

Bases moleculares de la determinación sexual en mamíferos

Verónica Díaz Hernández* y Horacio Merchant Larios**

Recepción: 1 de febrero de 2008

Aceptación: 23 de junio de 2008

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Becaria CONACYT y DGEF.

**Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correo electrónico:

merchant@biomedicas.unam.mx

Agradecemos el apoyo financiero de DGAPA-PAPIIT (IN212507); al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, al Posgrado en Ciencias Biomédicas y el apoyo técnico del M. C. Alejandro Marmolejo Valencia.

Resumen. Se correlacionan conceptos clásicos de la diferenciación sexual con mecanismos moleculares de la determinación sexual en mamíferos. El paradigma de Jost estableció que la diferenciación sexual fetal depende de la actividad endócrina de los testículos. En la gónada embrionaria indiferenciada se establecen redes moleculares a partir de vías alternativas de expresión que determinan la formación de ovarios o testículos. Tomando al ratón como modelo, describimos el hallazgo de varios genes que se activan o reprimen a partir de la expresión del Sry en los machos y las vías alternas encontradas en las hembras. Concluimos que todavía queda por conocerse el alcance que tienen los datos del ratón como modelo para extrapolarse a otros mamíferos incluido el humano.

Palabras clave: diferenciación sexual, determinación sexual, gónada, ovario, testículo.

Molecular Bases of Sex Determination in Mammals

Abstract. Our aim is to correlate classical concepts of sexual differentiation with current molecular mechanisms of sex determination in mammals. Jost's paradigm established that sex determination depends upon endocrine activity of fetal testis. The establishment of a complex network of alternative molecular pathways of gene expression determines the formation of either ovaries or testis from undifferentiated gonads. Taking the mouse as a model system, we described the finding of several genes that are regulated following the expression of Sry in males and the alternate pathways found in females. We concluded that it remains to be known whether the data from the mouse model could be extended to other mammals, including humans.

Key words: sex differentiation, sex determination, gonad, ovary, testis.

Introducción

En los mamíferos placentados, el establecimiento del sexo cromosómico ocurre en el momento de la fertilización, las hembras poseen una constitución cromosómica XX, mientras que los machos XY. Durante la vida fetal se establece el sexo gonadal a partir de la cresta gonadal indiferenciada que en las hembras se diferenciará como ovario y en los machos como testículo.

El ratón es el modelo más estudiado, y a partir de él se han extrapolado a otras especies de mamíferos los mecanismos moleculares involucrados en la "determinación sexual", la cual involucra procesos moleculares que establecen vías alternas de expresión de genes previos a la diferenciación sexual morfológica de la gónada embrionaria. Si bien, en mamíferos placentados la "determinación sexual genética" ocurre al fusionarse los pronúcleos del espermatozoide y el ovocito formando el núcleo del cigoto, la "determinación

sexual gonadal” representa el establecimiento y estabilización de vías dimórficas de expresión génica conducentes a la diferenciación de ovarios o testículos. La tercera etapa de la determinación sexual es la que Alfred Jost denominó “determinación sexual somática” (Jost, 1971) y se refiere a la diferenciación sexual de los conductos de Wolff, Müller y seno urogenital precursores embrionarios de los tractos genitales y genitales externos respectivamente. Es claro sin embargo, que los mecanismos que llevan al dimorfismo sexual del individuo no terminan aquí, los mecanismos neuroendócrinos conducentes a la emergencia de las características sexuales secundarias posnatales y el establecimiento de un patrón dimórfico de comportamiento sexual, completan el complejo proceso de diferenciación sexual del individuo.

En la presente revisión nos referimos específicamente a lo que hasta ahora se conoce sobre las bases moleculares de “determinación sexual gonadal” en mamíferos placentados tomando como sistema modelo al ratón. A pesar de las limitaciones intrínsecas de los modelos biológicos en lo que se refiere a la libre generalización interpretativa de los resultados hacia otras especies, su estudio ofrece una buena alternativa para avanzar en el conocimiento.

En aras de una mayor claridad, resulta importante reiterar la distinción entre los términos “determinación” y “diferenciación sexual”. Aunque con ciertas excepciones en marsupiales (ver Blecher y Erickson, 2007; para una revisión reciente), los embriones del mamífero forman cuatro primordios embrionarios a partir de los cuales emerge el dimorfismo sexual. El seno urogenital, las gónadas, los conductos de Müller y los conductos de Wolff. En la actual revisión, la determinación sexual se refiere a los eventos moleculares que especifican el destino sexual y preceden la diferenciación morfológica y funcional de las gónadas (Polanco y Koopman, 2007).

Con excepción del Sry, muchos de los genes involucrados en la determinación de la gónada, también son necesarios para el mantenimiento y diferenciación morfológica de ovarios y testículos e indirectamente regulan la diferenciación dimórfica del sexo somático a través de factores neuroendócrinos. De manera que como veremos, genes importantes para la determinación gonadal, también juegan un papel importante en la diferenciación de la gónada y en la determinación y diferenciación del sexo somático.

En el ratón el establecimiento de la cresta gonadal ocurre entre los 10-12 días post coito (dpc) y el periodo que corresponde a los 10.5-11.5 dpc se considera crítico para la determinación sexual a nivel molecular. A los 12.5 dpc se inicia la diferenciación sexual morfológica en los machos

genéticos (XY), caracterizada por el inicio de la formación de los cordones seminíferos. En el caso de las hembras, los ovarios no muestran diferencias morfológicas a los 12.5 dpc con respecto a la gónada indiferenciada, sólo se observa crecimiento gonadal debido a la proliferación de las células germinales y somáticas. Es decir, en alrededor de 48 horas se establecen un par de vías de expresión génica en la gónada morfológicamente indiferenciada que conducen a la diferenciación de un testículo o de un ovario en los embriones con genotipo XY o XX respectivamente. Días después, el testículo produce dos factores hormonales: la hormona antimülleriana (AMH, por sus siglas en inglés) y la testosterona, que inducen la diferenciación masculina de los conductos genitales (conductos de Wolff y Müller) y el seno urogenital que, al diferenciarse hará evidente el fenotipo somático del macho. De manera similar al establecimiento de la cresta genital, los conductos y el seno urogenital se establecen como primordios indiferenciados en los embriones de ambos sexos.

Los experimentos clásicos de Alfred Jost (1947) demostraron que al castrar fetos de conejo en etapas previas a la diferenciación sexual somática, los conductos y el seno urogenital siguen la vía feminizante de manera independiente a su sexo genético. Jost descubrió que los testículos fetales producen dos factores necesarios para la diferenciación somática del macho. De manera que la diferenciación sexual fetal depende del proceso molecular conducente al establecimiento del testículo. Algunos autores proponen que la determinación sexual embrionaria podría anteceder a la determinación sexual de la gónada en base a la detección de la expresión de Sry y Zfy en blastocistos XY del ratón (Zwingman *et al.*, 1993; Blecher y Erickson, 2007). Sin embargo, además de no haberse reproducido tales resultados por otros investigadores, se ignora por completo el significado fisiológico de tan precoz expresión.

