UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

EXPRESIÓN DEL GEN *ASHWIN* EN TEJIDOS OVÁRICOS Y TESTICULAR DE BOVINO POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* E INMUNOHISTOQUÍMICA

POR:

I.Z.S.P. DANIEL MORALES ADAME

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÁREA MAYOR EN REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

Expresión del gen *Ashwin* en tejidos ovárico y testicular de bovino por hibridación *in situ* e inmunohistoquimica. Tesis presentada por Daniel Morales Adame como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias.

Ph. D. Carlos Ortega Ochoa
Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

Ph. D. Alma Delia Alarcón Rojo
Secretario de Investigación y Posgrado

D. Ph. Agustín Corral Luna
Coordinador Académico

Dr. Everardo González Rodríguez.
Presidente

20-Enero-2017

Fecha

Comité:

Dr. Everardo González Rodríguez.
Dra. Verónica Moreno Brito
Ph. D. Juan Alberto Grado Ahuir
D. Ph. Joel Domínguez Viveros

© Derechos Reservados
DANIEL MORALES ADAME
DIRECCIÓN: PERIFÉRICO FRANCISCO R. ALMADA KM. 1, CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO C.P. 31453
ENERO 2016

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a CONACYT así como a la Secretaria de Investigación y Posgrado de Facultad de Zootecnia y Ecología, de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

Agradezco al Laboratorio de Transgénesis Animal y Fertilización *in vitro*, por brindar la posibilidad de realizar el presente trabajo y a su vez un posgrado.

Es grato tener el honor, de contar con la oportunidad de agradecer la tutela y dirección del Dr. Everardo González Rodríguez, a quien agradezco profundamente por involucrarme en el proyecto *Ashwin*, así como permitirme formar parte del Laboratorio de Transgénesis Animal. Gracias por su cordial asesoramiento y enseñanza, por su paciencia y su completa disposición para la constante orientación en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas. Especialmente a la Dra. Verónica Moreno Brito por abrir las puertas del Laboratorio de Proteomica Celular y Molecular, y ofreciéndome la oportunidad de ser su estudiante, su aprendiz e incluso su compañero. Extiendo mis agradamientos a M.C. Ruth Lechuga Valles por su consejo y experiencia. Agradezco profundamente a M.C. Luz Elena Palma Cano por compartirme de su capacidad, enseñarme lo indispensable de la química así como su gran ayuda, confianza y compañía. Agradezco a M.C. Myriam Rebeca Márquez Chávez por sus palabras en el momento adecuado, su amabilidad, disponibilidad y su tiempo. De igual manera agradezco Ale González, MaElena, Samanta y Araceli. Gracias por permitirte trabajar a su lado y dejarme aprender

de ustedes, y brindarme su amistad durante mi estancia en la Facultad de Medicina.

Dr. Cesar Pacheco Tena. Gracias por la oportunidad de trabajar en el proyecto de *Ashwin* en el laboratorio de PABIOM de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH. Agradezco infinitamente a M.C. Susana Aidé González Chávez. Por ofrecerme su apoyo incondicional, conocimientos y tiempo necesario para mi aprendizaje. Maestra gracias por todas sus valiosas aportaciones para realizar los procesos y análisis técnicos indispensables en esta investigación. De igual manera M.C. Celia gracias por su paciencia y dedicación al brindarme su consejo y experiencia en el desarrollo de este proyecto.

Aprovecho de la misma manera para ofrecer mis agradecimientos a. Ph D. Alberto Grado por su ejemplo, catalogado por mi parte como uno de los mejores profesores de la Facultad de Zootecnia y Ecología. Quien con su ejemplo, muestra que el campo no está peleado con el laboratorio, si no que al relacionarse la práctica de la investigación, pueden lograr grandes éxitos.

Agradezco el gran ejemplo de mis compañeros y amigos del laboratorio: Dra. Eduviges Burrola. M en C. Javier Antillón, Adriana, Gaby, Morgado, Perla, Alva, Tavo, Ana Laura, Claudia, Normando, Jaime, Álvaro y Betty, que me brindaron su compañía y esas indispensables palabras que sin duda fueron base en la motivación para llevar a cabo la investigación. Resalto el agradecimiento a Don Luis por su amistad, gentileza y consejo. No puedo dejar de agradecer a quien me refiero con todo el respeto como mis grandes amigos,

a mis profesores y compañeros de clase: especialmente a Arras, Viry, Paty, Pepe, Marta, Jorge, Sergio, Alan y Raul Corral.

A cada persona que estuvo relacionada y al pendiente de cada proceso y etapa de este proyecto muchas gracias.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana:

David Morales, Josefina Adame y Claudia Morales.

CURRICULUM VITAE

El autor nació el 27 de abril de 1988, en la ciudad de Cuauhtémoc Chihuahua. México.

2003-2006	Estudios de técnico: físico, matemático, químico, biológico en la especialidad de técnico agropecuario, en el Centro Bachillerato Tecnológico agropecuario No. 90 Cd. Cuauhtémoc, Chih. México.
2007-2011	Estudiante de la carrera: de Ingeniero Zootecnista Sistemas de Producción en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Chihuahua, Chih. México
2012-2014	Estudiante de la maestría en ciencias de Reproducción y genética en la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Chihuahua, Chih. México.
2014-2015	Profesor e investigador adjunto del Laboratorio de Proteomica Celular y Molecular. De la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, Cd. Chihuahua, Chih. México.

RESUMEN

EXPRESIÓN DEL GEN *Ashwin* EN TEJIDOS OVÁRICO Y TESTICULAR DE BOVINO POR HIBRIDACIÓN *IN SITU* E INMUNOHISTOQUIMICA

POR:

I. Z. S. P. DANIEL MORALES ADAME

Maestro en Ciencias en Producción Animal

Secretaria de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente Dr. Everardo González Rodríguez

La foliculogénesis y espermatogénesis son procesos biológicos que tienen como objetivo el desarrollo y diferenciación de los ovocitos y espermatozoides. Son controlados mediante mecanismos hormonales y genéticos estrictamente regulados. El gen *Ashwin* ha demostrado ser un candidato que potencialmente interviene en la programación genética de estos procesos. El análisis por RT-PCR demostró una importante expresión de este gen en ovario y testículo. Además, su expresión en las etapas del desarrollo embrionario temprano, es similar al identificado en los genes de efecto materno. Lo anterior sustenta la potencial importancia de la proteína en los procesos reproductivos, sin embargo, se requiere generar más información que permita el entendimiento de la relevancia funcional de esta proteína en el ovario y testículo. El presente trabajo aplica las técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, realizadas en cortes histológicos de ovario y testículo fetal

y adulto para empezar a generar una respuesta a esta interrogante. Por medio de ambos procedimientos se logró identificar en estos órganos, la expresión de *Ashwin* a nivel de transcrito y proteína, específicamente en los distintos estadios del desarrollo y maduración del ovocito. En testículo fetal la proteína fue identificada específicamente en las espermatogonias, mientras que en adulto fue observada en los espermatocitos primarios, secundarios y espermatidas. En conjunto las observaciones sustentan la hipótesis de que la proteína Ashwin en el ovario y el testículo, está relacionada con la determinación, desarrollo y diferenciación de las células germinales como son los óvulos y espermatozoides.

EXPRESSION OF *Ashwin* GENE IN OVARIAN TISSUE AND VEAL TESTICULAR AND BY IN SITU HYBRIDIZATION AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY

BY:

DANIEL MORALES ADAME

Folliculogenesis and spermatogenesis are biological processes aimed at the development and differentiation of oocytes and sperm. They are controlled tightly regulated by genetic and hormonal mechanisms. The *Ashwin* gene has proven to be a candidate gene potentially involved in the programming of these processes. Analysis of the expression of this gene by RT-PCR showed a significant expression of this gene in ovarian and testicular tissue. Furthermore expression in various stages of early embryo development is similar to that identified in maternal effect genes that are expressed only in oocytes and embryos at 2-4 cell. This supports the potential importance of protein in reproductive processes, but it requires further information to help generate understanding the functional relevance of this protein in the ovary and testis. This paper applies the techniques of in situ hybridization and immunohistochemistry, performed in histological sections of fetal and adult ovary and testis to answer this question. Together both methods allowed us to identify histological ovarian and adult and fetal testis expression *Ashwin* to transcript level, but especially its protein is synthesized specifically in the various stages of development and maturation of the oocyte (primordial follicle germinal, primary, secondary and Graff). In testis protein it was identified specifically in

spermatogonia in the fetal testis and primary, secondary spermatids and spermatocytes in adult tissue. Taken together our observations support the hypothesis that protein *Ashwin* in the ovary and testis is related to the identification, development and differentiation of germ cells like eggs and sperm.

CONTENIDO

Pagina

RESUMEN……...…..…… xii

ABSTRACT.……... xiv

LISTA DE CUADROS ……..……... xx

LISTA DE FIGURAS ……. xxi

LISTA DE ABREVIATURAS …….. xxii

INTRODUCCIÓN……...……... 1

REVISIÓN DE LITERATURA.……..……..……. 3

Primeras Etapas de la Formación Gonadal en Bovinos…… 3

El Ovario Bovino…… 4

Foliculogénesis y Ovogénesis Bovina……... 4

Factores que Influyen en la Foliculogénesis…… 6

Factores hormonales…… 6

Factores genéticos……..…….. 7

El Testículo Bovino……..…… 9

Espermatogénesis Bovina……... **9**

Factores que Influyen en la Espermatogénesis ……..... 10

Factores hormonales……... 10

Factores genéticos…….. 11

El Gen Ashwin, un nuevo gen implicado en la reproducción en bovinos ……..…….…..…. 13

MATERIALES Y MÉTODOS..……..... 17

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)……. 17

Clonación del ADNc de *Ashwin* en el Vector pCR4-TOPO4.0kb.. 17

Transformación de Bacterias TOP10…… 18

Extracción de DNA Plasmidio Mediante el Método de Lisis Alcalina……..……... 20

Ultrapurificación de Plásmidos……..……..…… 21

Secuenciación…….. 22

Síntesis de la Sonda de RNA marcada…… 22

Linearización de plásmidos por restricción enzimática…... 22

Purificado del plásmido linealizado…… 23

Transcripción *in vitro*…….…… 24

Purificación de ARN con aminas modificadas..…… 25

Etiquetado del ARN con amina modificada con el Fluorocromo Alexa 488…….. 26

Purificación de ARN marcado con el Fluorocromo Alexa 488……... 26

Precipitación con etanol del ARN marcado…….. 27

Procesamiento Histológico del Tejido de Ovario y Testículo…… 28

Fijación de tejidos……..…….. 28

Deshidratación y embebido en parafina..…….. 28

Formación de bloques de parafina…… 28

Cortes histológicos…… 30
Evaluación Histológica…… 30
Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)…… 30
Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH)…… 30
Pre- hibridación…… 30
Hibridación…… 32
Pos-hibridación……..…….. 32
Inmunohistoquímica en Tejidos…….. 33
Desparafinazación…… 33
Recuperación antigénica…… 33
Permeabilización……..…… 33
Bloqueo……... 34
Anticuerpo primario……..……. 34
Detección por inmunohistoquímica…… 34
Tinción de núcleos…… 35
Microscopia…… 35
Microscopia óptica…… 35
Microscopia de fluorescencia para FISH……..…… 35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN…..……..…..…….. 38
Identificación de Transcritos que Codifican a la Proteína Ashwin en Tejido Ovárico……..……..…….…… 42
Distribución Celular de la Proteína Ashwin por Medio de

Inmunohistoquimica…….. 47

Expresión de la Proteína Ashwin en Tejido Ovárico Fetal y Adulto……..…… 47

Expresión de la Proteína Ashwin en Tejido Testicular Fetal y Adulto…….. 52

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES ……..…… 58

LITERATURA CITADA……..…….. 60

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Programa utilizado para la deshidratación y embebido en parafina de los tejidos ováricos y testiculares……..	30

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Construcción del plásmido pCR4-*Ashwin*……	20
2	Producto de PCR obtenido de la amplificación de *Ashwin* a partir del ADNc de testículo bovino……..	38
3	Extracción de ADN plasmídico……..	39
4	Producto de PCR obtenido de la amplificación de *Ashwin* a partir del plásmido pCR4-TOPO 4.0kb clonado con el gen *Ashwin*.	40
5	Anatomía molecular del vector CR4-TOPO 4.0kb…….	42
6	Esquema virtual del sector linearizado del plásmido pCR4/*Ashwin,* que inicia de la región de restricción con la enzima *Spe1* hasta el promotor T7……...	44
7	Esquema virtual del sector linearizado del plásmido pCR4/*Ashwin,* que inicia de la región de restricción con la enzima *Not1* hasta el promotor T3……	45
8	Análisis por microscopia de fluorescencia de ovario bovino adulto procesado por FISH…….	46
9	Ensayo de Inmunohistoquímica en tejido de ovario fetal bovino……	50
10	Ensayo de Inmunohistoquímica en tejido de ovario bovino adulto……...	52
11	Ensayo de Inmunohistoquímica en tejido de testículo fetal bovino……..	54
12	Ensayo de Inmunohistoquímica en tejido de testículo adulto bovino……..	57

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Termino
aa	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BGH	Hormona de crecimiento bovino
BP	Proteínas de unión
BSA	Albumina de Suero Bovino
CBM	Citomegalovirus
CE	Células estromales
CG	Células de la granulosa
CGP	Células germinales primordiales
CL	Células de Leydig
CS	Células de Sertoli
dNTPs	Desoxirribonucleotidos trifosfato
EG	Espermatogonia
FE	Folículo
FSH	Hormona folículo estimulante
Figla	Factor en la línea germinal alfa
FP	Folículo primordial
Fi	Folículo primario
FISH	Hibridación *in situ* fluorescente
Fs	Folículo secundario
FG	Folículo de graff
FGP	Folículo germinal primordial
g	Gravedades
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GFP	Proteína verde fluorescente
H&E	Hematoxilina y eosina

IGF	Factores de crecimiento insulínicos
IGFBP	Factores de crecimiento insulínicos proteínas de unión
kb	Kilo bases
LB	Luria-Broth
LB-AMP	Luria-Broth – ampicilina
LH	Hormona luteinizante
mg	Miligramos
Min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
NCBI	Centro nacional de información biológica
Nobox	Gen homeobox del ovario de recién nacido
OVO	Ovocito
ºC	Grados centígrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PGC	Células germinales primordiales
PG	Prostaglandina
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de polimerasa por transcriptasa reversa
seg	Segundos
SOC	Caldo óptimo con represión por catabolito
SRY	Gen especifico del cromosoma y
T	Tubo seminífero
TA	Temperatura ambiente
µg	Micro gramos
µL	Micro litros

INTRODUCCIÓN

Las células germinales primordiales (PGC´s, por sus siglas en inglés) juegan un papel central en la génesis de los organismos superiores, de ellas se originan los espermatozoides en los machos y los ovocitos en las hembras. Estas células son las responsables de la transmisión de la información genética entre generaciones permitiendo la propagación de la especie (Michael *et al.,* 2000).

