryonic mouse testis development: role of platelet derived growth factor (PDGF-BB). *J Cell Physiol*, **200**:458–67.
- Rice D., Mouw A., Bogerd A. and Parker K. (1991) A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol*, **5**:1552–61.
- Rice P., Longden I. and Bleasby A. (2000) EMBOS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*, **6**:276–277.
- Roberts V.J. (1997) Tissue-specific expression of inhibin/activin subunit and follistatin mRNAs in mid- to late-gestational age human fetal testis and epididymis. *Endocrine*, **6**:85–90.
- Robertson D.M., Klein R., de Vos F.L., McLachlan R.I., Wettenhall R.E., Hearn M.T., Burger H.G. and de Kretser D.M. (1987) The isolation of polypeptides with fish suppressing activity from bovine follicular fluid which are structurally different to inhibin. *Biochem Biophys Res Commun*, **149**:744–749.
- Rousset F., Bouchon D., Pintureau B., Juchault P. and Salignac M. (1992) Wolbachia endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proc Biol Sci*, **250**:91–8.
- Rubenstein N., Cunha G., Wang Y., Campbell K., Conley A., Catania K., Glickman S. and Place N. (2003) Variation in ovarian morphology in four species of New World moles with a peniform clitoris. *Reproduction*, **126**:713–9.
- Russell M.C., Cowan R.G., Harman R.M., Walker A.L. and Quirk S.M. (2007) The hedgehog signaling pathway in the mouse ovary. *Biol Reprod*, **77**:226–236.
- Sadovsky Y., Crawford P., Woodson K., Polish J., Clements M., Tourtellotte L., Simburger K. and 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**:10939–43.
- Salas-Cortes L., Jaubert F., Barbaux S., Nessmann C., Bono M., Fellous M., McElreavey K. and Roseblatt M. (1999) The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol*, **43**:135–40.
- Salmon N.A., Handyside A.H. and Joyce I.M. (2004) Oocyte regulation of anti-müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol*, **266**:201–208.
- Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. N.Y.
- Samy E.T., Li J.C., Grima J., Lee W.M., Silvestrini B. and Cheng C.Y. (2000) Sertoli cell prostaglandin d2 synthetase is a multifunctional molecule: its expression and regulation. *Endocrinology*, **141**:710–721.

- Sanchez A., Bullejos M., Burgos M., Hera C., Stamatopoulos C., Diaz De la Guardia R. and Jimenez R. (1996) Females of four mole species of genus *Talpa* (insectivora, mammalia) are true hermaphrodites with ovotestes. *Mol Reprod Dev*, **44**:289–94.
- Sar M., Lubahn D.B., French F.S. and Wilson E.M. (1990) Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues. *Endocrinology*, **127**:3180–3186.
- Sato E., Kimura N., Yokoo M., Miyake Y. and Ikeda J.E. (2006) Morphodynamics of ovarian follicles during oogenesis in mice. *Microsc Res Tech*, **69**:427–435.
- Schaefer L., Beermann M. and 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**:310–6.
- Scharnhorst V., Dekker P., van der Eb A. and Jochemsen A. (1999) Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J Biol Chem*, **274**:23456–62.
- Scheel J., Srinivasan J., Honnert U., Henske A. and Kurzchalia T.V. (1999) Involvement of caveolin-1 in meiotic cell-cycle progression in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*, **1**:127–129.
- Schepers G., Wilson M., Wilhelm D. and 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**:28101–8.
- Scherer P.E., Tang Z., Chun M., Sargiacomo M., Lodish H.F. and Lisanti M.P. (1995) Caveolin isoforms differ in their n-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J Biol Chem*, **270**:16395–16401.
- Schmahl J. and Capel B. (2003) Cell proliferation is necessary for the determination of male fate in the gonad. *Dev Biol*, **258**:264–76.
- Schmahl J., Eicher E., Washburn L. and Capel B. (2000) Sry induces cell proliferation in the mouse gonad. *Development*, **127**:65–73.
- Schmahl J., Kim Y., Colvin J., Ornitz D. and Capel B. (2004) Fgf9 induces proliferation and nuclear localization of FGFR2 in Sertoli precursors during male sex determination. *Development*, **131**:3627–36.
- Schmidt D., Ovitt C., Anlag K., Fehsenfeld S., Gredsted L., Treier A. and Treier M. (2004a) The murine winged-helix transcription factor *Foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**:933–42.
- Schmidt D., Ovitt C.E., Anlag K., Fehsenfeld S., Gredsted L., Treier A.C. and Treier M. (2004b) The murine winged-helix transcription factor *foxl2* is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, **131**:933–942.
- Seifer D.B., MacLaughlin D.T., Penzias A.S., Behrman H.R., Asmundson L., Donahoe P.K., Haning R.V. and Flynn S.D. (1993) Gonadotropin-releasing hormone agonist-induced differences in granulosa cell cycle kinetics are associated with alterations in follicular fluid müllerian-inhibiting substance and androgen content. *J Clin Endocrinol Metab*, **76**:711–714.
- Sekido R., Bar I., Narvaez V., Penny G. and Lovell-Badge R. (2004) SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol*, **274**:271–9.
- Sekido R. and Lovell-Badge R. (2008) Sex determination involves synergistic action of *sry* and *sf1* on a specific *sox9* enhancer. *Nature*, **453**:930–934.
- Setchell BP Maddocks S B.D. (1994) *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed., chap. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract, p. 1063–117. New York: Raven Press.
- Shan Z., Zabel B., Trautmann U., Hillig U., Ottolenghi C., Wan Y. and 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**: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.