En general, la mayoría de autores acepta que la determinación del testículo está asociada a la expresión de los genes Sry y Sox9 a nivel de la gónada indiferenciada. El gen Sry actúa como un gen maestro que a manera de “switch” inicia la determinación del testículo desencadenando la vía de expresión de diversos genes involucrados en el proceso de la determinación sexual, por ello es considerado el factor determinante de testículo (FDT/Fdt). En términos celulares, al gen Sry se le ha relacionado con la diferenciación de las células de Sertoli (Burgoyne *et al.*, 1988), con la migración de las células del mesonefros a las crestas genitales (Buehr *et al.*, 1993; Martineau *et al.*, 1997 y Merchant-Larios *et al.*, 1993) y con la proliferación de las células en las crestas genitales (Schmal *et al.*, 2000).

Sin embargo, probablemente el Sry sólo participe de manera indirecta en tales funciones, ya que en el ratón, el fenotipo de las células de Sertoli, la migración y proliferación se mantienen después de los 11.5 dpc, cuando el pico de expresión ha finalizado. Por lo anterior se propone que genes que se expresan después del Sry (*downstream*), inducen y mantienen el desarrollo del testículo. Es aquí donde el gen Sox9, se postula como un fuerte candidato, ya que su expresión es necesaria y suficiente para promover y mantener la diferenciación del testículo en hembras transgénicas (Vidal *et al.*, 2001; Kidokoro *et al.*, 2005).

En el caso de la determinación sexual del ovario, se consideró que este proceso se daba por la simple ausencia (“default”) de un factor determinante del testículo (FDT), después identificado como el gen SRY/Sry (por convención, minúsculas para los genes del ratón). No obstante, también se ha postulado la existencia de un factor determinante de ovario (Od), el cual se encargaría de dirigir la formación del ovario es decir, un “organizador ovárico” (Eicher y Wasburn, 1986). En 1993, McElreavey y colaboradores afirmaron que el Sry actúa como un represor del hipotético gen Z, cuya función sería inhibir la vía de desarrollo (diferenciación) testicular, participando como un factor que previene la formación del testículo (anti-testículo). Estudios recientes de Ottolengui *et al.* (2007) sugieren la existencia de una compleja red de expresión en las gónadas XX que incluiría Od/Z. En ausencia de Sry, la red feminizante se establecería inhibiendo (¿gen Z?) la expresión de Sox9 e iniciando (¿gen Od?) la cascada de expresión conducente a la formación del ovario.

La cascada de genes involucrados en la determinación sexual no es un proceso lineal, donde la expresión de un gen lleva a la regulación positiva o negativa del siguiente gen. El proceso de determinación sexual es una red de eventos moleculares, donde diferentes vías de regulación se encuentran intercaladas. Por ello, el creciente descubrimiento de nuevos genes ha hecho cada vez más compleja la red que al descubrirse el gen Sry, se consideró sencilla y unidireccional.

En esta revisión consideramos el patrón de expresión espacio-temporal de Sry y Sox9 y su correlación con otros genes que se expresan en la cresta genital considerados como reguladores o genes blanco al expresarse río arriba o río abajo (*upstream* o *downstream*) respectivamente, en relación con los dos genes clave para la determinación sexual de la gónada del ratón y probablemente de todos

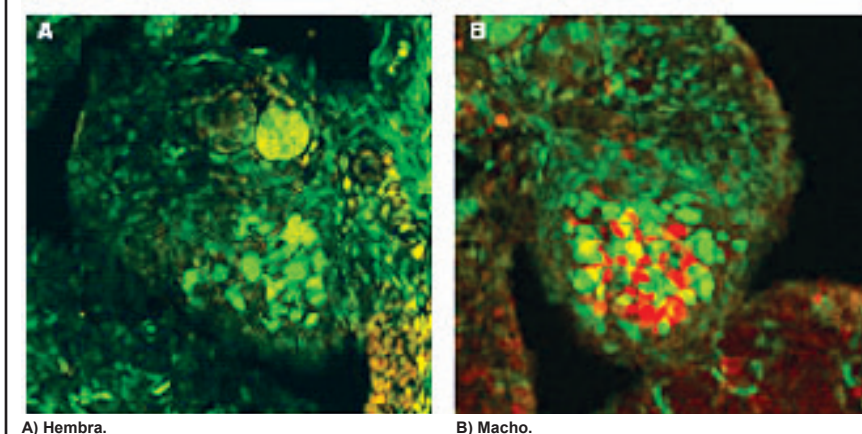
los mamíferos placentados. De esta manera los genes que regulan la expresión de Sry y/o Sox9 son importantes para la determinación sexual gonadal. Posteriormente Sox9 regula la expresión de genes involucrados en el mantenimiento de la diferenciación testicular.

Es necesario enfatizar que el proceso de determinación sexual se lleva a cabo antes de la diferenciación morfológica de la gónada. Las figuras 1A y 1B muestran las crestas genitales XX y XY de ratones de 11.5 dpc. Con inmunohistoquímica es posible detectar a la proteína Sox9 en las células de pre-Sertoli en la gónada XY, cuando aun con microscopía de alta resolución, no es posible distinguir diferencias morfológicas entre las gónadas de uno y otro sexo.

1. Los genes determinantes de testículo: sry y sox9

El gen Sry (Sex determining Region of the Y chromosome) se ubica en el brazo corto del cromosoma Y de los mamíferos. El producto del gen SRY/Sry se ha descrito como un factor de transcripción. La región codificante del gen SRY del humano corresponde a un solo exón que codifica para una proteína de 204 aminoácidos. La proteína SRY se encuentra caracterizada por tres regiones. La región central, único dominio que se encuentra ampliamente conservado entre las especies, corresponde a la caja HMG (*High Mobility Group*). Se han encontrado varias mutaciones en la caja HMG en mujeres XY que desarrollan disgenesia gonadal. Sin embargo, no se ha podido demostrar que SRY/Sry interactúe con el promotor de SOX9/Sox9 de manera que permita su regulación positiva. El dominio N-terminal no posee una región conservada cuya función sea deducida, sin embargo, es susceptible de fosforilación, lo cual podría aumentar la afinidad de Sox9 al ADN blanco. En cuanto a su estructura en el ratón posee

Figura 1. Regiones urogenitales de embriones transgénicos de 11.5 dpc, que expresan la proteína verde fluorescente de manera ubicua en las células somáticas y germinales. La proteína Sox9 es detectada en color rojo por inmunofluorescencia en las células de pre-Sertoli antes de la diferenciación morfológica del testículo.



una región rica en glutamina, la cual no se encuentra en SRY humano ni en la proteína de otras especies de mamífero (Harley *et al.*, 1992) (figura 2A).