El desarrollo y diferenciación de las PGC´s hacia gametos, se realiza a través de los procesos celulares conocidos como ovogénesis y espermatogénesis; estos procesos son controlados mediante mecanismos hormonales y programas moleculares estrictamente regulados, que en los últimos 15 años se empezaron a identificar sobre todo en modelos animales de ratón, humano y recientemente en especies de interés zootécnico como bovinos, cerdos y borregos.

Con el objetivo de identificar los mecanismos genéticos que intervienen en la ovogénesis y/o espermatogénesis, Lechuga-Valles (2010) desarrolló una librería de ADNc de ovario fetal bovino, la cual permitió el aislamiento y caracterización del gen Ashwin en esta especie (Soto-Orduño, 2011). Estudios enfocados al análisis de la actividad transcripcional de este gen, revelaron que si bien presenta una expresión ubicua, desarrolla una alta tasa de expresión en órganos reproductivos como es el ovario y testículo (Soto-Orduño, 2011); asimismo, experimentos de RT-PCR punto final han demostrado que durante el desarrollo embrionario temprano del bovino el comportamiento de expresión del

gen es muy similar a lo observado para la familia de los genes de expresión materna (Soto-Orduño, 2011), cuyos productos proteicos son únicamente sintetizados en el ovocito y que sirven para la supervivencia y desarrollo del embrión en sus primeras etapas de división celular, degradándose una vez que se haya realizado la activación del genoma del embrión (Lei *et al*., 2010) . Estas proteínas funcionan en el contexto del núcleo celular como proteínas remodeladoras de la cromatina, metiladoras del ADN y que mantienen dicha modificación química, proteínas que intervienen en el desarrollo y preimplantación del embrión, así como proteínas que se encargan de degradar a estos mismos factores maternos (Lei *et al*., 2010). Además, la posible actividad nuclear de la proteína Ashwin está respaldada por la presencia de una señal bipartita de localización nuclear funcional (Serna-Hernández, 2014)

Aunque los resultados anteriormente descritos demuestran la posible participación del gen *Ashwin* en las actividades del ovario y desarrollo embrionario temprano, estas no permiten identificar de manera precisa su relevancia funcional en este órgano. Con la finalidad de caracterizar la función del gen *Ashwin* en los órganos reproductivos, los objetivos de la presente investigación fueron analizar la expresión de su ARNm en tejido ovárico adulto, a partir de la hibridación *in situ* y el análisis de la expresión *in vitro;* además, se analizó la distribución celular de la proteína *Ashwin* en tejido de ovario y de testículo en bovinos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Primeras Etapas de la Formación Gonadal en Bovinos

Las células germinales primordiales (PGC´s, por sus siglas en inglés) son las precursoras de los gametos masculinos (espermatozoides) y de los gametos femeninos (ovocitos); a través de estas células los mamíferos trasmiten la información genética a cada generación, lo que permite la perpetuación de las especies (Michael *et al.,* 2000*)*. El desarrollo de la gónada que contiene a las PGC´s comienza desde el inicio de la embriogénesis y es el resultado de tres procesos secuenciales: i) La especificación de las PGC´s, ii) Su migración y proliferación y iii) La colonización de las crestas urogenitales por estas células (Vanderhyden, 2002).

Las células de la línea germinal como los ovocitos y los espermatocitos, son un grupo celular que se derivan de un número finito de las PGC´s (Soto-Suazo y Zorn, 2005). Estas se originan en las primeras etapas del desarrollo embrionario de los mamíferos, en el endodermo del saco vitelino, donde proliferan mediante una serie de divisiones mitóticas. En el caso de los bovinos se ha documentado que entre los 25 a 31 d del desarrollo embrionario pueden existir aproximadamente 1000 células, las cuales inician un proceso de migración hacia los pliegues gonadales (Wrobel y Sub, 1998) para finalmente ubicarse en la cresta genital que se encuentra en la pared posterior del abdomen, entre la raíz del mesenterio y el cuerpo de Wolf, proceso derivado de la metamorfosis en la conformación del embrión, (Chuaire y Sánchez, 2010). La cresta urogenital entra en un estrecho contacto con la matriz de la lámina basal

en los días 32 y 40, hasta el término del periodo de diferenciación gonadal al día 45 (Wrobel y Sub, 1998).

El Ovario Bovino

Foliculogénesis y ovogénesis bovina. En mamíferos es un proceso biológico regulado por factores extra e intraováricos que tienen como finalidad el desarrollo, diferenciación y maduración de los ovocitos. (Suzumori *et al.*, 2002; Barnett *et al*., 2008). Este proceso es dictaminado por un complejo programa genético, así como por la acción de las hormonas gonadotrópicas y gonadales (Henao y Trujillo, 2003; Herrera *et al*., 2005).

La foliculogénesis se caracteriza por una proliferación y diferenciación acelerada de las células somáticas que componen el folículo, el cual proporciona un ambiente óptimo para la ovogénesis que favorece la maduración del ovocito (Henao y Trujillo, 2003).

El número total de ovocitos presentes en el ovario de bovinos se ha calculado en 150,000 que se derivan de un número determinado de PGC´s (Fortune, 2002; Soto-Suazo y Zorn, 2005). La folículogénesis comienza en la embriogénesis al concluir la proliferación de las PGC´s, estas son rodeadas por una capa de células epiteliales aplanadas escamosas de la pregranulosa para formar los folículos primordiales, en este punto inician la primera división meiótica que se detiene en la etapa de diploteno en la profase I, estas células son consideradas como ovocitos inmaduros, manteniendo esta forma hasta el inicio de la pubertad (Nilsson y Skinner, 2001; Fortune, 2002; Senbon *et al.,* 2003).

En la pubertad algunos de los folículos primordiales se reactivan y pasan a ser folículos primarios en transición, las células escamosas pregranulosas que los rodean se transforman en células cuboidales granulosas que empiezan a proliferar (Faure y Morales, 2003; Peña *et al.,* 2007).

En cada oleada folicular es reclutado un grupo de folículos primordiales que posteriormente crecen. Conforme los folículos continúan su desarrollo adquieren capas sucesivas de células granulosas, aumenta el tamaño del ovocito rodeándose de las células de la teca (Vanderhyden, 2002), la primera estructura con estas características es denominada folículo secundario, que posteriormente se convierte en un folículo terciario o de Graaf debido a que adquiere un antro folicular, que de igual manera aumenta su tamaño llegando a convertirse en un folículo preovulatorio el cual finalmente contiene a un ovulo maduro. (Faddy y Gosden, 1996).

A partir de la pubertad se inicia un patrón de dos a tres oleadas de desarrollo folicular, en ese proceso están identificados tres eventos fisiológicos conocidos como el reclutamiento, la selección y la dominancia que ejerce el folículo de mayor tamaño sobre los subordinados (Espinoza *et al*., 2007). Durante este proceso existe una competencia de crecimiento folicular, seleccionándose aquellos que tienen potencialidad para desarrollar dominancia morfológica y funcional sobresaliendo de los demás (Henao y Trujillo, 2003), teniendo como resultado final solo un folículo que continúa creciendo a una tasa constante mientras los demás folículos sufren atresia (Pangas y Rajkovic. 2006; Espinoza *et al*., 2007).

Factores que Influyen en la Foliculogénesis

La folículogénesis es un proceso biológico que es regulado por factores extra e intra ováricos (Suzumori *et al*., 2002). Este proceso es dictaminado por un programa genético, así como hormonal, en el que intervienen las hormonas gonadotrópicas y gonadales (Henao y Trujillo, 2003; Herrera *et al*, 2005; Barnett *et al*., 2008).

Factores hormonales. El crecimiento del folículo ovárico es fuertemente influenciado por factores endócrinos y parácrinos del eje hipotalámico, hipofisario y gonadal. En este proceso intervienen las hormonas gonadotrópicas y gonadales, además de diversas proteínas ováricas como las activinas, inhibinas y factores de crecimiento, en conjunto todos estos elementos actúan como estimuladores o inhibidores del desarrollo folicular, sin embargo, aún no se conoce con exactitud el mecanismo que establece la dominancia folicular (Henao y Trujillo, 2000; Bergfeld *et al*., 1996).

Al iniciar la pubertad el sistema endocrino inicia con la producción de las gonadotropinas que intervienen en la regulación endocrina de la foliculogénesis, promoviendo la secreción de las demás hormonas y factores de crecimiento que intervienen en este proceso. (Faure y Morales, 2003. y Fortune *et al.,* 2004).

La hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) ejerce un efecto mitogénico indirecto sobre las células de la granulosa al incrementar la síntesis de factores de crecimiento o sus receptores (Pérez *et al*., 2002), lo que genera el crecimiento de los folículos primordiales. También el desarrollo

folicular controla el desarrollo de otros folículos a través de la producción de hormonas como estradiol, inhibina, activina y folistatina, al igual que la progesterona producida por el cuerpo lúteo actuando en forma local o sistémica. Tohei *et al*. (2000) explican que en el proceso de ovulación también interviene la expresión de receptores para la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) sobre la superficie de las células de la granulosa del folículo dominante, un incremento en la producción de estradiol por este último y la disminución de las concentraciones de la hormona FSH (Tohei *et al.*, 2000 y Espinoza *et al*., 2007).

También se ha reportado la influencia de factores de crecimiento insulínicos (IGF-1 y -2, por sus siglas en inglés), proteínas de unión (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 y -6, por sus siglas en inglés) y proteasas específicas que degradan las IGFBPs. (Espinoza *et al*., 2007).

Factores genéticos. El desarrollo folicular es un proceso dinámico, que también es regulado a través de una programación genética específica, que en los últimos 15 años se empezó a caracterizar y comprender como es que regula los procesos reproductivos como la foliculogénesis y ovogénesis en distintas especies especialmente en ratón (Herrera *et al*, 2005).

Dentro de los mecanismos genéticos estudiados se ha reportado la existencia de genes denominados como “Genes Maestros”, que principalmente codifican para factores de transcripción los cuales interaccionan con los promotores de genes que codifican para proteínas que intervienen en fases específicas del desarrollo y diferenciación de las células germinales (Donohoe

et al., 2008), como *RFLP14, Oct 4, H100, Figla, Bmp15, Mos, Zar1, Gdf9, Vasa, Mater, Zp1, Zp2, Star* y *p450*. Entre los genes reportados como maestros se encuentran el gen *NOBOX* que codifica para un factor de transcripción capaz de regular en las células madre embrionarias (CME por sus siglas en inglés), y los genes *Figla, Mos, Zar1* y *Star*, que participan en el desarrollo de la gametogénesis. (Zheng y Dean. 2009).

A la fecha se ha logrado establecer la relación de diversas vías moleculares con procesos fisiológicos celulares específicos, por ejemplo se ha reportado que la cascada de expresión de los genes *Bmp4, TNAP, Kit, Kit ligand* y *Vasa* están específicamente relacionados con el desarrollo de las CGP´s (Castrillon *et al*., 2000); mientras que la expresión de los genes *Fgf2, Gata, Lfitm3, Nanog, ckit* y *Sdf1* están involucrados en la migración de las CGP´s hacia la cresta urogenital. Además, se han identificado genes que si bien no se han establecido de manera concreta las vías moleculares en las que intervienen, su expresión específica en células que intervienen en el desarrollo reproductivo, revelan su potencial función en estos procesos (Nilsson y Skinner. 2001). Este es el caso de la expresión de los genes *Figla, Sohlh1 LHX8* y *Daz1* en ovogonias, mientras que en los folículos primordiales se ha identificado la expresión del gen *Nobox* y *Sohih1* (Orozco-Lucero, 2010), al gen *GDF9* en folículo secundario y a *Mgat* en folículo preovulatorio (Hinkins *et al.* 2005). Las proteínas codificadas por los genes *Zp1, Zp2, Zp3, Npm2* y *Zar1* fueron localizados en cigoto y los genes *Mater* y a *Nalp5* son expresados en cigotos de dos células (Donohoe *et al*., 2000 y Majid. *et al.,* 2002).

El Testículo en Bovinos

Espermatogénesis bovina. La espermatogénesis es un proceso gonadal mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos denominados como espermatozoides.

La formación de espermatozoides comienza alrededor del día 24 del desarrollo embrionario en el saco vitelino, al especificarse las PGC´s las cuales migran hacia la cresta urogenital donde se formarán los órganos genitales (Michael *et al.,* 2000). Alrededor de la cuarta semana se acumulan alrededor de 4000 PGC´s, y a partir de ese momento el orgánulo testicular comienza un proceso de maduración para proseguir con la formación espermática en la pubertad (George y Wilson. 1994). Al inicio de la pubertad se realiza en los túbulos seminíferos el mayor desarrollo espermático, donde las células en los túbulos seminíferos se disponen alrededor del lúmen, formándose las células denominadas como espermatogonias. Al alcanzar la madurez sexual las espermatogonias aumentan de tamaño y se transforman en espermatocitos de primer orden. Estas células comienzan una división meiotica, donde la primera división celular da lugar a dos espermatocitos de segundo orden y tras la meiosis II resultarán cuatro espermátidas (Sinclair *et al*., 1990).