Bibliografia

- Sharma P., Bowman M., Madden S., Rauscher 3rd F. and Sukumar S. (1994) RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev*, **8**:720–31.
- Sharp P.A., Sugden B. and Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in haemophilus parainfluenzae using analytical agarose–ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**:3055–3063.
- Shen M. and Hodgkin J. (1988) mab-3, a gene required for sex-specific yolk protein expression and a male-specific lineage in *C. elegans*. *Cell*, **54**:1019–31.
- Shen W., Moore C., Ikeda Y., Parker K. and Ingraham H. (1994) Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the mullerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell*, **77**:651–61.
- Shibata K., Takase M. and Nakamura M. (2002) The Dmrt1 expression in sex-reversed gonads of amphibians. *Gen Comp Endocrinol*, **127**:232–41.
- Shimamura R., Fraizer G., Trapman J., Lau YfC and 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**:2571–80.
- Shimasaki S., Koga M., Buscaglia M.L., Simmons D.M., Bicsak T.A. and Ling N. (1989) Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Endocrinol*, **3**:651–659.
- Shimasaki S., Koga M., Esch F., Cooksey K., Mercado M., Koba A., Ueno N., Ying S.Y., Ling N. and Guillemain R. (1988) Primary structure of the human follistatin precursor and its genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**:4218–4222.
- Shinoda K., Lei H., Yoshii H., Nomura M., Nagano M., Shiba H., Sasaki H., Osawa Y., Ninomiya Y., Niwa O. and et al. (1995) Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn*, **204**:22–9.
- Siggers P., Smith L. and Greenfield A. (2002) Sexually dimorphic expression of Gata-2 during mouse gonad development. *Mech Dev*, **111**:159–62.
- Morais da Silva S., Hacker A., Harley V., Goodfellow P., Swain A. and 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**:62–8.
- Sim E., Smith A., Szilagi E., Rae F., Ioannou P., Lindsay M. and Little M. (2002) Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene*, **21**:2948–60.
- Sim H., Rimmer K., Kelly S., Ludbrook L., Clayton A. and 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**:1884–92.
- Simental J.A., Sar M., Lane M.V., French F.S. and Wilson E.M. (1991) Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J Biol Chem*, **266**:510–518.
- Sinclair A., Berta P., Palmer M., Hawkins J., Griffiths B., Smith M., Foster J., Frischauf A., Lovell-Badge R. and Goodfellow P. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, **346**:240–4.
- Sinclair A., Smith C., Western P. and 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. and Ganesan M. (1994) Sex- and tissue-specific Bkm(GATA)-binding protein in the germ cells of heterogametic sex. *J Biol Chem*, **269**:25321–7.
- Skinner M.K. (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, **11**:461–471.
- Smith C., Clifford V., Western P., Wilcox S., Bell K. and Sinclair A. (2000) Cloning and expression of a DAX1 homologue in the chicken embryo. *J Mol Endocrinol*, **24**:23–32.