El gen Sry se expresa en el testículo durante el periodo crítico de la determinación sexual. En el modelo murino los transcritos de Sry se detectan a los 10.5dpc, observándose el pico de expresión a los 11.5 dpc y la expresión es abatida a los 12.5 dpc (Hacker *et al.*, 1995). En ratones transgénicos, fragmentos de 14 kbs de ADN genómico conteniendo la secuencia del Sry, fueron suficientes para dirigir la diferenciación testicular generando la reversión sexual en ratones XX (Koopman *et al.*, 1991). Este experimento demostró de manera concluyente que el gen Sry correspondía al factor determinante de testículo (FDT) previamente postulado por diversos autores.

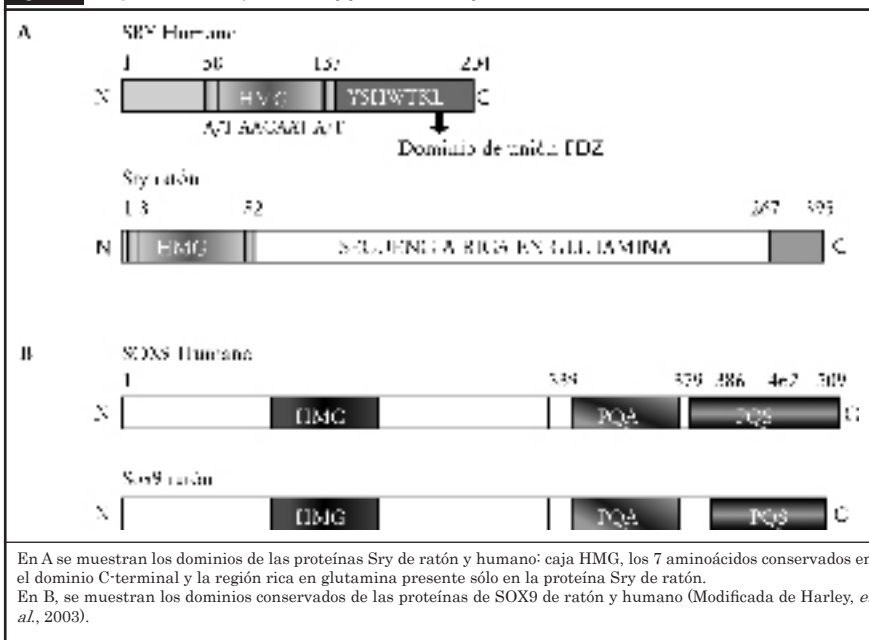
El Sox9 (Sry-like HMG box 9) es un gen autosómico de la familia de Sry. La proteína Sox9 posee dos dominios de activación transcripcional ubicados, río abajo de la caja HMG. Uno de los dominios es rico en residuos prolina-glutamina-serina (dominio PQS), y es indispensable para la actividad transcripcional. El dominio adyacente rico en prolina-glutamina-alanina (dominio PQA) es necesario para mantener la actividad de transcripción al máximo, ya que mutaciones en este dominio disminuyen la capacidad de transactivación de Sox9 (Harley *et al.*, 2003) (figura 2B). En embriones de ratón de 10.5 dpc, se detectan bajos niveles de Sox9 a lo largo de la cresta urogenital en ambos sexos. Sin embargo, esta baja expresión es difusa a lo largo de las crestas urogenitales, ya que no se localiza de manera específica en las células de preSertoli del testículo o bien, en

las células equivalentes en el ovario, las células de la granulosa. A los 11.5 dpc el dimorfismo de expresión es evidente ya que se observa una fuerte expresión en la cresta urogenital del macho, la cual no es detectada en el ovario de la misma edad. A los 12.5 y 13.5 dpc la expresión de Sox9 en el testículo se restringe a los cordones sexuales (Kent *et al.*, 1996; Morais da Silva *et al.*, 1996; Wilhelm *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que Sry regula la expresión de Sox9 debido al patrón espacio temporal que presentan ambos genes. Las células preSertoli regulan positivamente la expresión de Sox9, cuatro horas después de haberse iniciado la expresión de Sry. (Kent *et al.*, 1996; Bullejos y Koopman, 2001; Kidokoro *et al.*, 2005 y Wilhelm *et al.*, 2005). Sin embargo no ha sido posible demostrar de manera concluyente si Sry actúa como un activador transcripcional, represor, o como proteína de interacción para regular positivamente los niveles de Sox9.

Varios genes son regulados de manera positiva después de la expresión de Sox9 y por lo tanto, se consideran blancos potenciales de este gen. De manera específica, se conoce que Sox9 es capaz de unirse y transactivar al promotor de la *Amh in vitro* (De Santa Barbara *et al.*, 1998). Asimismo, mutaciones realizadas muy cerca del dominio de unión de Sox9 en la región promotora del AMH, conlleva a que los ratones XY que poseen la mutación se desarrollen como hermafroditas, ya que se desarrollan los órganos derivados de los conductos müllerianos, presentando un fenotipo idéntico a los ratones XY *Mis*^{-/-} (Arango *et al.*, 1999). Estos trabajos, demuestran que Sox9 es capaz de unirse al promotor y activar la transcripción de la hormona antimülleriana *in vitro* e *in vivo*.

Figura 2. Comparación de las proteínas Sry y Sox9 humano y ratón.



2. Hacia una integración de las redes genéticas en las que se basa la determinación sexual de los mamíferos

La figura 3 muestra una hipotética red genética de la determinación sexual del testículo. Se han incluido a los genes que podrían estar implicados en la regulación de la expresión de Sry/Sox9. Una vez que se regula el aumento de expresión de Sox9 en las células de pre-Sertoli, se incluyen genes implicados en mantener a las células de Sertoli. En la cascada de determinación del testículo, la presencia del gen Sry es la clave de la regulación. La hipometilación de la región reguladora de Sry, es un factor importante

para el acceso a factores de transcripción y coactivadores que junto con la maquinaria de transcripción regulan positivamente la expresión de Sry (figura 4) (Nishino *et al.*, 2004). Entre los factores de transcripción que accesan a la región promotora de Sry se encuentra Wt1, el cual interactúa junto con el receptor nuclear Sf1 para activar al promotor de Sry. Estudios en humano y cerdo han revelado que Wt1 y Sf1 poseen sitios de unión en la región promotora de Sry y son capaces de unirse y activar a dicho promotor *in vitro* (Hossain y Saunders, 2001; De Santa Barbara *et al.*, 2001 y Pilon *et al.*, 2003). El factor de transcripción Gata-4 junto con su coactivador Fog2, podrían estar accesando a la región reguladora de Sry para activar su expresión. Sin embargo aún no se ha demostrado la interacción de Gata-4 y Fog2 con el promotor Sry. En el caso Gata-4 es capaz de unirse al promotor de Amh y probablemente también sea capaz de regular la expresión de esta hormona (Viger *et al.*, 1998). Los diferentes miembros de la familia de receptores a insulina tirosina-cinasa cooperan para regular positivamente la expresión de Sry, ya que el triple knockout para los receptores a insulina tirosina-cinasa (*Ir^{-/-}*, *Irr^{-/-}*, *Igf1r^{-/-}*) muestra reversión sexual de macho a hembra (Nef *et al.*, 2003). La accesibilidad de la región reguladora de Sry por parte Wt1, Sf1, Gata-4 y los diferentes receptores a insulina del tipo tirosina-cinasa lleva al incremento de los niveles de los transcritos de Sry observándose su máxima expresión a los 11.5 dpc en el caso del ratón. En cuanto a la glicoproteína Wnt4 probablemente regule la acción de Sry mediante interacciones proteína-proteína (Jeans-Ward *et al.*, 2004).