Las células de Sertoli se encuentran también en los túbulos seminíferos y se encargan de dar sostén y nutrir a los gametos durante su proceso de diferenciación, de igual manera forman la barrera hematotesticular, necesaria para proveer un sitio de inmunoprivilegio para los gametos. Desde los espermatocitos primarios hasta los espermatozoides en el proceso de

diferenciación, esta células sintetizan proteínas antigénicas diferentes a las del resto de las células corporales, por lo que necesitan estar en un lugar fuera del alcance del sistema inmunológico (Schmidt. *et al.,* 2006).

La maduración de los espermátides en espermatozoides es un proceso denominado espermiogénesis, este se caracteriza por: a). Reducción del tamaño nuclear. b). Condensación del material genético por la sustitución de las histonas por protaminas. c). Formación de la vesícula acrosómica a partir del Aparato de Golgi. d). Crecimiento del flagelo a partir de la región centriolar. e). Las mitocondrias se acomodan en la parte proximal del flagelo. f). El citoplasma se reduce y se separa formando el cuerpo residual (Schmidt. *et al.,* 2006).

En bovinos el tiempo total de duración del proceso de espermatogénesis y espermiogénesis es de 64 d. La maduración bioquímica se realiza en el epidídimo y posteriormente los espermatozoides entran en contacto con el líquido seminal y el prostático (Michael *et al.,* 2000).

El porcentaje de espermatozoides anómalos maduros es del 10 % y si se eleva por encima del 20 % es probable que exista repercusión en la fertilidad del individuo (Sinclair *et al*., 1990).

Factores que Influyen en la Espermatogénesis

Factores hormonales. La regulación hormonal empieza con la segregación por parte del hipotálamo de factores que funcionan como mensajeros químicos, que actúan en las células de la hipófisis, promoviendo en ellas la síntesis y segregación de nuevos mensajeros, estos últimos reconocidos por las células testiculares (Michael *et al.,* 2000).

La producción de la hormona liberadora de gonadotrofinas por el hipotálamo promueve la secreción de la LH por la hipófisis, que estimula a las células de Leydig en el testículo, induciendo la síntesis de testosterona en estas células. La testosterona es una hormona esteroide que juega un papel clave en el desarrollo corporal del macho, como la promoción de los caracteres sexuales secundarios como el incremento de la masa muscular y ósea, al igual que el desarrollo óptimo del aparato reproductor del macho especialmente de testículos y próstata, por lo que también es indispensable en el desarrollo normal del espermatozoide, activando genes que promueven la diferenciación de la espermatogonia. (Herrera *et al.*, 2005).

En la nutrición y desarrollo de los espermatozoides interviene la FSH, hormona gonadotropica producida en la hipófisis, que actúa sobre las células de Sértoli en el testículo, cuando estas células reciben este estímulo convierten parte de la testosterona en estrógenos (Michael *et al.,* 2000).

En el ciclo hormonal del macho también interviene la hormona inhibina, producida por las células de Sertoli, esta actúa como regulador negativo de la secreción de FSH en la hipófisis (Herrera *et al.*, 2005).

Factores genéticos. La espermatogénesis en bovinos es un complejo proceso de diferenciación celular estrictamente regulado que presenta muchos desafíos únicos**.** Entre ellos se encuentran los mecanismos genéticos especializados que realizan un control minucioso de la expresión génica y la transición de las células madre a PGC´s y de espermatogonias a espermatozoides terminales. Uno de los genes más importantes es el gen *SRY*,

presente en el cromosoma Y que permite la determinación sexual en los mamíferos (Herrera *et al.*, 2005 y Schmidt. *et al.,* 2006)

El gen *SRY* es uno de los principales genes responsables que determina el inicio de la formación de los testículos, a partir de aproximadamente 4000 PGC´s en el estadio del embrión aproximadamente a la 4 semana de gestación. *SRY* se transcribe solo en el desarrollo embrionario y exclusivamente en células que van a formar los testículos, su expresión desencadena la expresión de muchos otros genes que también intervienen en el proceso, SRY está activo durante un período muy breve en las células somáticas de la cresta urogenital, hasta iniciar la diferenciación de las células de Sertoli (Saunders *et al*., 202). La proteína SRY actúa en el marco de otros productos proteicos necesarios para el desarrollo gonadal y su producto proteico debe actuar en uno o más genes diana que aseguren la mayor diferenciación y mantenimiento de las células de Sertoli, al igual que proteínas inhibidoras del desarrollo del aparato reproductivo de la hembra (Gubbay *et al*., 1990). En los últimos años se han descubierto diversos genes que tienen un papel importante en el desarrollo gonadal y la determinación del sexo. Estos incluyen genes de transcripción que codifican factores como *Lhx9, Wt1, Sf1, Dax1, Gata4, Dmrt1* y *Sox9,* y así como otros implicados en la señalización celular, incluyendo *Amh, Wnt4* y *Dhh.* Sin embargo, aún no se conoce la totalidad de los factores que intervienen en dichos procesos (Graves., 2002 y Shima. et al., 2004)

El gen *Sox9* interviene directamente para la iniciación y mantenimiento de las células de Sertoli consistente con *SRY*. El gen *SF1* permite la activación

de la transcripción de varios genes relevantes, no sólo los necesarios para el desarrollo masculino, incluyendo Sox9 y AMH, sino también en aquellos que pueden tener una dirección antagónica sobre las células de Sertoli como *Dax1* (Michael *et al.,* 2000).

El Gen *Ashwin*, un nuevo gen implicado en la reproducción en bovinos.

El gen *Ashwin* que codifica para una proteína de 226 aminoácidos (aa), fue inicialmente identificado en experimentos de "rastreo de genes" que son expresados en las primeras etapas de especificación neural en *Xenopus leavis*. Los estudios funcionales iníciales indicaron que *Ashwin* puede participar en la especificación ectodérmica, además de la formación de patrón axial y anteroposterior neural (Sonali *et al.,* 2006). El análisis de la secuencia de aa de la proteína *Ashwin* de *X. leavis*, ratón y humano revela la presencia de un dominio N-terminal 67% idéntico y un dominio C-terminal con una identidad del 70% (Sonali *et al.,* 2006).

La expresión de *Ashwin* en ratón se ha detectado en cerebro, pituitaria, retina, riñón, sangre, hígado, pulmón, timo, células germinales, páncreas y la placenta, mientras que en tejidos embrionarios además de expresarse en los tejidos anteriormente mencionados también es expresado en los ojos, la médula espinal, los arcos branquiales, vejiga urinaria, y la glándula mamaria. En *X. leavis* adultos, la expresión de *Ashwin* se ha identificado en los ojos, corazón, hígado, bazo, pulmón y ovario (Sonali *et al.,* 2006).

En bovinos el análisis de la expresión tejido específica del gen *Ashwin* por RT-PCR a partir de distintos órganos fetales entre ellos ovario y testículo,

demostró la expresión ubicua de un transcrito de 699 pb correspondiente a este gen. De manera interesante, el análisis de expresión del transcrito en tejidos de bovinos adultos, reveló la expresión de cuatro potenciales formas alternativas, dos isoformas de 345 y 543 pb que son expresadas en corazón, hígado y riñón; mientras que en pulmón, músculo, cerebro, ovario y testículo son expresadas dos isoformas de 615 y 478 pb (Soto-Orduño, 2011).

Sin embargo, los datos más relevantes se observaron cuando se analizó la expresión de *Ashwin* en el desarrollo embrionario temprano bovino, observándose que el gen fue expresado en el ovocito maduro, así como en el embrión de 2-4 células, para posteriormente suprimir su expresión en los estadios posteriores (Soto-Orduño, 2011). Este patrón de expresión fue muy similar al observado en una particular familia de genes denominados como ¨genes de expresión materna¨ (Lei *et al*., 2010). Los ARNs y proteínas codificadas por estos genes son expresadas, sintetizadas y almacenadas en el ovocito, el cual una vez que es fertilizado, son utilizadas para la realización de los procesos moleculares y celulares que son necesarios para la supervivencia y desarrollo del embrión en sus primeras etapas de división celular, degradándose una vez que se haya realizado la activación del genoma del embrión. A estos ARNs y proteínas se les conoce como componentes o factores maternos del ovocito (Zheng y Dean, 2009).

Diversos trabajos han demostrado que los productos proteicos que estos genes codifican, funcionan como factores de transcripción (como los genes *Hsf1, Bnc1, Ctcf, Oct4* y *Sox2*), para proteínas remodeladoras de la cromatina

(como los genes *Hr6a, Npm2, Brg1, Brwd1*), proteínas que metilan el ADN y que mantienen dicha modificación química (como los genes *Dnmt3a* y *Dnmt3l*, *Dnmt1, Stella* y *Zfp57*), proteínas que intervienen en el desarrollo y preimplantación del embrión (como los genes *Zar1, Mater, Floped, Padi6, Tle6, Filia, Tcl1* y *Uchl1*) o para proteínas que se encargan de degradar a estos mismos factores maternos, como las proteínas codificadas por los genes *Dicer1, Ago2, Zfp36l2, Atg5* (Lei *et al*., 2010). En conjunto los productos proteicos de estos genes participan en la activación del genoma embrionario, evento que es esencial para el desarrollo del embrión más allá de dos células (Giraldez *et al*., 2006).

Ya que las actividades funcionales de los genes maternos son realizadas en el núcleo celular, el análisis *in silico* dirigido a dilucidar la distribución subcelular de la proteína Ashwin bovina*,* revelo que su actividad funcional está relacionada este organelo, ya que el análisis de la secuencia de aa (aminoácidos) de la proteína *Ashwin,* permitió identificar dos señales de localización nuclear (NLS, nuclear sequence signal, por sus siglas en inglés) localizados en la región amino terminal en posición de aa 88-100 y 197–232 de la proteína, lo que reveló que esta proteína potencialmente puede ser transportada al núcleo mediante los mecanismos de transporte nuclear en el que intervienen las proteínas exportinas. La evaluación experimental de estas señales a través de la expresión ectópica de una proteína quimérica GFP-*Ashwin* (proteína verde fluorescente por sus siglas en inglés, unida al gen *Ashwin*)*,* en células *Hela*, demostró que su expresión subcelular se circunscribe

específicamente al núcleo celular (Morales-Adame, 2012). Mediante ensayos de mutagénesis dirigida del gen *Ashwin* se identificó la señal de localización nuclear que regula el transporte de la proteína al núcleo celular, la cual tiene una naturaleza bipartita y está ubicada en el extremo carboxilo terminal entre el residuo 197 y 232 (Serna-Hernández, 2014).

Ya que los datos anteriores demuestran que la proteína *Ashwin* es nuclear y que su expresión durante el desarrollo embrionario temprano es maternal y que por lo tanto las funciones de esta proteína pueden ser similares a las reportadas para la familia de proteínas de efecto materno, aún es necesario generar más información respecto a sus funciones que tiene el producto proteico que codifica este gen en el contexto *in vivo* del tejido ovárico y testicular (Sinclair *et al*., 1990). El presente trabajo tiene como objetivo estudiar *in situ* la expresión del ARNm y de la proteína *Ashwin* presente en las células de ovario y testículo fetales y adultos, lo anterior a través de las técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica, de esta manera se podrá generar información específica referente al contexto de expresión tisular de esta proteína, que nos permita empezar a generar conocimiento que nos conduzca a identificar la función de *Ashwin in vivo* en tejidos destinados a la formación de gametos como lo son los ovarios y testículos bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de ADNc previamente sintetizado, y de ARN total de testículo de bovino adulto, se prepararon reacciones de PCR con los siguientes componentes: 2.5 U TaqPol, Amortiguador 1X, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTPs, 100 ng del oligonucleótido *Ashwin* sentido 5´-ATG GCG GGG GAT GTG GGC GG -3´ y 100ng del oligonucleótido *Ashwin* antisentido 5´-TCA CGG CCA TGT CAC ATG CT-3´ y H_2O hasta ajustar un volumen de 25 µL. La reacción de amplificación fue realizada con los siguientes parámetros de amplificación: 95 ºC por 5 min de inicio, 35 ciclos de 95 ºC por 1 min de desnaturalización, 62 ºC por 1 min de alineamiento, 72 ºC por 1 min de extensión y finalmente 72 ºC por 5 min de extensión final. El producto de amplificación esperado fue de 583 pb.

Clonación del ADNc de *Ashwin* en el Vector pCR4-TOPO 4.0kb

Se realizó la inserción directa del ADNc de *Ashwin* amplificado por PCR en el plásmido pCR4-TOPO4.0kb**.** (Invitrogen™) el cual contiene los promotores T3 Y T7 que permiten la transcripción de ARN en sentido y antisentido, lo anterior con la finalidad de generar una molécula de ARN antisentido que sea complementaria al ARNm que codifica a la proteína *Ashwin,* lo que permitirá la formación de cadenas dúplex de ARN, de tal manera que la existencia de hibridación será un indicativo de expresión positiva de este gen. Por otro lado, la síntesis de un ARN sentido que no es complementario al ARNm de *Ashwin*, fue utilizado como ensayo control del experimento.

La clonación se realizó en un solo paso con 1 µL de vector TOPO, 1 µL

de solución salina, 500 ng del producto de la reacción de PCR del gen *Ashwin*, amplificado a partir del ADNc de testículo de bovino adulto y 2 µL de agua libre de ADNasas para alcanzar un volumen final de 8 µL. Esta mezcla se reposó por 30 min a 23 ºC. La reacción de ligación fue utilizada para transformar bacterias TOP10. El nuevo vector obtenido (producto de la ligación) fue denominado como pCR4-*Ashwin* (Figura 1).