- Smith C., Hurley T., McClive P. and Sinclair A. (2002) Restricted expression of DMRT3 in chicken and mouse embryos. *Mech Dev*, **119 Suppl 1**:S73–6.
- Smith C., McClive P., Western P., Reed K. and Sinclair A. (1999a) Conservation of a sex-determining gene. *Nature*, **402**:601–2.
- Smith C. and Sinclair A. (2004) Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays*, **26**:120–32.
- Smith C., Smith M. and Sinclair A. (1999b) Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene*, **234**:395–402.
- Smith C.A., Roeszler K.N., Ohnesorg T., Cummins D.M., Farlie P.G., Doran T.J. and Sinclair A.H. (2009) The avian z-linked gene *dmrt1* is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, **461**:267–271.
- Smith D.M. and Tenney D.Y. (1980) Effects of steroids on mouse oocyte maturation in vitro. *J Reprod Fertil*, **60**:331–338.
- Smith L.D. and Ecker R.E. (1971) The interaction of steroids with rana pipiens oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol*, **25**:232–247.
- Sock E., Pagon R., Keymolen K., Lissens W., Wegner M. and Scherer G. (2003) Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor SOX9 as a cause for campomelic dysplasia. *Hum Mol Genet*, **12**:1439–47.
- Soyal S.M., Amleh A. and Dean J. (2000) F β gal, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, **127**:4645–4654.
- Spieth J., Shim Y., Lea K., Conrad R. and Blumenthal T. (1991) *elt-1*, an embryonically expressed *Caenorhabditis elegans* gene homologous to the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*, **11**:4651–9.
- Spotila L., Spotila J. and Hall S. (1998) Sequence and expression analysis of WT1 and Sox9 in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J Exp Zool*, **281**:417–27.
- Später D., Hill T.P., Gruber M. and Hartmann C. (2006) Role of canonical wnt-signalling in joint formation. *Eur Cell Mater*, **12**:71–80.
- Stark K., Vainio S., Vassileva G. and McMahon A. (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, **372**:679–83.
- Stevens N. (1905) Studies in spermatogenesis with special reference to the "accessory chromosome". *Carnegie Inst Washington Rep.*
- Sudbeck P. and 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**:27848–52.
- Sugita J., Takase M. and Nakamura M. (2001) Expression of Dax-1 during gonadal development of the frog. *Gene*, **280**:67–74.
- Svensson E., Huggins G., Dardik F., Polk C. and 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**:20762–9.
- Swain A. and Lovell-Badge R. (1999) Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev*, **13**:755–67.
- Swain A., Narvaez V., Burgoyne P., Camerino G. and Lovell-Badge R. (1998) Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature*, **391**:761–7.
- Taguchi O., Cunha G., Lawrence W. and Robboy S. (1984) Timing and irreversibility of Mullerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. *Dev Biol*, **106**:394–8.
- Taipale J., Cooper M.K., Maiti T. and Beachy P.A. (2002) Patched acts catalytically to suppress the activity of smoothened. *Nature*, **418**:892–897.
- Takada S., Ota J., Kansaku N., Yamashita H., Izumi T., Ishikawa M., Wada T., Kaneda R., Choi Y., Koinuma K., Fujiwara S., Aoki H., Kisanuki H., Yamashita Y. and Mano H. (2006) Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 genes. *Gen Comp Endocrinol*, **145**:208–13.
- Tevosian S., Albrecht K., Crispino J., Fujiwara Y., Eicher E. and Orkin S. (2002) Gonadal differentiation, sex determination