Hasta el momento no se ha demostrado la vía mediante la cual Sry activa directa o indirectamente la expresión de Sox9. A pesar de ello, ésta se regula positivamente en el testículo cuatro horas después de iniciarse la expresión de Sry, de manera que la expresión de ambos genes ocurre durante el

proceso de determinación testicular (Kent *et al.*, 1996; Ballejos y Koopman, 2001; Kidokoro *et al.*, 2005 y Wilhelm *et al.*, 2005). Sox9 es capaz de mimetizar la función de Sry, como se observa en individuos xx que al presentar una duplicación o activar a Sox9 desarrollan reversión sexual de hembra a macho (Vidal *et al.*, 2001 y Kidokoro *et al.*,

Figura 3. El eje principal en la cascada molecular de determinación sexual en los mamíferos está establecido por la interacción de Sry. La hipometilación de la región reguladora de Sry permite el acceso a la maquinaria de transcripción y a factores de transcripción para regular positivamente su expresión. En negro se muestran los genes cuyos productos, regulan positivamente la expresión de Sry. El inicio de la expresión de Sry correlaciona con la regulación positiva de la expresión de Sox9 en las células de pre-Sertoli. Sox9 regula positivamente la expresión de Fgf9 y Pgd2, con quienes establece un eje de retroalimentación positiva. AMH es el único blanco de Sox9 y es considerado el marcador de diferenciación de las células de Sertoli.

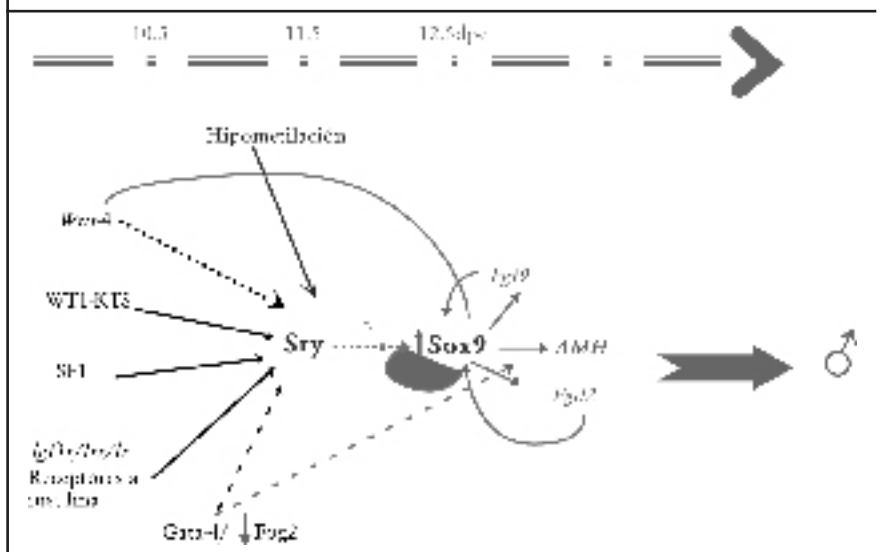
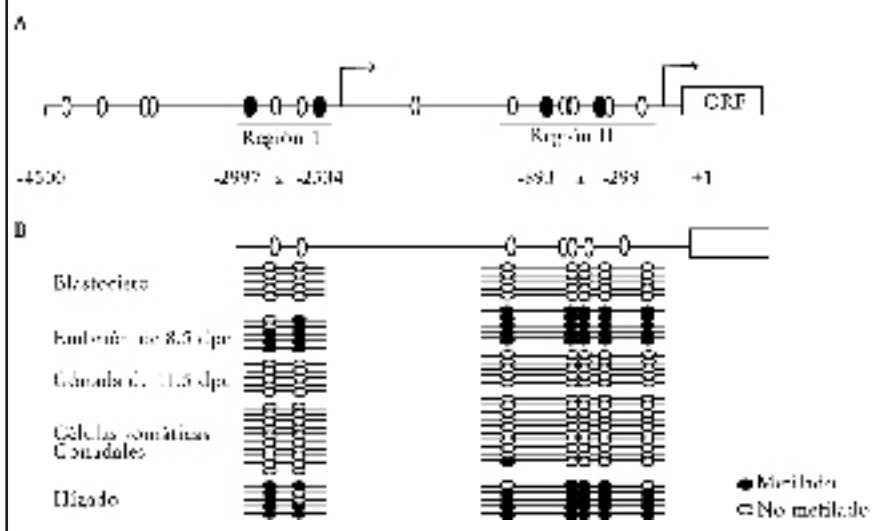


Figura 4. A) Estructura del gen Sry de ratón. Se distinguen 2 regiones (Región I Región II) arriba del sitio de inicio de la transcripción de Sry, los cuales son susceptibles de metilación. B) Nivel de metilación de las regiones I y II determinado por la secuenciación del ADN después del tratamiento con bisulfito de sodio (Modificada de Nishino, *et al.*, 2004).



2005). Una vez que los niveles de Sox9 han aumentado lo suficiente, Sox9 inhibe la expresión de Wnt4 promoviendo la esteroidogénesis y por lo tanto la diferenciación de las células de Leydig. El mantenimiento de la expresión de Sox9 es determinante para la permanencia del testículo diferenciado como lo demuestran los ratones XY Fgf9^{-/-} en los cuales, la diferenciación testicular es abortada al decaer los transcritos de Sox9, aunque el inicio de la expresión de Sox9 no se vea afectada (Kim *et al.*, 2006). La molécula de señalización Pgd2 también está involucrada en mantener la expresión de Sox9 y es capaz de inducir la expresión de Sox9 en células que no expresaron Sry (Wilhelm *et al.*, 2007, Adams y McLaren, 2002). Además Sox9 establece un ciclo de regulación positiva tanto con Fgf9 como con Pgd2 sintasa, lo cual permite el mantenimiento de la expresión de dichos genes durante el desarrollo del testículo (Wilhelm *et al.*, 2007 y Kim *et al.*, 2006). El único gen blanco de Sox9 demostrado *in vivo* e *in vitro* es Amh cuya expresión establece la diferenciación de las células Sertoli y del desarrollo de los caracteres masculinos.