Transformación de Bacterias TOP10

Para obtener clonas bacterianas que contuvieran el plásmido pCR4-*Ashwin*, se utilizaron bacterias químicamente competentes TOP10 (Invitrogen) presentes en un volumen de 50 µL. De este volumen, 10 µL fueron colocados en un microtubo, y fueron utilizados como control de viabilidad. A los restantes 40 µL se les añadieron 2 µL de la reacción de ligación. Las bacterias se colocaron 15 min en hielo y posteriormente se les sometió a un choque térmico a 42 ºC por 30 seg, una vez más fueron colocadas en hielo, posteriormente se les añadió 100 y 250 µL de medio SOC (Invitrogen) y las bacterias transformadas fueron incubadas por 1 h a 200 revoluciones por minuto (rpm) a 37 ºC.

La solución de bacterias fue plaqueada en cajas de petri con medio LB sólido con una concentración de 50 µg/mL de ampicilina. Para evaluar la viabilidad y susceptibilidad de las bacterias, simultáneamente se colocaron 50 µL de la cepa TOP10 transformada en ausencia del producto de ligación pCR4-*Ashwin*, en una caja con 50 µg/mL de ampicilina y una cantidad igual sin ampicilina.

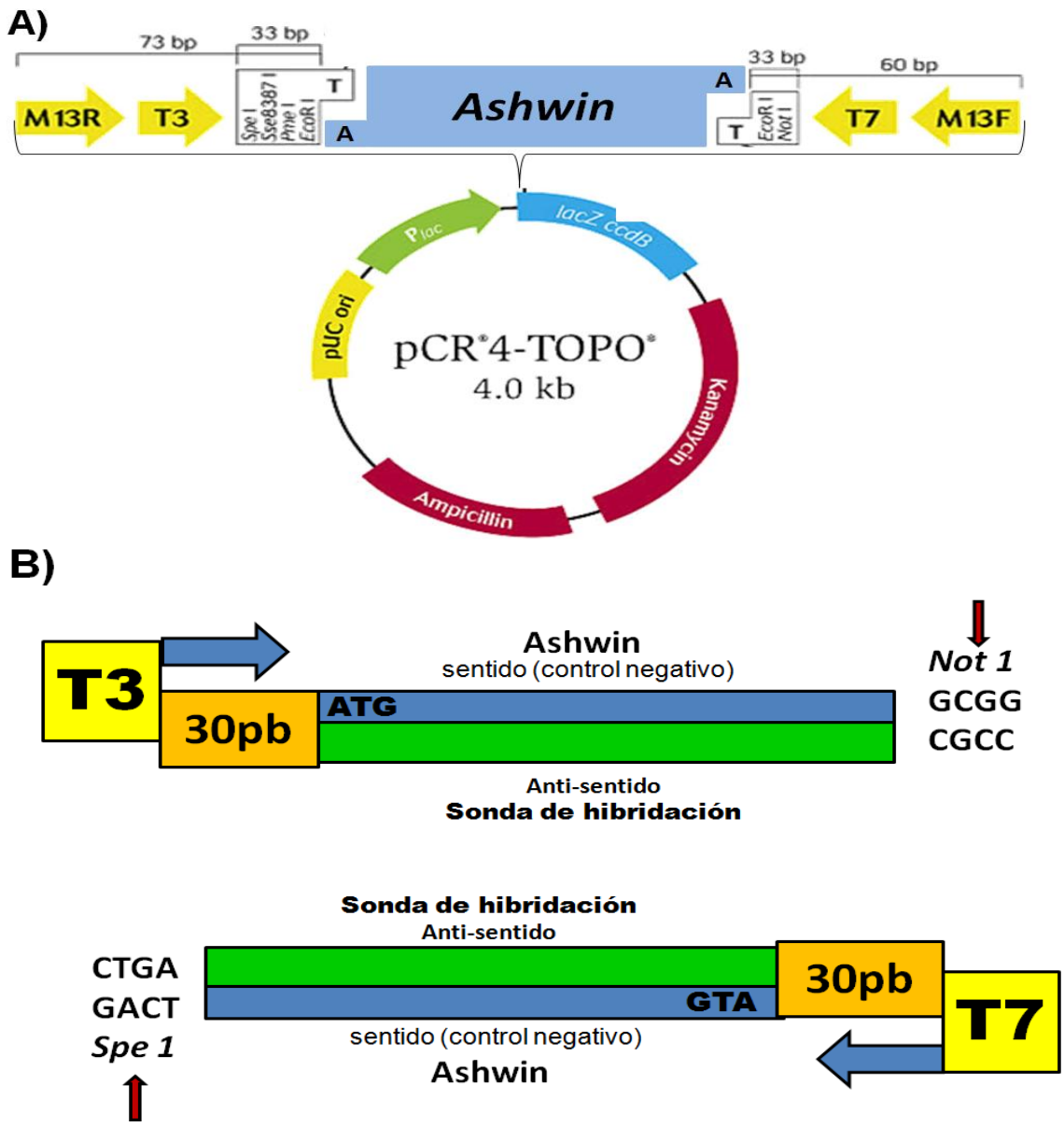

Figura 1. Construcción del plásmido pCR4-*Ashwin.*

A) Esquema virtual de la construcción del plásmido pCR4-*Ashwin* a partir del plásmido pCR`4-TOPO4.0kb. Donde se observa de color azul el sitio de inserción del gen Ashwin. Se muestran de color amarillo los promotores T3 y T7, señalando con flechas rojas las regiones de restricción enzimática y observando a sus respectivos costados los sitios para los oligonucleótidos M13F y M13R.

B) Posiciones sentido y antisentido de la posible inserción de Ashwin, logrando una adecuada transcripción de ARN con la linearización enzimática.

Con respecto a las bacterias que si fueron transformadas con el plásmido pCR4-*Ashwin*, estas se plaquearon con tres concentraciones de dicha cepa, utilizando 50, 100, 150 µL del medio bacteriano de la cepa transformada. Las cajas de cultivo fueron incubadas a 37 ºC durante 12 h.

Extracción de DNA Plasmidico Mediante el Método de Lisis Alcalina

En un tubo de ensayo previamente estéril se colocaron 3 mL de medio LB líquido con 100 µg/mL de ampicilina. El tubo fue inoculado con una colonia de bacterias TOP10 transformadas con el producto de ligación pCR-*Ashwin*, el tubo se mantuvo en una incubadora de agitación a 37 ºC a una velocidad de 200 rpm por 14-16 h. Posteriormente el cultivo bacteriano fue transferido a un tubo de 1.5 mL que se centrifugó a 12000 rpm durante 30 seg, se aspiró el sobrenadante y la pastilla blanquecina se resuspendió mediante agitación en 100 µL de solución 1 (Glucosa 50 mM, Tris-HCL 25 mM, pH 8.0 y EDTA 10 mM, pH 8.0), homogenizando suavemente por 10 seg y reposando por 5 min a una temperatura de 4 ºC. Se añadieron 200 µL de solución 2 (NaOH 0.2 N, SDS al 1 %), se homogenizó por medio de inversión y se añadieron 150 µL de solución 3 (40.8 gr de $CH_3C00Na.3H_20$, 40-50 mL de agua, ajustándose el pH a 5.2 con ácido acético 3 M). Una vez alcanzado el pH requerido, se aforó a 100 mL con agua desionizada). Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a temperatura ambiente (TA), para posteriormente el volumen ser transferido a un tubo nuevo donde se le agregaron 450 µL de fenol-cloroformo (25 mL de fenol equilibrado con 24 mL de cloroformo) y se homogenizó con un vórtex. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm durante 2 min a TA. De esta manera se

generaron dos fases, la inferior como fase fenólica y la superior llamada fase orgánica, esta última fase se colectó y colocó en un tubo nuevo de 1.5 mL para posteriormente mezclarse con 900 µL de etanol con el propósito de lavar el ADN. La mezcla se reposo 30 min a TA, para después centrifugarse a 12000 rpm durante 25 min a una temperatura de 4ºC. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol al 70% frío. Al secarse el etanol se disolvió la pastilla en 50 µL de agua libre de ADNasas y se añadieron 2 µL de ARNasa para eliminar residuos de ARN. El plásmido purificado fue almacenado a -20ºC.

Ultrapurificación de Plásmidos

Para este proceso se utilizó el sistema de ultra purificación “purelink” (Invitrogen), utilizando el protocolo suministrado por el proveedor el cual fue de la siguiente manera: Se incubaron bacterias TOP10 transformadas con el vector pCR4-*Ashwin* en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, por un tiempo de 12 a 16 horas a 200 rpm/37 ºC. Concluido el tiempo se trasfirió el cultivo a 100 mL de medio LB líquido con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL, por un tiempo de 12 h a 200 rpm/37 ºC.

El cultivo se dividió en 2 tubos de 50 mL que se centrifugaron a 3220 g/15 min/TA, se desecho el sobrenadante para posteriormente añadir 4 mL de amortiguador de resuspensión (R3) mezclando el precipitado por pipeteo, la mezcla se transfirió a un tubo de polietileno y se añadió 4 mL de medio de lisis (L7) mezclando por inversión, posteriormente se reposó 5 min/TA. Se añadió 4 mL de amortiguador de precipitado (N3) y se mezcló por inversión para luego centrifugar a 12,000 rpm/10 min/4 ºC. Se transfirió el sobrenadante a una

columna previamente equilibrada con 10 mL de medio de equilibrio EQ1, la columna se lavó 2 veces con 10 mL de medio de lavado (Wp) y posteriormente se colocó un tubo falcón de 15 mL debajo de la columna, a la columna se le añadió 5 mL de medio amortiguador de elución (E4) y se le añadió 4 mL de etanol a 4 ºC. Se transfirió el resultante a 6 microtubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 15000 g/30 min/4 ºC. Pasado el tiempo se descarto el sobrenadante y el precipitado resultante se lavó con 500 µL de etanol al 70 % a 4 ºC y se centrifugó a 15000 g/5 min/4 ºC.

Finalmente, las pastillas de cada uno de los 6 microtubos de 1.5 mL se resuspendieron en 10 µL de TE amortiguador y se traslado todo a un solo microtubo obteniendo un volumen total de 60 µL que fue almacenado a -20ºC.

Secuenciación

El plásmido pCR4-*Ashwin* fue purificado y enviado a la Unidad de Secuenciación Automática del Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos, que cuenta con el equipo de secuenciación automática ABIprism 3600. La secuenciación se realizó con el producto de PCR, resultado de la amplificación con los oligonucleótidos M13-F 5´-GTAAAACGACGGCCAG-3´ y M13 R 5´- CAGGAAACAGCTATGAC -3´.

Síntesis de la Sonda de ARN Marcada.

Linearización de plásmidos por restricción enzimática. El plásmido pCR4-TOPO de 4.0 kb, cuenta con sectores específicos de restricción enzimática que se encuentran flanqueando el sitio de inserción para el fragmento de ADNc tal como se muestra en la figura 1 A.

Con el propósito de seleccionar la ARN polimerasa y a la vez delimitar la transcripción. Se utilizaron las enzimas *Not1* y *Spe1* que identifican los sitios 5' - GC↓GGCC GC - 3' complementario a 3' - CG CCGG↑CG - 5' y el sitio 5´ - A↓CTAG T - 3´ complementario a 3´ - T GATC↑A - 5´. (Figura 1-B).

Se prepararon reacciones de restricción para *Not1 y Spe1* con los siguientes protocolos de restricción enzimática:

Para restringir con la enzima *Not1* se preparó una reacción de restricción mezclando 2 µL de solución H 10X, 2 µL de BSA 0,1 %, 1 µL Tritón 0.1%, agregando una unidad de enzima *Not1* por µg de plásmido y agua libre de nucleasas hasta ajustar un volumen de 20 µL, posteriormente se incubó a 37 ºC por 12 horas, al pasar dicho tiempo se inactivo la enzima colocando la reacción de restricción 20 min a 65 ºC.

Para la reacción con la enzima *Spe1*, se mezclaron 2 µL de solución M 10 X, agregando una unidad de enzima *Spe1* por µg de plásmido y agua libre de nucleasas hasta ajustar un volumen de 20 µL, posteriormente se incubó a 37 ºC por 12 horas y se neutralizó la enzima incubando 20 min a 80 ºC.

Purificado del plásmido linearizado. Con el propósito de purificar el plásmido linearizado y descartar impurezas que se generaran en el proceso de digestión enzimática, se utilizó el kit PureLink® PCR Purification Kit**,** el cual es un proceso químico que permite purificar productos de 5 µg de ADN de 70 pb a 4 Kb por reacción.

Se adicionaron 300 µL de medio ERC a la reacción enzimática (volumen de muestra de 20 µL) y se mezcló, posteriormente se pasó todo el volumen a

una columna MinElute colocada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó 1 min/13000 rpm a TA. Se decantó el sobrenadante y posteriormente se adicionaron 750 µL a la columna de medio PE y se centrifugó 1 min/13000 rpm/TA y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se centrifugo nuevamente con las mismas condiciones descartando los posibles residuos de medio PE.

Se colocó la columna en un microtubo de 1.5 mL utilizándolo como tubo de recolección para eluir el ADN adicionando 10 µL de agua inyectable en el centro de la membrana MinElute. Se Incubó por 1 min a TA y centrifugó por 1 min 13000 rpm/TA. Para finalmente obtener el plásmido linearizado.

Transcripción *In vitro.* Se colocó un microtubo de 1.5 mL en hielo en donde se depositaron 4 µL de amortiguador 5X de transcripción (T3/T7), 2 µL de DTT, 2 µL de 10X RNA nucleotide mix, 1 µg de DNA línealizado, 1 µL de ARNasa (RNaseOUT™ inhibitor), 1 µL de RNA polimerasa modificadora de aminas T3 o T7 y 9 µL de agua libre de nucleasas para tener un volumen final de 20 µL.

Se mezcló suavemente pipeteando lentamente tres veces, posteriormente la reacción se incubo a 37 °C durante 1 h y después se añadió 1 µL de DNasa I, se mezcló suavemente con la pipeta tres veces para nuevamente incubarse a 37 °C durante 15 min. Posteriormente se añadieron 79 µL de agua libre de nucleasas a la muestra y se agito a velocidad máxima durante 10 seg para inactivar la DNasa I. Inmediatamente se procedió a purificar el ARN con aminas modificadas.