Bibliografia

- and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, **129**:4627–34.
- Tevosian S., Deconinck A., Cantor A., Rieff H., Fujiwara Y., Corfas G. and 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**:950–5.
- Tevosian S., Deconinck A., Tanaka M., Schinke M., Litovsky S., Izumo S., Fujiwara Y. and 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**:729–39.
- Themmen A.P.N. (2005) Anti-müllerian hormone: its role in follicular growth initiation and survival and as an ovarian reserve marker. *J Natl Cancer Inst Monogr*, pp. 18–21.
- Thevenet L., Mejean C., Moniot B., Bonneaud N., Galeotti N., Aldrian-Herrada G., Poulat F., Berta P., Benkirane M. and Boizet-Bonhoure B. (2004) Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J*, **23**:3336–45.
- Tilley W.D., Marcelli M. and McPhaul M.J. (1990) Expression of the human androgen receptor gene utilizes a common promoter in diverse human tissues and cell lines. *J Biol Chem*, **265**:13776–13781.
- Tilmann C. and Capel B. (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. *Development*, **126**:2883–90.
- Tomaselli S., Megiorni F., Bernardo C.D., Felici A., Marrocco G., Maggiulli G., Grammatico B., Remotti D., Saccucci P., Valentini F., Mazzilli M.C., Majore S. and Grammatico P. (2008) Syndromic true hermaphroditism due to an r-spondin1 (rs-p1) homozygous mutation. *Hum Mutat*, **29**:220–226.
- Tomizuka K., Horikoshi K., Kitada R., Sugawara Y., Iba Y., Kojima A., Yoshitome A., Yamawaki K., Amagai M., Inoue A., Oshima T. and Kakitani M. (2008) R-spondin1 plays an essential role in ovarian development through positively regulating wnt-4 signaling. *Hum Mol Genet*, **17**:1278–1291.
- Tommerup N., Schempp W., Meinecke P., Pedersen S., Bolund L., Brandt C., Goodpasture C., Guldberg P., Held K., Reinwein H. and et al. (1993) Assignment of an autosomal sex reversal locus (SRA1) and camptomic dysplasia (CMPD1) to 17q24.3-q25.1. *Nat Genet*, **4**:170–4.
- Topol L., Chen W., Song H., Day T.F. and Yang Y. (2009) Sox9 inhibits wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J Biol Chem*, **284**:3323–3333.
- Torres Maldonado L., Landa Piedra A., Moreno Mendoza N., Marmolejo Valencia A., Meza Martinez A. and 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**:20–6.
- Tremblay J., Robert N. and 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**:1636–50.
- Tremblay J. and 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**:1388–401.
- Tremblay J. and Viger R. (2001a) GATA factors differentially activate multiple gonadal promoters through conserved GATA regulatory elements. *Endocrinology*, **142**:977–86.
- Tremblay J. and Viger R. (2001b) Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod*, **64**:1191–9.
- Tremblay J. and 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**:42637–42.
- Tremblay J. and Viger R. (2003b) Novel roles for GATA transcription factors in the regulation of steroidogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **85**:291–8.