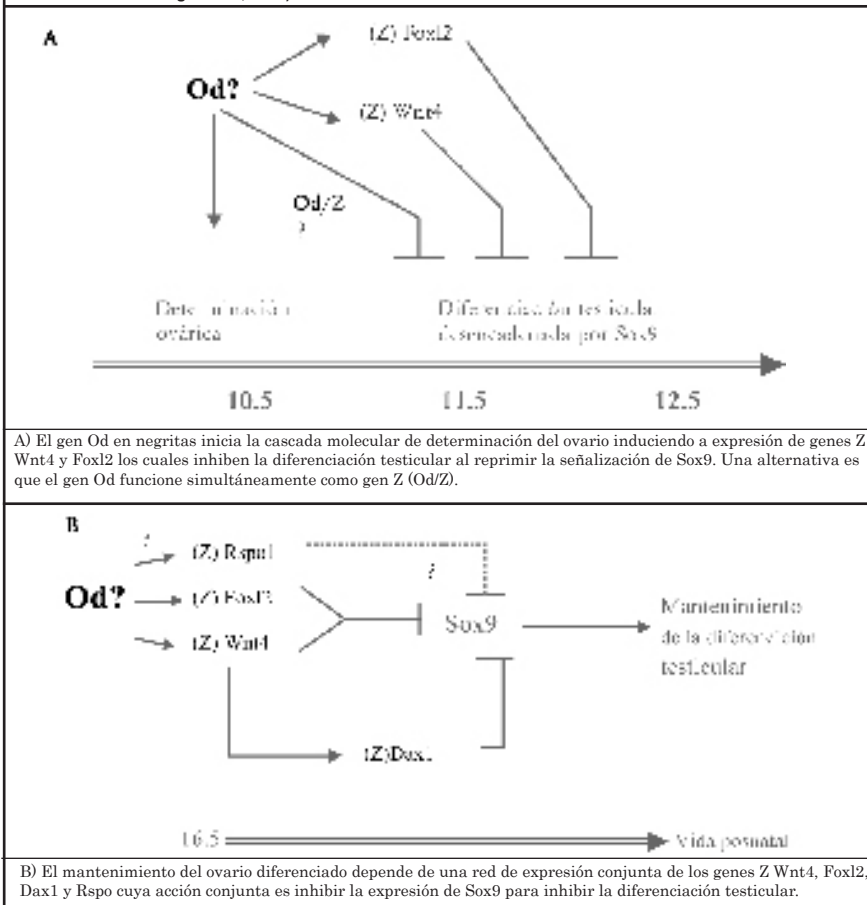
El fenotipo de ratón Lhx9^{-/-} es similar al desarrollado por los ratones Wt1^{-/-} y Sf1^{-/-} es decir, no se mantiene la cresta genital (Luo *et al.*, 1994). Otro gen cuya expresión es previa a la determinación sexual gonadal es Emx2. Ratones con este gen nulificado también inician la formación de la cresta genital pero no logran mantenerla (Miyamoto *et al.*, 1997). Los ratones XY M33^{-/-} desarrollan reversión sexual macho a hembra al no lograr mantener las crestas genitales (Kato-Fukui *et al.*, 1998). Recientemente el grupo de Peter Koopman ha estudiado la expresión del gen Tmem 184a, el cual codifica para una proteína cuya función pudiera ser de una cinasa durante la embriogénesis de la gónada del ratón (Svingen *et al.*, 2007).

Estudios realizados con ayuda de microarreglos durante el periodo crítico de la determinación sexual del ratón, muestran que varias decenas de genes se expresan de manera dimórfica entre los dos sexos (Nef *et al.*, 2005; Beverdam y Koopman, 2006). Sin embargo, el papel que juegan en la determinación sexual es todavía desconocido. Es evidente entonces, que las vías de expresión génica hasta ahora propuestas para explicar la determinación sexual en ambos sexos, son, en el mejor de los escenarios, incompletas.

En la figura 5 se muestra una hipotética red de eventos moleculares que podría estar implicada en la determinación y diferenciación del ovario. Es importante tener claro el papel de estos genes en el desarrollo del ovario ya que para cumplir el papel de determinante ovarico (Od), el gen debe ser capaz de dirigir la vía molecular que lleva a la determinación ovarica, evento previo a la diferenciación del ovario. Es decir un gen o genes que cumplan una función análoga a la que cumple SRY/Sry en la determinación del testículo.

Los genes WNT4, FOXL2, DAX1 y RSP01 han sido propuestos como determinantes de ovario, ya que mutaciones en cada uno de ellos producen reversión sexual de hembra a macho en humanos. Sin embargo, esta reversión sexual es incompleta y no es reproducible de manera similar al humano en ratones nulos. Además, no queda claro si el papel determinante de esos genes se ubica en la vía inhibidora del testículo (genes Z) o en la organizadora del ovario (genes Od).

Figura 5. Propuesta de una representación esquemática de la determinación sexual del ovario basada en la hipótesis del gen determinante del ovario (Od) y del gen inhibidor de la diferenciación testicular (Z) (figura modificada de Ottolenghi *et al.*, 2007).



En gónadas indiferenciadas XX, se detectan bajos niveles de Sox9. Sin embargo, la regulación positiva de Sox9 no alcanza el umbral requerido para iniciar la determinación y diferenciación de las células de Sertoli y, en consecuencia, la organización del testículo. Ya que en la cresta genital bipotencial XX no se encuentra el Sry, los niveles de Sox9 son muy bajos y por lo tanto no se inhibe la expresión de Wnt4. Los niveles de Wnt4 aumentan y junto con Sf1 mantienen bajos los niveles de Sox9 (Vainio *et al.*, 1999). Debido a que las gónadas XX Wnt4^{-/-} muestran una invasión de células endoteliales del mesonefros similar a la invasión que sufren las gónadas XY de los ratones control, se ha propuesto que la función de Wnt4 es reprimir la vía de señalización de macho, bloqueando la migración de las células endoteliales a las gónadas XX (Yao *et al.*, 2004). Sin embargo, los ratones XX Wnt4^{-/-} no muestran ser positivos a marcadores de células de Sertoli, y al nacimiento no hay formación de tejido testicular.

En un principio se postuló a Dax1 como factor determinante del ovario, basado en el fenotipo de reversión sexual en individuos XY con doble copia de Dax1 (Bardoni *et al.*, 1994). Sin embargo, la generación del ratón Knockout reveló que también es necesario para el desarrollo testicular (Yu *et al.*, 1998). Se ha reportado que Dax1 inhibe la interacción sinérgica de Sf1 con Wt1, por lo que funciona como un antagonista de la producción de Amh, considerado marcador de diferenciación de Sertoli (Niakan y McCabe 2005, para revisión).

El gen Foxl2 muestra expresión específica en las gónadas de hembras en ratón, pollo, tortuga y peces durante la determinación sexual (revisión de Yao, 2005). El dimorfismo de expresión llevó a postular al Foxl2 como un factor importante en la vía de determinación del ovario. Experimentos con el ratón XX Foxl2^{-/-} mostró reversión sexual parcial al nacimiento y su sobreexpresión en gónadas XY llevó a la desorganización de los cordones testiculares. Tales resultados concuerdan con una función de antitestículo del Foxl2. Por otra parte, la expresión de Fog2 en el ovario inhibe la función de Gata-4 necesaria para la regulación positiva de Amh. La ausencia de Amh en las hembras permite la diferenciación de las trompas de Falopio, útero, cuello uterino y el tercio superior de la vagina (Anttonen *et al.*, 2003) como era de esperarse según el paradigma de Alfred Jost. Recientemente se reportó que el doble Knockout para Wnt4 y Foxl2 el cual presenta reversión sexual de hembra a macho. Las gónadas XX del recién nacido, desarrollan una corteza ovárica donde los ovocitos muestran una profase tardía. Sin embargo, la médula desarrolla cordones testiculares cuyas células expresan Sox9 y Amh. Las células germinales ubicadas en dicha médula se diferencian como espermatogonias. Por lo que el doble knockout de Wnt4/Foxl2 desarrolla ovotestis al nacimiento y no produce una reversión sexual completa (Ottolengui *et al.*, 2007).