Purificación de ARN con aminas modificadas. Para purificar se añadieron 400 µL de amortiguador de unión con isopropanol a la reacción de síntesis y se agregó todo el volumen (500 µL) a una columna de limpieza, la cual fue colocada dentro de un tubo de colecta, se centrifugó la columna a 10.000 g durante 1 min. El ARN se unió a la columna y la solución depositada en el tubo de colecta fue desechada, posteriormente se lavó la columna con 650 µL de amortiguador de lavado con etanol y se centrifugó a 10.000 g durante 1 min. Para desechar el flujo. Se centrifugó la columna 10.000 g durante 1 min para eliminar cualquier solución de lavado residual. Se colocó la columna de centrifugación en un tubo de colecta limpio y se le añadieron 55 µL de amortiguador de elución al centro de la columna, posteriormente se reposó la columna a TA durante 1 min. Al concluir el reposo se centrifugó la columna a 10.000 g durante 1 min.

El ARN fue precipitado añadiendo 300 µL de etanol al 100%, y la mezcla se enfrió a -20 ˚C durante 30 min, pasado el tiempo se centrifugó a 10.000 ×g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla. Se lavó dos veces el sedimento con 400 µL de etanol al 70% y se eliminó el sobrenadante repitiendo el lavado 2 veces. Con una pipeta se eliminó la mayor cantidad de etanol 70 % residual, sin perturbar el precipitado y se dejó que la muestra se secara al aire. Posterior al secado de la muestra se añadieron 5 µL de agua libre de nucleasas y se incubó la muestra a 37 °C durante 5 min, posteriormente se resuspendió la muestra de ARN con agitación y se colocó en hielo.

Se ajustó la concentración de la muestra con agua a una concentración final de 0.2 mg/µL y se procedió a etiquetar el ARN con amina modificada con tinte fluorescente.

Etiquetado del ARN con amina modificada con el Fluorocromo Alexa 488. Se depositaron 5 µL de ARN marcado en un tubo eppedorf de 1.5, que equivale en concentración a 1 mg del etiquetado, esté RNA se desnaturalizó, encubándolo a 65°C durante 5 min.

Pasado el tiempo se colocó la muestra en hielo durante 3 min y se centrifugó la muestra a 10.000 g durante 3 min. Posteriormente se añadieron 3 µL de solución de bicarbonato de sodio al tubo con la muestra. Simultáneamente se tomó un frasco del compuesto Alexa flúor 488 que se resuspendió con 2 µL de DMSO, posteriormente se mezcló por vórtex y se centrifugó brevemente.

Se transfirió el volumen del fluorocromo al tubo de 1.5 mL en donde se encontraba la muestra de ARN y se mezcló por vórtex durante 15 seg. Y se centrifugó brevemente con el fin de colocar en la parte inferior del tubo la mezcla denominada reacción de marcaje. Y posteriormente se incubó la reacción de marcaje a TA en la oscuridad durante 1 h. Pasada la incubación se añadieron 90 µL de agua a la muestra para proseguir inmediatamente a la purificación del ARN marcado con el compuesto fluorescente.

Purificación del ARN marcado con el Fluorocromo Alexa 488. Para la purificación del ARN marcado se añadieron 400 µL de amortiguador de unión con isopropanol, se transfirieron los 500 µL de toda la mezcla a una columna

colocada dentro de un tubo de colecta, se centrifugó la columna a 10.000 g durante 1 min.

El ARN marcado se unió a la columna y se desechó lo recolectado en el tubo de colecta. Posteriormente se lavó la columna con 650 µL de amortiguador de lavado con etanol y se centrifugó la columna a 10.000 g durante 1 min para posteriormente desechar lo recolectado en el tubo de colecta. Se centrifugó la columna 10.000 g durante 1 min para eliminar cualquier solución de lavado residual, se colocó la columna de centrifugación en un nuevo tubo de colecta de 1.7 mL y se colocaron 55 µL de amortiguador de elución al centro de la columna. Posteriormente se reposó la columna a TA durante 1 min y al terminar el tiempo se centrifugó 10.000 g durante 1 min. Para tener como resultado en el tubo la colección del purificado de ARN marcado/fluorescente.

Precipitación con etanol del ARN marcado. Se inició colocando 300 µL de etanol al 100 % y se incubó la muestra a -20 ˚C durante 30 min. Se centrifugó la muestra a 10.000 g durante 10 min y se eliminó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla. Se enjuagó dos veces el sedimento con 400 µL de etanol al 70 % y se eliminó el sobrenadante. Con una pipeta se eliminó la mayor cantidad de etanol residual al 70 % sin perturbar el precipitado y se dejó que la muestra se secara al aire, se añadieron 10 µL de agua libre de nucleasas y se incubó la muestra a 37˚C durante 5 min. Se agito la muestra por vórtex para resuspender completamente el ARN marcado con Alexa fluor 488 y posteriormente se almacenó en hielo hasta que se determinó la concentración de la muestra con el espectrofotómetro Nanodrop 2000.

El ARN marcado con Alexa fluor 488 listo para la hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés) se almacenó en oscuridad en un ultracongelador (ThermoFisher) a ≤ -80˚C, durante un máximo de 2 semanas, para su posterior uso.

Procesamiento Histológico del Tejido de Ovario y Testículo.

Fijación de tejidos. Se utilizaron muestras de ovario y testículo de bovino en las etapas embrionaria y adulta, muestras que fueron adquiridas en el rastro TIF de Chihuahua localizado en el Boulevard Vicente Lombardo Toledano 13401 en la ciudad de Chihuahua, Chihuahua.

Los tejidos con un tamaño no mayor a los 2 cm^2 se sometieron a un proceso de fijación con formol al 10 % diluido con PBS 1 X pH 7.4, en un volumen al menos 10 veces mayor al del tejido y se almacenaron durante más de 24 h / TA.

Deshidratación y embebido en parafina. Los tejidos fijados fueron diseccionados y sumergidos en etanol al 70 %, donde el tejido comenzó un proceso de deshidratación, que se realizó con baños de etanol aumentando la concentración de dicho alcohol hasta llegar a una concentración del 100 % o alcohol absoluto, posteriormente fueron bañados en xileno para después ser embebidos en parafina utilizando el procesador de tejidos STP-120 (Microm), utilizando el programa descrito en el cuadro 1.

Formación de bloques de parafina. Se formaron bloques con parafina en el equipo EC-350 (Microm), utilizando los casetes TISSUE-Tex (Sakura) colocando un tejido por bloque.

Cuadro 1. Programa utilizado para la deshidratación y embebido en parafina de los tejidos ováricos y testiculares

Vaso No.	Reactivo	Horas: Minutos	RPM
1	Alcohol etílico 70%	1:30	70
2	Alcohol etílico 80%	1:30	70
3	Alcohol etílico 96%	1:30	70
4	Alcohol etílico absoluto	1:00	70
5	Alcohol etílico absoluto	1:00	70
6	Alcohol etílico absoluto	1:00	70
7	Xileno	1:30	70
8	Xileno	1:30	60
9	Parafina	2:00	60
10	Parafina	2:00	60

Cortes histológicos. Se realizaron 7 cortes histológicos consecutivos por muestra de tejido con un grosor de 3.0 µm utilizando un micrótomo con retracción HM325 (Microm).

Los tejidos se colocaron en portaobjetos tratados con trietoxietil silanol (Sigma Aldrich) y/o cargadas positivamente (X-tra Adhesive precleaned microsides, Leica) para favorecer la adherencia del tejido. El corte consecutivo por muestra de tejido permitió un patrón celular muy similar en dichos tejidos.

Evaluación Histológica

Tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Con el propósito de conocer la calidad y funcionalidad de la estructura celular de los tejidos, se seleccionó al azar uno de los cortes histológicos por muestra de tejido y se tiñeron con la técnica de H&E, lo anterior con el objetivo de identificar los tejidos candidatos al proceso de hibridación *in situ* fluorescente (FISH por sus siglas en inglés) e inmunohistoquímica.

Para el proceso de H&E las laminillas se colocaron a 60 ºC en un horno de desparafinización por 30 min y se tiñeron de acuerdo a la siguiente serie de pasos: 3 baños de 5 min en xileno, 2 enjuagues en alcohol etílico al 96 %, 1 enjuague con agua destilada, 1 baño de 5 min en hematoxilina, 1 enjuague en agua amoniacada, 1 enjuague en agua destilada, 2 enjuagues en alcohol etílico 96 %, 1 enjuague en alcohol etílico absoluto y 2 enjuagues en xileno. Finalmente se colocó en resina (Entellan, Marck) y un cubreobjetos.

Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH)

Pre-hibridación. Partiendo de un tejido histológico de ovario y testículo

en las fases embrionaria y adulta colocados en un portaobjetos, se prosiguió al baño de dichos tejidos en etanol al 100 % durante 5 min con agitación suave, al pasar dicho tiempo se elimino la mayor parte del etanol y se incubó el tejido en xileno durante 1 h, lo que permitió la desparafinización del tejido sin aplicar calor, posteriormente se enjuago el tejido con etanol al 100 % y se incubo durante 5 min con agitación suave en 2 ocasiones. Se Incubo el tejido en metanol al 100 % durante 5 min con agitación suave, posteriormente se incubó el tejido en 50 % de metanol, 5 % de formaldehído/PBT (PBT = PBS/0.1 % Tween 20) durante 5 min con suave agitación, y se lavó el tejido con 5 % de formaldehído/PBT. Se Incubó en 5 % de formaldehído/PBT durante 25 min con agitación suave y se lavó en PBT cuatro veces durante 5 min cada uno con suave balanceo. Se incubó el tejido en PBT/ 50 µg de proteinasa K durante 5 min con agitación suave.

Se enjuagó el tejido dos veces en PBT y se lavó el tejido en PBT durante 5 min con agitación suave. Posteriormente se colocó el tejido en 5 % formaldehido/PBT durante 25 min con agitación suave, para posteriormente a lavar el tejido en PBT cuatro veces durante 5 min con suave balanceo.

El tejido se incubó en 50 % de amortiguador de hibridación (50 % de formamida, 5 X SSC, 100 ug /mL de ADN de testículos fragmentado de salmón, 50 ug /mL de heparina, 0,1 % de Tween 20.) y 50 % de PBT durante 10 min con agitación suave. Posteriormente se lavó el tejido en amortiguador de hibridación durante 5 min a 55 °C con agitación suave, se lavó con amortiguador de hibridación fresco y se incubó durante 30 min a 55 °C con

suave balanceo. El tejido se puede almacenar a -20 °C en amortiguador de hibridación durante 2 semanas.

Hibridación. Se preparó la sonda en amortiguador de hibridación a una concentración final de 1 µg/mL. Se desnaturalizó la sonda por incubación a 80 °C durante 2 min y luego se colocó en hielo, posteriormente se colocó el tejido en amortiguador de hibridación a 55 °C durante 5 min, transcurrido este tiempo se eliminó el amortiguador de hibridación del tejido y se reemplazó con sonda de hibridación.

Se incubó el tejido en amortiguador de sonda de hibridación a 55 °C en un baño de agua durante 18 horas.

Pos-hibridación. Se retiró la sonda de hibridación y se reemplazó con amortiguador de hibridación fresco sin sonda. El amortiguador de sonda de hibridación se puede usar más de una vez utilizándolo a -20 °C. Se incubó el tejido en amortiguador de hibridación a 55 °C en un baño maría durante 5 min con suave balanceo. Posteriormente se cambió el amortiguador de hibridación y se incubó el tejido en amortiguador de hibridación a 55 °C en un baño maría durante 30 min con agitación suave y se repitió el lavado 2 veces. Se colocó el tejido en 50 % de amortiguador de hibridación y 50 % de amortiguador PBT a TA durante 10 min con suave balanceo y se enjuagó en PBT. Posteriormente se lavó el tejido en PBT durante 5 min, se retiro el PBT y se incubo el tejido con 1000 ug/ mL de Hoechst 33342, posteriormente se lavó el tejido con PBT con balanceo suave. Por último, se incubó con 70 % de PBT/ 30 % glicerol, durante 10 min con agitación. En esta etapa el tejido se puede almacenar a -20 ˚C.

Antes del análisis de fluorescencia, el tejido se preparó dejándose reposar a TA y se retiró toda la glicerina/PBT del tejido. Se colocaron dos gotas (80-100 µL) del reactivo Oro Antifade SlowFade ® bañando el tejido y posteriormente se retiró lo más posible. Se colocó un porta objetos y se selló con resina para proseguir con el análisis de microscopía de fluorescencia.

Inmunohistoquímica en Tejidos

Desparafinazación. Las laminillas se colocaron a 60 ºC en un horno de desparafinización por 10 min y se procesaron de acuerdo al siguiente protocolo: 2 baños de 5 min en xileno, posteriormente se realizaron baños consecutivos de 3 min en el orden de los siguientes reactivos: 2 enjuagues en alcohol etílico absoluto, alcohol etílico al 96 %, 80 %, 70 % y 50 % y dos baños de 3 minutos en agua destilada.

Recuperación antigénica. La recuperación antigénica se realizó colocando las laminillas en solución EDTA 0.01M a pH 9.0 a 90 ºC por 30 min, dejándola enfriar lentamente en la misma solución hasta que alcanzaron la temperatura ambiente, posteriormente las laminillas se lavaron 3 veces por 3 min en TBS 1X pH 7.4.

Permeabilización. La permeabilización de los tejidos se realizó colocando las laminillas en una cámara húmeda para evitar la deshidratación del tejido, aplicando sobre este tejido 200 µL de solución de Triton X100 al 0.2 % en PBS 1 X pH 7.4 e incubando durante 1 h a TA, posteriormente las laminillas se lavaron 3 veces por 3 min en TBS 1 X pH 7.4, con el propósito de retirar la solución de Triton.

Bloqueo. El bloqueo de los tejidos se realizó colocando las laminillas en una cámara húmeda aplicando al tejido 200 µL de solución de bloqueo (10 % de suero bovino fetal, 5 % de leche en polvo diluida en PBS 1 X pH 7.4) e incubando durante una hora a TA, posteriormente las laminillas se lavaron 3 veces por 3 min en TBS 1X pH 7.4.