- Tripathi A., Kumar K.V.P. and Chaube S.K. (2010) Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol*, **223**:592–600.
- Tsafiriri A., Picard J.Y. and Josso N. (1988) Immunopurified anti-müllerian hormone does not inhibit spontaneous resumption of meiosis in vitro of rat oocytes. *Biol Reprod*, **38**:481–485.
- Tsang A., Fujiwara Y., Hom D. and Orkin S. (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev*, **12**:1176–88.
- Tsang A., Visvader J., Turner C., Fujiwara Y., Yu C., Weiss M., Crossley M. and 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**:109–19.
- Tung P. and 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**:139–53.
- Tung P.S. and Fritz I.B. (1986) Extracellular matrix components and testicular peritubular cells influence the rate and pattern of sertoli cell migration in vitro. *Dev Biol*, **113**:119–134.
- Tung P.S. and Fritz I.B. (1990) Characterization of rat testicular peritubular myoid cells in culture: alpha-smooth muscle isoactin is a specific differentiation marker. *Biol Reprod*, **42**:351–365.
- Turner J. and 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**:5129–40.
- Uda M., Ottolenghi C., Crisponi L., Garcia J.E., Deiana M., Kimber W., Forabosco A., Cao A., Schlessinger D. and Pilia G. (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet*, **13**:1171–1181.
- Ueno N., Ling N., Ying S.Y., Esch F., Shimasaki S. and Guillemain R. (1987) Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**:8282–8286.
- Ueno S., Kuroda T., Maclaughlin D., Ragin R., Manganaro T. and Donahoe P. (1989) Mullerian inhibiting substance in the adult rat ovary during various stages of the estrous cycle. *Endocrinology*, **125**:1060–6.
- Uhlenhaut N.H., Jakob S., Anlag K., Eisenberger T., Sekido R., Kress J., Treier A.C., Klugmann C., Klasen C., Holter N.I., Riethmacher D., Schütz G., Cooney A.J., Lovell-Badge R. and Treier M. (2009) Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by foxl2 ablation. *Cell*, **139**:1130–1142.
- Umehara F., Tate G., Itoh K., Yamaguchi N., Douchi T., Mitsuya T. and 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**:1302–5.
- Ungar A., Kelly G. and Moon R. (1995) Wnt4 affects morphogenesis when misexpressed in the zebrafish embryo. *Mech Dev*, **52**:153–64.
- Uzumcu M., Dirks K.A. and Skinner M.K. (2002) Inhibition of platelet-derived growth factor actions in the embryonic testis influences normal cord development and morphology. *Biol Reprod*, **66**:745–753.
- Vainio S., Heikkila M., Kispert A., Chin N. and McMahon A. (1999) Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, **397**:405–9.
- Vaskivuo T., Aittomaki K., Anttonen M., Ruokonen A., Herva R., Osawa Y., Heikinheimo M., Huhtaniemi I. and 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**:108–13.
- Veith A., Froschauer A., Korting C., Nanda I., Hanel R., Schmid M., Schartl M. and Volf J. (2003) Cloning of the dmrt1 gene of *Xiphophorus maculatus*: dmY/dmrt1Y is not the master sex-determining gene in the platyfish. *Gene*, **317**:59–66.

Bibliografia

- Veitia R., Nunes M., Brauner R., Doco-Fenzy M., Joanny-Flinois O., Jaubert F., Lortat-Jacob S., Fellous M. and 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**:271–4.
- Vialard F., Ottolenghi C., Gonzales M., Choisset A., Girard S., Siffroi J., McElreavey K., Vibert-Guigue C., Sebaoun M., Joye N., Portnoi M., Jaubert F. and Fellous M. (2002) Deletion of 9p associated with gonadal dysfunction in 46,XY but not in 46,XX human fetuses. *J Med Genet*, **39**:514–8.
- Vidal V., Chaboissier M., de Rooij D. and Schedl A. (2001) Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet*, **28**:216–7.
- Viger R., Mertineit C., Trasler J. and 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**:2665–75.
- Viger R., Taniguchi H., Robert N. and Tremblay J. (2004) Role of the GATA family of transcription factors in andrology. *J Androl*, **25**:441–52.
- Vigier B., Watrin F., Magre S., Tran D. and Josso N. (1987) Purified bovine AMH induces a characteristic freemartin effect in fetal rat prospective ovaries exposed to it in vitro. *Development*, **100**:43–55.
- Volff J., Zarkower D., Bardwell V. and 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. and Boyse E. (1975) Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature*, **257**:235–6.
- Wagner T., Wirth J., Meyer J., Zabel B., Held M., Zimmer J., Pasantes J., Bricarelli F., Keutel J., Hustert E. and et al. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell*, **79**:1111–20.
- Waldeyer W. (1870) *Eierstock und Ei [Ovarios y huevos]*. Leipzig.
- Walterhouse D.O., Lamm M.L.G., Villavicencio E. and Iannaccone P.M. (2003) Emerging roles for hedgehog-patched-gli signal transduction in reproduction. *Biol Reprod*, **69**:8–14.
- Walton R., Bruce A., Olivey H., Najib K., Johnson V., Earley J., Ho R. and Svensson E. (2006) Fog1 is required for cardiac looping in zebrafish. *Dev Biol*, **289**:482–93.
- Wang D., Kobayashi T., Senthilkumaran B., Sakai F., Sudhakumari C., Suzuki T., Yoshikuni M., Matsuda M., Morohashi K. and 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**:632–40.
- Wang R.S., Yeh S., Tzeng C.R. and Chang C. (2009) Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*, **30**:119–132.
- Wang Y., McMahon A.P. and Allen B.L. (2007) Shifting paradigms in hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol*, **19**:159–165.
- Watanabe K., Clarke T., Lane A., Wang X. and 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**:1624–9.
- Watanabe M., Tanaka M., Kobayashi D., Yoshiura Y., Oba Y. and 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**:221–8.
- Weiss M. and Orkin S. (1995) GATA transcription factors: key regulators of hematopoiesis. *Exp Hematol*, **23**:99–107.
- Welshons W. and Russell L. (1959) The Y-chromosome as the bearer of male determining factors in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, **45**:560–6.
- Western P., Harry J., Graves J. and Sinclair A. (1999) Temperature-dependent sex determination in the American alligator:

- AMH precedes SOX9 expression. *Dev Dyn*, **216**:411–9.
- Western P., Harry J., Marshall Graves J. and Sinclair A. (2000) Temperature-dependent sex determination in the American alligator: expression of SF1, WT1 and DAX1 during gonadogenesis. *Gene*, **241**:223–32.
- Wieacker P., Missbach D., Jakubiczka S., Borgmann S. and Albers N. (1996) Sex reversal in a child with the karyotype 46,XY, dup (1) (p22.3p32.3). *Clin Genet*, **49**:271–3.
- Wijgerde M., Ooms M., Hoogerbrugge J.W. and Grootegoed J.A. (2005) Hedgehog signaling in mouse ovary: Indian hedgehog and desert hedgehog from granulosa cells induce target gene expression in developing theca cells. *Endocrinology*, **146**:3558–3566.
- Wilhelm D. and Englert C. (2002) The Wilms tumor suppressor WT1 regulates early gonad development by activation of Sf1. *Genes Dev*, **16**:1839–51.
- Wilhelm D., Hiramatsu R., Mizusaki H., Widjaja L., Combes A.N., Kanai Y. and Koopman P. (2007) Sox9 regulates prostaglandin synthase gene transcription in vivo to ensure testis development. *J Biol Chem*, **282**:10553–10560.
- Wilhelm D., Martinson F., Bradford S., Wilson M., Combes A., Beverdam A., Bowles J., Mizusaki H. and 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., Pepsinsky R., Josso N., Vigier B. and 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**:247–57.
- Wilson M., Jeyasuria P., Parker K. and Koopman P. (2005) The transcription factors steroidogenic factor-1 and SOX9 regulate expression of Vanin-1 during mouse testis development. *J Biol Chem*, **280**:5917–23.
- Wilson T., Fahrner T. and 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**:5794–804.
- Winiwarter H.D. and Sainmont G. (1909) Nouvelles recherches sur l'ovogenese et organogenese de l'ovaire des mammiferes (chat). *Arch. Biol., Paris et Liege*, **24**:1–142.
- Wolf D.A., Herzinger T., Hermeking H., Blaschke D. and Hörz W. (1993) Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol*, **7**:924–936.
- Wong C.I., Zhou Z.X., Sar M. and Wilson E.M. (1993) Steroid requirement for androgen receptor dimerization and dna binding. modulation by intramolecular interactions between the nh2-terminal and steroid-binding domains. *J Biol Chem*, **268**:19004–19012.
- Wylie C.C. and Heasman J. (1993) Migration, proliferation, and potency of primordial germ cells. *Seminars in Dev. Biol*, **4**:161–170.
- Yamaguchi T., Yamaguchi S., Hirai T. and Kitano T. (2007) Follicle-stimulating hormone signaling and foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in japanese flounder, *paralichthys olivaceus*. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**:935–940.
- Yamamura Y., Aoyama S., Oshima Y., Kato T., Osawa N. and Nakamura M. (2005) Molecular cloning and expression in gonad of *Rana rugosa* WT1 and Fgf9. *Zoolog Sci*, **22**:1045–50.
- Yang H., Chen Y., Takita J., Soeda E., Piao H. and 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**:5075–83.
- Yao H., DiNapoli L. and Capel B. (2003) Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development*, **130**:5895–902.
- Yao H., Matzuk M., Jorgez C., Menke D., Page D., Swain A. and Capel B. (2004)