Hasta el momento no se han encontrado el o los genes que de manera individual funcionen como un organizador ovárico Od, o bien como un anti testículo al inhibir la vía del desarrollo del testículo. Sin embargo, el desarrollo del doble *knockout* de Wnt4 y Foxl2 es el primer modelo experimental de reversión sexual de hembra a macho que propone que la expresión conjunta de varios genes lleva a la inhibición del desarrollo testicular. De esta manera la expresión de ambos genes en el ovario es necesaria para inhibir algunos aspectos de la diferenciación del macho, al menos en la vida posnatal. Es decir, la función de antitestículo de Wnt4 y Foxl2 es clara en la vida posnatal. Como sólo se ha reportado una descripción parcial del fenotipo desarrollado por los ratones XX Wnt4^{-/-} Foxl2^{-/-} es necesario conocer la descripción de gónadas XX Wnt4^{-/-} Foxl2^{-/-} embrionarios, lo cual ayudará a discernir el papel de ambos genes en la determinación sexual gonadal.

Parma y colaboradores (2006) describieron la reversión sexual de hembra a macho en pacientes que presentan una mutación en el gen R-spondin1 (RSPO1). Como en las mutaciones arriba descritas, se propuso a RSPO1 como el “organizador ovarico”. RSPO1 es parte de una familia de proteínas ligando huérfanas, que actúan mediante la activación de las vías de señalización Wnt y β -catenina. En el caso de los condrocitos la vía de señalización a través de β -catenina lleva a la degradación de Sox9 (Akiyama *et al.*, 2004). Asumiendo que este hecho pueda pasar en el desarrollo de la gónada, se postuló a RSPO1 como el gen Z, al reprimir la vía de determinación testicular al degradar a Sox9 mediante la vía β -catenina (Capel, 2006). Sin embargo, recientemente Tomizuka *et al.* (2008) encontraron que las hembras RSPO^{-/-} presentan pseudohermafroditismo al retener derivados tanto de los conductos de Wolf como Müller y no se detecta la expresión de Sox9. Además, a los 14.5 dpc las gónadas XX de RSPO^{-/-} tienen la forma normal de un ovario silvestre de la misma etapa. Queda claro así que la ausencia de RSPO Rspo1 no provoca una reversión sexual primaria. Se trata de un proceso secundario de desdiferenciación ovárica debido a la muerte de las células germinales.

3. Hormonas esteroides y determinación sexual

La administración exógena de estrógenos a embriones de peces, anfibios, reptiles y aves con frecuencia lleva a la reversión sexual (Elbrecht y Smith, 1992; Merchant-Larios *et al.*, 1997; Pieau *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 1999). De manera que se ha propuesto que los estrógenos y sus receptores (RE α y RE β), participan en el proceso de determinación sexual de estas especies. Sin embargo, en los mamíferos placentados, el suministro de hormonas esteroides a los embriones, produce

efectos teratológicos pero no inducen reversión sexual. Una posible explicación a esto es que a pesar de la presencia de Sf1 (el cual regula la expresión de enzimas importante en la biosíntesis de hormonas esteroides) en las crestas genitales de ambos sexos, su función es inhibida por la presencia de Wnt4. Por lo que el papel de Wnt4 durante la determinación sexual es la de reprimir la esteroidogénesis en ambos sexos (Jeans-Ward *et al.*, 2004). El aumento de la expresión de Sox9 en el

testículo lleva a la regulación negativa de la expresión de Wnt4, por lo que en el testículo se inicia la actividad esteroidogénica en las células de Leydig. En cambio en los ovarios, la actividad de Wnt4 se mantiene inhibiendo la actividad esteroidogénica. (Jeans-Ward *et al.*, 2004). A pesar de que en el ratón, el sistema de respuesta inicial a estrógenos (receptores) está presente en los órganos reproductivos fetales de ambos sexos no hay un efecto aparente aún en la diferenciación sexual (Greco *et al.*, 1993). Sin embargo, en el caso de los mamíferos marsupiales, se ha logrado inducir la reversión sexual de macho a hembra mediante la administración exógena de estrógenos (Burns, 1955, Coveney *et al.*, 2001). Así, la presencia de los elementos de respuesta a estrógenos en gónadas de mamíferos placentados y la posibilidad de revertir el sexo en marsupiales permiten suponer que se trata de una reminiscencia evolutiva de sus antecesores (Coveney *et al.*, 2001).

objetivo

NOTA: Durante la revisión de este manuscrito, se reportó el hallazgo de un elemento aumentador (enhancer) de la expresión de Sox9 en la gónada del ratón. Es una secuencia 1.4 Kb conservado en mamíferos, incluido el humano, al cual llamaron TESCO (tesis-specific enhancer of Sox9 core). Encontraron que Sry y Sf1 actúan de manera sinérgica sobre TESCO para regular positivamente la expresión de Sox9. Los autores proponen que Sf1 desempeña un papel dominante en la determinación y diferenciación del testículo (Sekido y Lovell-Badge, (2008). "Sex Determination Involves Synergistic Action of SRY and SF1 on a Specific Sox9 Enhancer". *Nature*, 453:930-934).