Anticuerpo primario. La conjugación del anticuerpo primario anti-Ashwin C2orf49 Antibody (K-12) (Santa Cruz Biotechnology) se realizó colocando las laminillas en una cámara húmeda y aplicando sobre el tejido 200 µl de solución del anticuerpo diluido con TBS 1 X pH 7.4 en una proporción 1:100. Las laminillas se incubaron durante toda la noche a 4 ºC y posteriormente se lavaron 3 veces por 3 min en TBS 1X pH 7.4.

Detección por inmunohistoquímica. Para la detección con peróxidasa se utilizó el kit LSAB + SySTEM-HRP (Dako. Cat. K0690) utilizando el siguiente protocolo de tinción: 1) Bloqueo de peroxidasas: después de los lavados del primer anticuerpo, se aplicó suficiente solución de peróxido de hidrogeno al 3 % para cubrir el tejido, donde se incubo 5 min, se enjuago con agua destilada y posteriormente se incubo 3 min con PBS 1X pH 7.4. 2) Enlace: se eliminó el exceso de PBS de la laminilla y se aplicó suficiente “solución de enlace” para cubrir el tejido, incubándose 30 min a TA y enjuagándose las laminillas 3 min con TBS 1 X pH 7.4. 3) Estreptavidina-peroxidasa: se eliminó el exceso de TBS de la laminilla y se aplicó suficiente solución de estreptavidina-HRP para cubrir el tejido, se incubo 30 min a TA y se enjuagaron las laminillas durante 3 min con TBS 1 X pH 7.4. 4). Solución de sustrato-cromógeno: se eliminó el exceso de

PBS de la laminilla y se aplicó suficiente solución de sustrato-cromogeno (3,3-Diaminobencidina (DAB), Sigma Aldrich) para cubrir el tejido, se incubo por 10 min a TA y se enjuagó las laminillas cuidadosamente con agua destilada. 5) Contraste: se colocaron las laminillas en un baño de hematoxilina, incubándose 2 min, se enjuagó con agua destilada en 10 ocasiones en agua amoniacal y se enjuago con agua desionizada por 2 min. 6) Montaje: se deshidrato el tejido con un baño de alcohol etílico de 96 %, posteriormente en alcohol absoluto y finalmente en xileno, finalmente se colocó una gota de resina (Entellan Merck) para fijar el cubreobjetos.

Tinción de núcleos. Se retiró el exceso de TBS se bañó el tejido con una solución de 100 ng/µL de Hoechst 33328, incubándose por 10 min a TA, posteriormente las laminillas fueron lavadas 3 veces por 3 min en TBS 1X pH 7.4.

Microscopia

Microscopia óptica. Las detecciones por inmunohistoquímica se evaluaron por microscopia óptica en el microscopio Axiostar plus (Zeiss).

Hibridación in situ por fluorescencia (FISH)

El análisis microscópico de los tejidos por FISH fue evaluado en un microscopio de epifluorecencia AxioLmager. Se utilizaron los filtros 5-TFP a 492/520 LO, con el propósito de detectar el fluorocromo Alexa Flor 488. Al igual que el filtró 2 con longitud de excitación y emisión de 360/466 que permite identificar la tinción con Hoechst 33328.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Como primer paso en la generación de un vector plasmídico, que nos permitiera la síntesis *in vitro* de una sonda de ARN de 583 pb complementaria al ARNm que codifica para la proteína *Ashwin*, así como su respectiva anti-sonda, se obtuvo un producto de PCR de 583 pb utilizando ADNc sintetizado a partir de ARN total extraído de testículo (Figura 2).

El producto de PCR fue subclonado en el vector pCR4-TOPO con la finalidad de colocar en sus dos extremos los promotores T3 y T7, de tal manera que con el uso de enzimas ARN´s polimerasas especificas a cada promotor, sintetizar *in vitro* cadenas sencillas ARN ya sea a partir de la cadena de ADN informativa o de su complementaria.

Los plásmidos candidatos que portan el fragmento de PCR, fueron replicados y aislados, de 8 colonias bacterianas como se muestra en la Figura 3, observándose una buena cantidad y calidad del ADN plasmídico. Los plásmidos que incorporaron exitosamente el fragmento de 583 pb fueron identificados por PCR con los oligonucleótidos específicos para el sector de 583 pb correspondientes al gen *Ashwin*.

En la Figura 4 se muestra el ejemplo representativo de la amplificación positiva del fragmento de 583 pb de uno de los plásmidos aislados, lo que indica la subclonación exitosa del producto de PCR. Por lo tanto se procedió a una caracterización más rigurosa del vector.

Una vez identificada la presencia del inserto de ADN en el plásmido, se valido su identidad a través de su secuenciación automática.

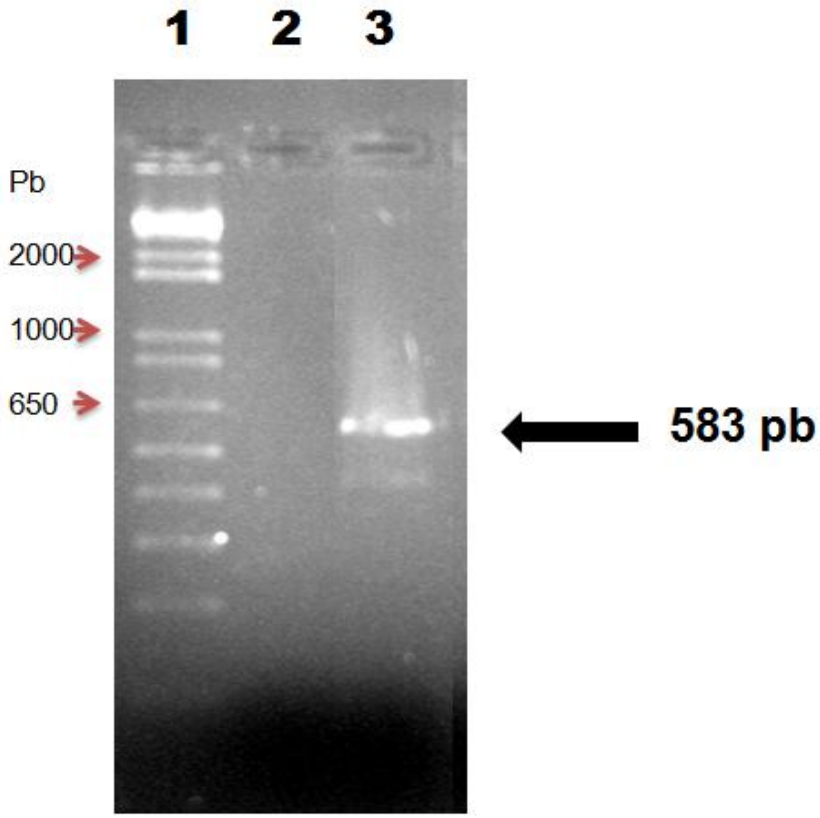

Figura 2. Producto de PCR obtenido de la amplificación de *Ashwin* a partir del ADNc de testículo bovino.
Carril 1. MPM marcador de peso molecular de 1 Kb plus ADN escalera. Carril 2. Control negativo de PCR. Carril 3. Producto de la reacción de PCR de ADNc de testículo de bovino adulto, con los oligonucleótidos que amplifican un sector de 583 pb correspondientes al gen *Ashwin*.

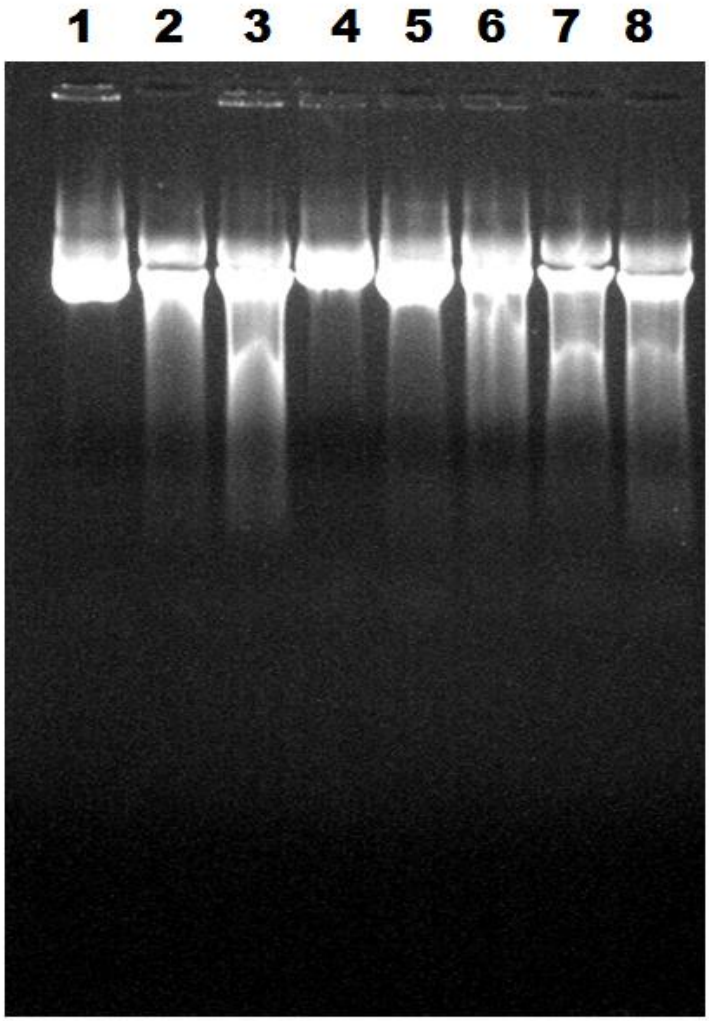

Figura 3. Extracción de ADN plasmídico.
Carriles 1-8. Plásmidos aislados de 8 colonias bacterianas TOP10 transformadas con la reacción de ligación.

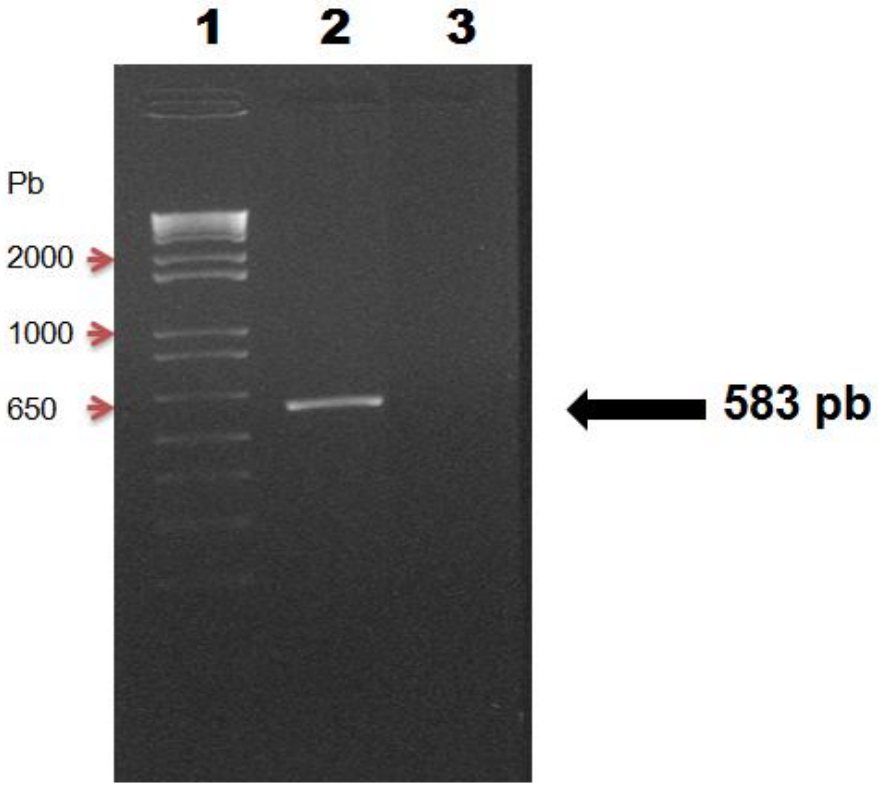

Figura 4. Producto de PCR obtenido de la amplificación de *Ashwin* a partir del plásmido pCR4-TOPO 4.0kb clonado con el gen *Ashwin*.
Carril 1. MPM marcador de peso molecular 1 Kb plus ADN escalera. Carril 2. Producto de la reacción de PCR a partir del plásmido pCR4-TOPO 4.0kb previamente clonado con el gen *Ashwin,* amplificado con los oligonucleótidos correspondientes al gen *Ashwin* que amplifican un sector de 583 pb. Carril 3. Control negativo de PCR.

La secuenciación automática se realizó por medio de la amplificación del inserto y su posterior secuenciación utilizando los oligonucleótidos M13-R Y M13-F que reconocen secuencias en el plásmido que flanquean al inserto de 583 pb.

En la Figura 5A se esquematiza la estructura génica del vector, particularmente en el sitio denominado ¨polilinker¨ en donde se encuentra insertado los 583 pb que corresponden a la secuencia de *Ashwin*, los sitios de restricción vecinos, los promotores T3 Y T7, así como los sitios donde hibridan los oligonucleótidos M13 R Y F.

En la Figura 5B se presenta el resultado de la secuencia de ADN que se obtuvo utilizando el oligonucleótido M13-F, además se observa la homología que existe cuando se compara con la secuencia de *Ashwin* previamente reportada en la base de datos de NCBI (National Center for Biotechnology Information, por sus siglas en inglés) la cual fue del 99 %, lo que sustenta la identidad de la secuencia de ADN.

Un análisis más detallado de la lectura de la secuenciación permitió identificar de manera clara la secuencia del promotor T3 antes del codón de inicio de la traducción (Figura 5B).