Bibliografia

- Follistatin operates downstream of Wnt4 in mammalian ovary organogenesis. *Dev Dyn*, **230**:210–5.
- Yao H., Whoriskey W. and Capel B. (2002) Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev*, **16**:1433–40.
- Yao H.H.C., Aardema J. and Holthusen K. (2006) Sexually dimorphic regulation of inhibin beta b in establishing gonadal vasculature in mice. *Biol Reprod*, **74**:978–983.
- Yao H.H.C. and Capel B. (2002) Disruption of testis cords by cyclopamine or forskolin reveals independent cellular pathways in testis organogenesis. *Dev Biol*, **246**:356–365.
- Yeap B.B., Krueger R.G. and Leedman P.J. (1999) Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. *Endocrinology*, **140**:3282–3291.
- Yi W., Ross J. and 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**:4469–80.
- Yi W. and 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**:873–81.
- Yomogida K., Ohtani H., Harigae H., Ito E., Nishimune Y., Engel J. and Yamamoto M. (1994) Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development*, **120**:1759–66.
- You L. and Sar M. (1998) Androgen receptor expression in the testes and epididymides of prenatal and postnatal sprague-dawley rats. *Endocrine*, **9**:253–261.
- Yu R., Ito M., Saunders T., Camper S. and Jameson J. (1998) Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet*, **20**:353–7.
- Yuan X., Lu M.L., Li T. and Balk S.P. (2001) Sry interacts with and negatively regulates androgen receptor transcriptional activity. *J Biol Chem*, **276**:46647–46654.
- Zaia A., Fraizer G., Piantanelli L. and Saunders G. (2001) Transcriptional regulation of the androgen signaling pathway by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Anticancer Res*, **21**:1–10.
- Zanaria E., Muscatelli F., Bardoni B., Strom T., Guioli S., Guo W., Lalli E., Moser C., Walker A., McCabe E. and et al. (1994) An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*, **372**:635–41.
- Zarkower D. (2001) Establishing sexual dimorphism: conservation amidst diversity? *Nat Rev Genet*, **2**:175–85.
- Zhang Y., Li F., Sun D., Liu J., Liu N. and Yu Q. (2011) Molecular analysis shows differential expression of r-spondin1 in zebrafish (*danio rerio*) gonads. *Mol Biol Rep*, **38**:275–282.
- Zhao Y., Tong C. and Jiang J. (2007) Hedgehog regulates smoothened activity by inducing a conformational switch. *Nature*, **450**:252–258.
- Zhou Q., Nie R., Prins G.S., Saunders P.T.K., Katzenellenbogen B.S. and Hess R.A. (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl*, **23**:870–881.
- Zhou Z.X., Lane M.V., Kempainen J.A., French F.S. and Wilson E.M. (1995) Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol*, **9**:208–218.
- Zhu L.J., Hardy M.P., Inigo I.V., Huhtaniemi I., Bardin C.W. and Moo-Young A.J. (2000) Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biol Reprod*, **63**:368–376.
- Zurita F., Barrionuevo F., Berta P., Ortega E., Burgos M. and Jimenez R. (2003) Abnormal sex-duct development in female moles: the role of anti-Mullerian hormone and testosterone. *Int J Dev Biol*, **47**:451–8.

- Zurita F., Carmona F.D., Lupiáñez D.G., Barrionuevo F.J., Guioli S., Burgos M. and Jiménez R. (2007) Meiosis onset is postponed to postnatal stages during ovotestis development in female moles. *Sex Dev*, **1**:66–76.