Bibliografía

- Adams, I. y A. McLaren (2002). "Sexually Dimorphic Development of Mouse Primordial Germ cells Switching from Oogenesis to Spermatogenesis", *Development*. 129: 1155-1164.
- Akiyama, H.; J.P. Lyons; Y. Mori-Akiyama; X. Yang; R. Zhang; Z. Zhang; J. M. Deng; M. M. Taketo; T. Nakamura; R. R. Behringer; P. D. McCrea y B. de Crombrugge (2004). "Interactions between Sox9 and beta-catenin Control Chondrocyte Differentiation", *Genes Dev*. 18:1072-1087.
- Anttonen, M.; I. Ketola; H. Parviainen; A. Pusa y M. Heikinheimo (2003). "FOG-2 and GATA-4 are Coexpressed in the Mouse Ovary and can Modulate Müllerian-Inhibiting Substance Expression", *Biol. Rep.* 68, 1333-1340.
- Arango, N. A.; R. Lovell-Badge y R. R. Behringer (1999). "Targeted mutagenesis of the endogenous mouse Mis gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development", *Cell* 99, 409-419.
- Bardoni, B.; E. Zanaria; S. Guioli; G. Florida; K.C. Worley; G. Tonini; E. Ferrante; G. Chiumello; E. R. B. McCabe; M. Fraccaro; O. ZuVardi y G. Camerino (1994). "A Dosage Sensitive Locus at Chromosome Xp21 is Involved in Male to Female Sex Reversal", *Nat. Genet.* 7: 497-501.
- Beverdam, A. y P. Koopman (2006). "Expression Profiling of Purified Mouse Gonadal Somatic Cells During the Critical Time Window of Sex Determination Reveals Novel Candidate Genes for Human Sexual Dysgenesis Syndromes", *Hum Mol Gen* 13: 417-431.
- Blecher, S. R. y R. P. Erickson (2007). "Genetics of Sexual Development. A New Paradigm", *Am J Med Gen Part A*. 143: 3045-3068.
- Buehr, M.; S. Gu y A. McLaren (1993). "Mesonephric Contribution to Testis Differentiation in the Fetal Mouse", *Development*. 117: 273-281.
- Bullejos, M. y P. Koopman (2001). "Spatially Dynamic Expression of Sry in Mouse Genital Ridges", *Dev. Dyn.* 221: 201-205.
- Burgoyne, P.; M. Buehr; P. Koopman; J. Rossant y A. McLaren (1988). "Cell-autonomous Action of the Testis-determining Gene: Sertoli Cells are Exclusively XY in XX-XY Chimaeric Mouse Testis", *Development*. 102:443-450.
- Burns, R. K. (1955). "Experimental Reversal of Sex in the Gonads of the Opossum *Didelphys Virginiana*", *Proc Natl Acad Sci USA*. 41: 669-676.
- Capel, B. (2006). "R-spondin Tips the Balance in Sex Determination", *Nature Genetics*. 38: 1233-1234.
- Coveney, D.; G. Shaw; M. B. Renfree (2001). "Estrogen-induced Gonadal Sex Reversal in the Tammar Wallaby", *Biol. Reprod.* 65: 613-621.
- De Santa Barbara, P.; N. Bonneaud; B. Boizet; M. Desclozeaux; B. Moniot; P. Sudbeck; G. Scherer; F. Poulat y P. Berta (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: 6653-6665.
- De Santa Barbara, P.; C. Me’jean; B. Moniot; M. Malcè’s; P. Berta y B. Boizet-Bonhoure, B.(2001). “Steroidogenic Factor-1 Contributes to the Cyclic-adenosine Monophosphate Down-regulation of Human SRY Gene Expression”, *Biol. Reprod.* 64: 775-783.
- Eicher, E.M. y L.L. Washburn (1986). “Genetic Control of Primary Sex Determination in mice”, *Ann Rev Genetic* 20: 327-360.
- Elbrecht, A. y R.G. Smith (1992). “Aromatase Enzyme Activity and Sex Determination in Chickens”, *Science.* 255: 467-470.
- Greco, L.T.; M.T. Duello y J. Gorsky (1993). “Estrogen Receptors, Estradiol, and Diethylstilbestrol in early Development: The Mouse as a Model for the Study of Estrogen Receptors and Estrogen Sensitivity in Embryonic Development of Male and Female Reproductive Tracts”, *Endocr Rev.* 14: 59-71.
- Hacker, A.; B. Capel; P. Goodfellow y R. Lovell-Badge (1995). “Expression of Sry in the Mouse Sex Determining Gene. Development 121:1603-1614 Genital Ridges”, *Dev. Dyn.* 221: 201-205.
- Harley, V. R.; M. J. Clarkson y A. Argentaro (2003). “The Molecular Action and Regulation of the Testis-determining Factors, SRY (Sex-determining Region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related High-Mobility Group (HMG) Box9]”, *Endocrine Rev.* 24: 466-487.
- Harley, V.R.; D. I. Jackson; P. J. Hextall; J. R. Hawkins; G. D. Berkovitz; S. Sockanathan; R. Lovell-Badge y P.N. Goodfellow (1992). “DNA Binding Activity of Recombinant SRY from Normal Males and XY Females”, *Science.* 255: 453-456.
- Hayes, T. B. y K. P. Menendez (1999). “The Effect of Sex Steroids on Primary and Secondary Sex Differentiation in the Sexually Dichromatic Reedfrog (*Hyperolius argus: Hyperolidae*) from the Arabuko Sokoke Forest of Kenya”, *Gen Comp Endocrinol.* 115: 188-199
- Hossain, A. y F. Saunders (2001). “The Human Sex-determining Gene SRY is a Direct Target of WT1”, *J. Biol. Chem.* 276:16817-16823.
- Jeays-Ward, K.; M. Dandonneau y A. Swain (2004). “Wnt4 is Required for Proper Male as well as Female Sexual Development”, *Dev. Biol.* 276: 431-440.
- Jost, A.
 _____ (1947). “Recherches sur la différenciation de l’embryon de lapin: 3eme partie: rôle des gonades fœtales dans la différenciation sexuelle somatique”, *Arch d’Anat microscop Morph Exp.* 36: 271-312.
- _____ (1971). “Embryonic Sexual Differentiation (Morphology, Physiology, Abnormalities)”, en Jones, H.W. y W.W. Scott. *Hermaphroditism, Genital Anomalies and Related Endocrine Disorders*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- Katoh-Fukui, Y.; R. Tsuchiva; T. Shimishi; Y. Nakahara; N. Hashimoto; K. Noguchi y T. Higashinakagawa (1998). “Male-to-female Sex Reversal in M33 Mutant Mice”, *Nature.* 393: 688-692.
- Kent, J.; C. S. Wheatley; E.J. Andrews; H.A. Sinclair y P. Koopman (1996). “A Male-Specific Role for Sox9 in Vertebrate Sex Determination”, *Development.* 122: 2813-2822.
- Kidokoro, T.; S. Matoba; R. Hiramatsu; M. Fujisawa, M. Kanai-Azuma; C. Taya; M. Kurohmaru; H. Kamakami; Y. Hayashi; Y. Kanai y H. Yonekawa (2005). “Influence on Spatiotemporal Patterns of a Male-specific Sox9 Activation by Ectopic Sry Expression During Early Phases of Testis Differentiation in Mice”, *Dev. Biol.* 278: 511-525.
- Kim, Y.; A. Kobayashi; R. Sekido; L. DiNapoli; J. Brennan; M. E. Chaboissier; F. Poulat; R. Behringer; R. Lovell-Badge y B. Capel (2006). “Fgf9 and Wnt4 act as Antagonistic Signals to Regulate Mammalian Sex Determination”, *PLoS biology.* 4: 1000-1009.
- Koopman, P.; J. Gubbay; N. Vivian; P. Goodfellow y R. Lovell-Badge (1991). “Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry”, *Nature.* 351: 117-121.
- Luo, X.; Y. Ikeda y K.L. Parker (1994). “A Cell Specific Nuclear Receptor is Essential for Adrenal and Gonadal Development and Sexual Differentiation”, *Cell.* 77: 481-490.
- Martineau, J.; K. Nordqvist; C. Tilmann; R. Lovell-Badge y B. Capel (1997). “Male-specific cell migration into the development and sexual differentiation”, *Cell.* 77: 958-968.
- McElreavey, K.; E. Vilain; N. Abbas; I. Herskowitz y M. Fellous (1993). “A Regulatory Cascade Hypothesis for Mammalian Sex Determination: SRY Represses a Negative Regulator of Male Development”, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 90: 3368-3372
- Merchant-Larios, H.; N. Moreno-Mendoza y M. Buehr (1993). “The role of the Mesonephros in Cell Differentiation and Morphogenesis of the Mouse Fetal Testis”, *Int. J. Dev. Biol.* 37: 407- 415.
- Merchant-Larios, H.; S. Ruiz-Ramírez; N. Moreno-Mendoza y A. Marmolejo-Valencia (1997). “Correlation Among Thermosensitive Period, Estradiol Response, and Gonadal Differentiation in the Sea Turtle *Lepidochelys olivacea*”, *Gen Com Endocr.* 107: 373-385.
- Miyamoto, N.; K. Yoshida; S. Kuratani; I. Matsuo y S. Aizawa (1997). “Effects of Urogenital Development in Mice Lacking Emx2”, *Development.* 124: 1653-1664.
- Morais da Silva, S.; A. Hacker; A. Swain y R. Lovell-Badge (1996). “Sox9 Expression During Gonadal Development Implies a Conserved Role for the Gene in Testis Differentiation in Mammals and Birds”, *Nature genetic.* 4:62-68.