Lo anterior indicó que utilizar la enzima ARN polimerasa específica al promotor T7, permitió sintetizar *in vitro* la sonda sentido que si es complementaria y que por lo tanto permitirá la detección del ARNm que codifica para la proteína Ashwin. Este nuevo vector fue denominado como pCR4/*Ashwin.*

B)

```
Query  241  GAATTAACCCTCACTAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTATGGCG  300
             ||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  677  GAATTAACCCTCA-TAAAGGGACTAGTCCTGCAGGTTTAAACGAATTCGCCCTTATGGCG  619
Query  301  GGGGATGTGGGCGGTCGCAGCTGCACGGATTCGGAGCTGCTTCTGCACCCGGAGCTGCTG  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  618  GGGGATGTGGGCGGTCGCAGCTGCACGGATTCGGAGCTGCTTTTGCACCCGGAGCTGCTG  559
Query  361  TCCCAGGAGTTCCTTCTCCTCACCCTGGAGCAGAAGAACATAACTGTTGAAAATGACATG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  558  TCCCAGGAGTTCCTTCTCCTCACCCTGGAGCAGAAGGACATAACTGTTGAAAATGACATG  499
Query  421  AGAGTAAACAAAGACAGCCTGACCGACCTTTATGTTCAGCATGCAATACCACTGCCTCAG  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  498  AGAGTAAACAAAGACAGCCTGACCGACCTTTATGTTCAGCATGCAATACCACTGCCTCAG  439
Query  481  AGGGATTTGCCAAAGAGTAGATGGGGGAAAATGATGGAAAAGAAGAGAGAACAACACGAG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  438  AGGGATTTGCCAAAGAGTAGATGGGGGAAAATGATGGAAAAGAAGAGAGAACAACACGAG  379
Query  541  ATAAAAAAGGAGACAAAAAGGAGTAGCCCTGCAGATGGGTTGCGGAAAAGACCCCTCATT  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  378  ATAAAAAAGGAGACAAAAAGGAGTAGCCCTGCAGATGGGTTGCGGAAAAGACCCCTCATT  319
Query  601  GTGTTTGACGGAAGTTCAACAAGTACAACCATAAAAGTGAAGAAGACGGAGAACGGGGAT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  318  GTGTTTGACGGAAGTTCAACAAGTACAACCATAAAAGTGAAGAAGACGGAGAACGGGGAT  259
Query  661  AATGACCGGCTCAGGCCCCAGCCCCAGGCGAGCGCTACCAGTAATACCTTTAGAAAATCG  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  258  AATGACCGGCTCAGGCCCCAGCCCCAGGCGAGCGCTACCAGTAATACCTTTAGAAAATCG  199
Query  721  TCAGATTCTTCCTCAAGTGTTTCACCCCTAGTTTTGTCTTCCAATTTGCCTACGAACAAT  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  198  TCAGATTCTTCCTCAAGTGTTTCACCCCTAGTTTTGTCTTCCAATTTGCCTACGAACAAT  139
Query  781  AAAATGGAACACGGTAATAATGACAATAAGCAGAACCATGACTTAACACATAGGAAAAGT  840
             |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  138  AAAATGGAACACGGTAATAATGACAATAAGCGGAACCATGACTTAACACATAGGAAAAGT  79
Query  841  CCCTTGGGCCCTGTGAGGTCGCCGCCTT  868
             |||||||||||| ||||||||| ||||
Sbjct  78   CCCTTGGGCCCTG-GAGGTCGCC-CCTT  53
```

Figura 5. Anatomía molecular del vector pCR4-TOPO 4.0kb.
A) Esquema de la anatomía molecular de la región del ¨polilinker¨ del vector pCR4-TOPO 4.0 kb en el que se subclono los 585 pb pertenecientes correspondientes al gen *Ashwin*. B) Análisis del producto de la secuenciación obtenida con el oligonucleótido M13-F con el programa BLAST. El sector rojo resalta el sector del promotor T3, El sector de color verde resalta el codón de inicio correspondiente al gen *Ashwin*.

... Región del promotor T3
... Codon de inicio del gen *Ashwin*

Identificación de Transcritos que Codifican a la Proteína Ashwin en Tejido Ovárico.

Un requisito indispensable para la síntesis *in vitro* de las sondas, es que el plásmido se encuentre en una condición linearizada. Para sintetizar la sonda antisentido que es complementaria al ARNm de *Ashwin*, el vector pCT4/Ashwin fue linearizado con la enzima *Spe*1 y el promotor utilizado para su transcripción fue el T7 (Figura 6).

Para la sintetizar la sonda sentido, el plásmido fue linearizado con la enzima *Not*1 y la transcripción fue realizada a través del promotor T3 (Figura 7). Las antisondas y sondas fueron marcadas con el compuesto fluorescente Alexa flúor 488 que emite una fluorescencia verde, y ambas fueron utilizadas ya sea para la identificación del ARNm transcrito del gen *Ashwin* presentes en cortes histológicos de ovario o como control negativo del experimento respectivamente.

En la Figura 8 se muestran los resultados del análisis por microscopía de fluorescencia realizado en cortes histológicos de ovario bovino adulto procesado por FISH.

En la figura 8A se muestra el control negativo del experimento, donde un corte histológico fue teñido con Hoechst 33328 para teñir los núcleos y mostrar el contexto celular del tejido.

En la imagen se puede apreciar la fluorescencia en color azul que es emitida por todos los núcleos celulares que componen el tejido ovárico analizado (Figura 8A, columna Hoechst).

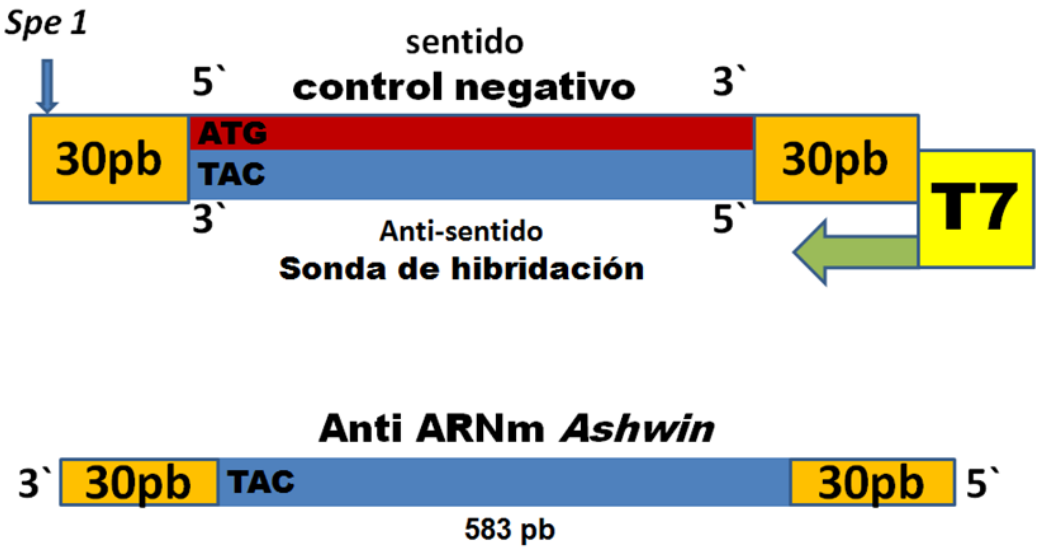

Figura 6. Esquema virtual del sector linearizado del plásmido pCR4/*Ashwin,* que inicia de la región de restricción con la enzima *Spe1* hasta el promotor T7.
En color rojo se muestra la cadena de ADN informativa que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína Ashwin. En azul se representa la cadena de ADN no informativa. La transcripción a partir del promotor T7 genera un ARN de 583 pb (azul) complementario al ARNm que codifica para la proteína, por lo que su complementariedad promoverá su hibridación.

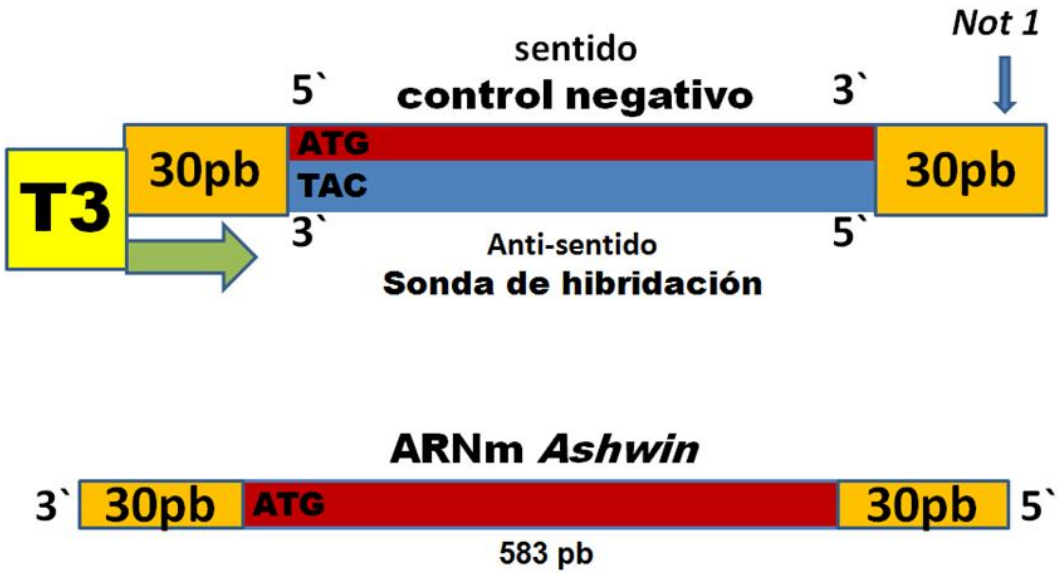

Figura 7. Esquema virtual del sector linearizado del plásmido pCR4/*Ashwin,* que inicia de la región de restricción con la enzima *Not1* hasta el promotor T3.

En color rojo se muestra la cadena de ADN informativa que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína Ashwin. En azul se representa la cadena de ADN no informativa. La transcripción a partir del promotor T3 genera un ARN de 583 pb (rojo) que no es complementario al ARNm que codifica para la proteína, por lo que la falta de complementariedad no promoverá su hibridación.

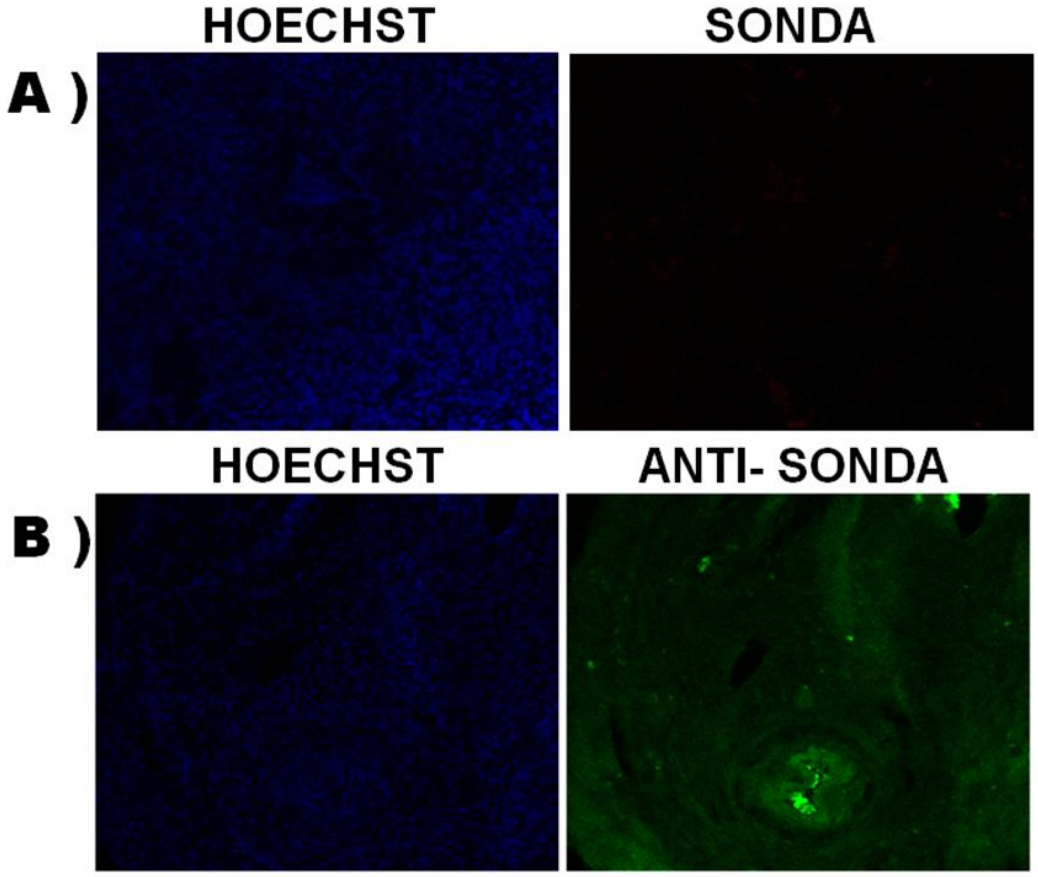

Figura 8. Análisis por microscopia de fluorescencia de ovario bovino adulto procesado por FISH.
A) Tejido de ovario teñido con Hoechst e hibridado con la sonda de ARN que nos es complementaria al ARNm de Ashwin.
B) Tejido de ovario teñido con teñido con Hoechst e hibridado con la sonda (anti-sonda) de ARN que si es complementaria al ARNm de Ashwin. CE. Células estromales. FE. Foliculo. OVO. Ovocito.

Simultáneamente el mismo corte fue tratado por el proceso de FISH, pero utilizando la sonda que no es complementaria al ARNm de Ashwin (Figura 8A, columna Ashwin), como era de esperarse se observó una nula señal fluorescente verde, debido a la ausencia de complementariedad entre la sonda y el ARNm natural que codifica para la proteína Ashwin.