- Nef, S.; O. Schaad; N. R. Stallings; C. R. Cederroth; J. L. Pitetti; G. Schaer; S. Malki; M. Dubois-Dauphin; B. Boizet-Bonhoure; P. Descombres; K. L. Parker; K. L. y J. D. Vassalli (2005). "Gene Expression During Sex Determination Reveals a Robust Female Genetic Program at the Onset of Ovarian Development", *Dev Biol.* 287: 361-377.
- Nef, S.; S. Verma-Kurvari; J. Merenmies; J. Vassalli; A. Efstratiadis; D. Accili y L. F. Parada (2003). "Testis Determination Requires Insulin Receptor Family Function in Mice", *Nature.* 426: 291-295.
- Niakan, K. K. y E. R. B. McCabe (2005). "Dax Origin, Function and a Novel Role", *Dev Gen Metabol.* 86: 70-83.
- Nishino, K.; N. Hattori; S. Tanaka y K. Shiota (2004). "DNA Methylation-mediated Control of Sry Gene Expression in Mouse Gonad Development", *J. Biol. Chemistry.* 279: 22306-22313.
- Ottolenghi, C.; E. Pelosi; J. Tran; M. Colombino; E. Douglass; T. Nedorezov; A. Cao; A. Forabosco y D. Schlessinger (2007). "Loss of Wnt4 and Foxl2 Leads to Female-to-male Sex Reversal Extending to Germ Cells", *Hum Mol Genet.* 16:2795-2804.
- Parma, P.; O. Radi; V. Vidal; M. C. Chaboissier; E. Dellambra; S. Valentini; L. Guerra; A. Schedl; G. Camerino (2006). "R-spondin1 is Essential in Sex Determination, Skin Differentiation and Malignancy", *Nat Genet.* 38:1304-1309.
- Pieau, C. ; M. Dorizzi y N. Richard-Mercier (1999). "Temperature-dependent sex Determination and Gonadal Differentiation in Reptiles", *Cell Mol Life Sci.* 55: 887-900.
- Pilon, N.; I. Daneau; V. Paradis; F. Hamel; J. G. Lussier; R. S. Viger y D. W. Silversides (2003). "Porcine SRY Promoter is a Target for Steroidogenic Factor 1", *Biology of reproduction.* 68: 1098-1106.
- Polanco, J. C. y P. Koopman (2007). "Sry and the Hesitant Beginnings of Male Development", *Dev Biol.* 302: 13-24.
- Schmahl, J.; E. M. Eicher; L. L. Washburn y B. Capel (2000). "Sry Induces Cell Proliferation in Mouse Gonad", *Development.* 1127: 65-73.
- Svingen, T.; A. Beverdam; P. Bernard; P. McClive; V. Harley; A. Sinclair y P. Koopman (2007). "Sex-specific Expression of a Novel Gene Tmem 184a During Mouse Testis Differentiation", *Reproduction.* 133: 983-989.
- Tomizuka, K.; K. Horikoshi; R. Kitada; Y. Sugawara; Y. Iba; A. Kojima; A. Yoshitome; K. Yamawaki; M. Amagai; A. Inoue; T. Oshima y M. Kakitani (2008). "R-spondin1 Plays an Essential Role in Ovarian Development Through Positively Regulating Wnt-4 Signaling", *Hum Mol Gen.* 17: 1278-1291.
- Vainio, S.; M. Heikkila; A. Kispert; N. Chin y A. P. McMahon (1999). "Female Development in Mammals is Regulated by Wnt-4 Signalling", *Nature.* 397: 405-409.
- Vidal, V.P.; M. C. Chaboissier; D. G. de Rooij y A. Schedl (2001). "Sox9 Induces Testis Development in XX Transgenic Mice", *Nature genetics.* 28: 216-217.
- Viger, R.; C. Mertineit; J. M. J. Trasler y M. Nemer (1998). "Transcription Factor GATA-4 is Expressed in a Sexually Dimorphic During Mouse Gonadal Development and is a Potent Activator Inhibiting Substance Promoter", *Development.* 125: 2665-2675.
- Wilhelm, D.; R. Hiramatsu; H. Mizusaki; L. Widjaja; A. Combes; Y. Kanai y P. Koopman (2007). "Sox9 Regulates Prostaglandin D Synthase Gene Transcription in Vivo to Ensure Testis Development", *J. Biol. Chemistry.* 282: 10553-10560.
- Wilhelm, D.; F. Martinson; S. Bradford; W. Megan; A. Combes; A. Beverdam; J. Bowles; H. Mizusaki y P. Koopman (2005). "Sertoli Cell Differentiation is Induced Both Cell-autonomously and Through Prostaglandin Signaling During Mammalian Sex Determination", *Devel. Biol.* 287:111-124.
- Yao, H.H-C (2005). "The Pathway to Fecundity: Current Knowledge on Embryonic Development of the Ovary", *Mol Gen Metabol.* 86: 70-83.
- Yao, H.H.; M. M. Matzuk; C. J. Jorgez; D. B. Menke; D. C. Page y A. Swain (2004). "Follicle-stimulating hormone Operates Downstream of Wnt4 in Mammalian Ovary Organogenesis", *Dev Dyn.* 230: 210-215.
- Yu, R.N.; M. Ito; T. L. Saunders; S. A. Camper y J. L. Jameson (1998). "Role of Nr0b1 in Gonadal Development and Gametogenesis", *Nat Genet.* 20: 353-357.
- Zwingman, T.; R. P. Ericsson; T. Boyer y A. Ao (1993). "Transcription of the Sex-determining Region Genes Sry and Zfy in the Mouse Preimplantation Embryo", *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 814-817.