En la Figura 8B se muestran los resultados obtenidos en un experimento de FISH utilizando la antisonda que si es complementaria al ARNm que codifica para la proteína Ashwin. En la Figura 8B, columna Hoechst, se puede apreciar la fluorescencia en color azul emitida por todos los núcleos celulares cuando el tejido es marcado con Hoechst, revelando la estructura celular del tejido ovárico. Interesantemente cuando se realiza el experimento de FISH utilizando la antisonda, se observa una señal fluorescente verde, lo que revela una hibridación positiva de la antisonda sintetizada *in vitro* y marcada con Alexa Fluor 488 con el ARNm que codifica a la proteína Ashwin.

El análisis de la fluorescencia reveló que el ARNm mensajero que codifica para la proteína Ashwin es transcrito débilmente por la mayoría de las células estromales del ovario adulto, sin embargo, la señal se intensifica de manera importante en las células del folículo, observándose una mayor señal en la región en donde se encuentra la estructura del ovulo. Estos resultados son consistentes con los ensayos por RT-PCR realizados por Soto-Orduño, (2011), en los que demostró con esta técnica la expresión de los transcritos en el ovario; sin embargo, este experimento demuestra demostró con mayor claridad que la actividad transcripcional del gen es alta en las células germinales del

ovario, observación que sustenta mejor la hipótesis de la relevancia funcional de este gen en los mecanismos de reproducción, como puede ser el desarrollo del mismo ovocito.

Distribución Celular de la Proteína Ashwin por Medio de Inmunohistoquimica

Es importante comentar que al momento del inicio de los experimentos de FISH, se publicó un anticuerpo comercial que detecta la región amino terminal de la proteína Ashwin (AntiAshwin C2orf49), lo anterior permitió un replanteamiento del trabajo que implico dejar de lado el estudio del ARNm y dirigirlo a la detección de la proteína en las poblaciones de presente en las células gonadales en el ovario y testículo, para lo cual se procedió a realizar la técnica de inmunohistoquímica, la cual se fundamenta en la detección de un antígeno proteico determinado, haciendo visible su localización mediante el uso de anticuerpos dirigidos especialmente contra algún epitope del antígeno proteico de interés.

Expresión de la Proteína Ashwin en Tejido Ovárico Fetal y Adulto

Se realizó una selección de los cortes histológicos de tejido ovárico y testicular, con el objetivo de capturar las imágenes que mostraran la mayor variedad de células representativas de las gónadas, específicamente las células directamente relacionadas con la línea germinal.

En todos los ensayos experimentales de tejido ovárico o testicular, se incluyeron cortes que fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la calidad de los cortes histológicos de los tejidos y de esta manera

seleccionar aquellos que fueran los más adecuados para el proceso de inmunohistoquímica. En el caso particular del tejido ovárico, debido a que la folículogénesis se caracteriza por una proliferación acelerada de las células somáticas que componen el folículo, las cuales proporcionan un ambiente óptimo para la ovogénesis, fue de gran importancia identificar cada estadio folicular, así como los distintos tipos celulares que lo componen. Los cortes obtenidos de ovario fetal teñidos con H&E fueron revisados con el objetivo 10X y 40X indicando la calidad de los cortes y la integridad estructural celular que conforma el tejido ovárico fetal (Figura 9A), observándose las estructuras típicas que se encuentran en un tejido ovárico fetal, entre ellas destacan la gran cantidad de folículos germinales primordiales (PGC´s por sus siglas en inglés) y folículos primarios distribuidos a través de la corteza del ovario separados por una baja población de células estromales, los cuales se incrementan hacia la región de la medula del ovario.

El análisis de los cortes a 40X (Figura 9A, columna II) permitió de manera clara identificar los PGC´s, que son estructuras caracterizadas por la presencia de un ovulo inmaduro rodeado de una capa de células epiteliales aplanadas escamosas de la pregranulosa, manteniéndose en esta condición hasta el inicio de la pubertad. También se puede identificar los folículos primarios los cuales se caracterizan por la diferenciación de las células de la pregranulosa, que pasaron a ser células de la granulosa con estructura cuboidal. Con respecto a los resultados de los ensayos de inmunohistoquímica con el anticuerpo que permite detectar la proteína Ashwin, (Figura 9B).

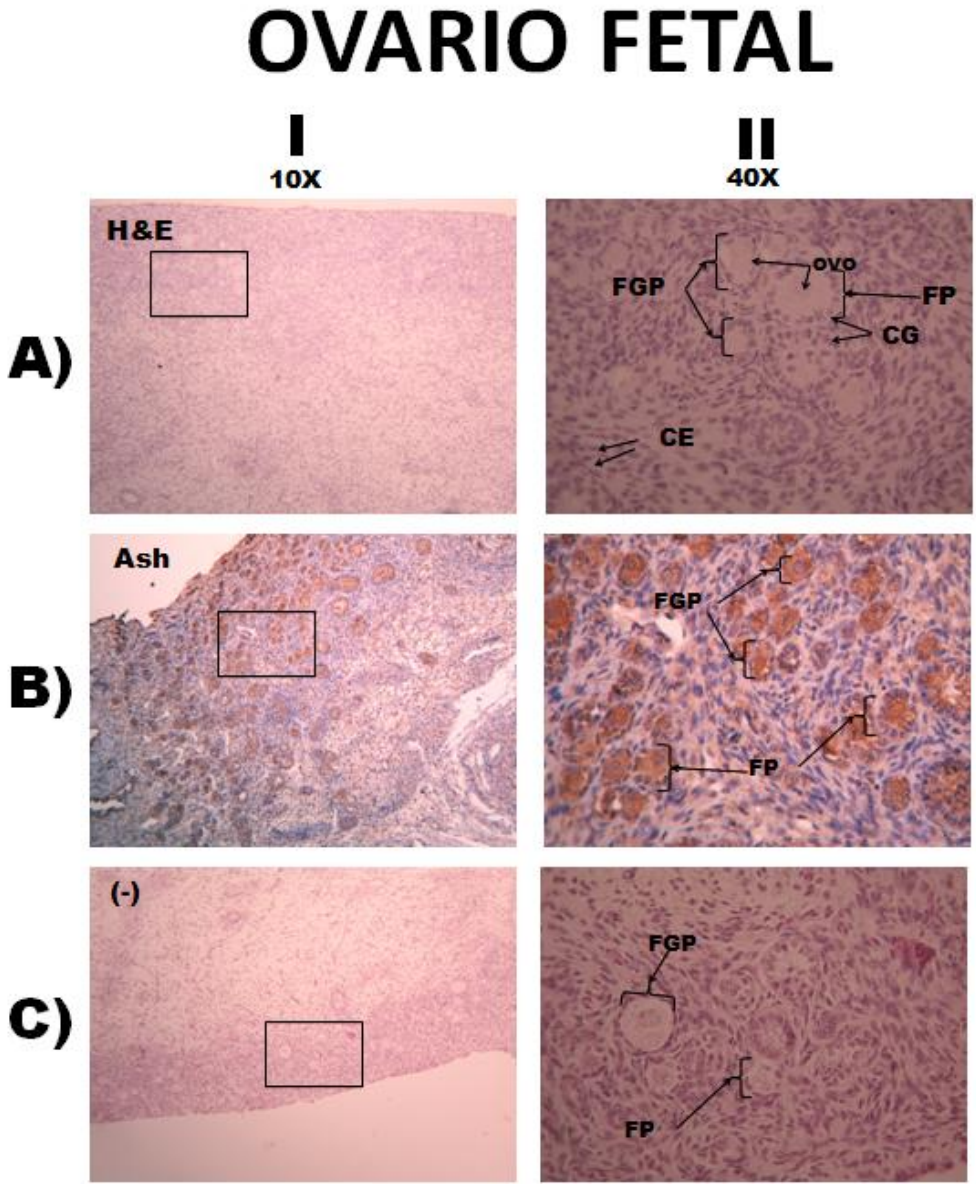

Figura 9. Identificación de la expresión de la proteína Ashwin por inmunohistoquímica en tejido de ovario fetal bovino.

A) Tinción con H&E.

B) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-ashwin teñido con hematoxilina.

C) Control negativo teñido con hematoxilina.

I. Campos de los experimentos tomados a un aumento de 10X.

II. Campos seleccionados en el campo a 10X (Señalados en un recuadro), pero analizados a un aumento de 40X.

FGP. Folículo Germinal Primordial. FP. Folículo Primario. CG. Células de la Granulosa. OVO. Ovocito. CE. Células Estromales.

En las imágenes se puede observar una tinción positiva y especifica de Ashwin en todas las estructuras foliculares presentes en el campo a un aumento de 10X (Figura B: I). Una observación más detallada de las PGC´s y folículos primarios nos revela una específica y alta expresión de la proteína en el ovulo inmaduro (Figura 9B: II).

Simultáneamente a estos experimentos, se realizó una inmunohistoquímica que funciono como control negativo, en esta solo se utilizó el segundo anticuerpo, de tal manera que no debería generarse ninguna reacción positiva a la peroxidasa, lo que demostró que la señal generada por el primer anticuerpo especifico a la proteína Ashwin, no es una señal inespecífica (Figura 9C: I y II). Con respecto a los experimentos realizados en el ovario adulto, los cortes histológicos teñidos con H&E también nos demuestran el adecuado procesamiento de las muestras (Figura 10A).

El análisis microscópico a 40X permitió de igual manera identificar en el ovario fetal, la presencia en PGC`s y en folículos primarios (Figura 10A: I).

Además, se pudo identificar la presencia de folículos secundarios que se originan a partir de los primarios que continuaron su desarrollo adquiriendo capas sucesivas de células de la granulosa, aumentando el tamaño del ovocito y se roderón de células de la teca que visualmente tienen un núcleo aplanado (Figura 10A: II). Posteriormente el folículo secundario se convierte en un folículo terciario o de Graff debido a que adquiere un antro folicular (Figura 10A: III), que de igual manera aumenta su tamaño, llegando a convertirse en un folículo preovulatorio el cual finalmente contiene a un ovulo maduro (Figura 10A: IV),

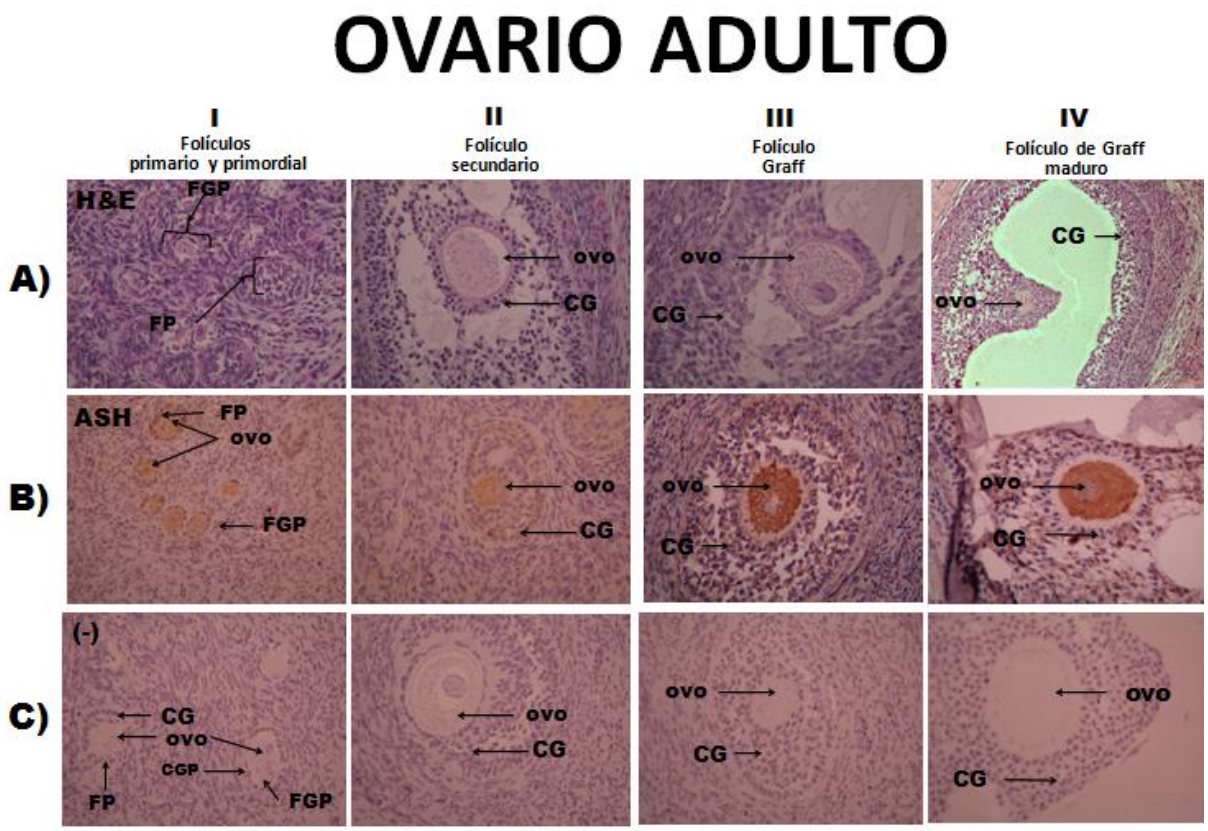

Figura 10. Identificación de la expresión de la proteína Ashwin por inmunohistoquímica, en tejido de ovario bovino adulto.

A) Tinción con H&E.

B) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-ashwin.

C) Control negativo teñido con hematoxilina.

Los campos fueron tomados a un aumento de 40X.

FGP. Folículo Germinal Primordial. FP. Folículo Primario. CG. Células de la granulosa. OVO. Ovocito.

Los experimentos de inmunohistoquímica realizados con el anticuerpo anti-Ashwin (Figura 10B) demostraron al igual que en el tejido ovárico fetal, una expresión positiva de la proteína en los ovocitos en desarrollo presentes en los folículos germinales primordiales, así como en los folículos primarios (Figura 10B: I). De manera interesante esta expresión se mantuvo en el ovocito en el folículo secundario (Figura 10B: II) y hasta el desarrollo del folículo de Graff y folículo preovulatorio (Figura 10B: III y IV). De igual manera el experimento correspondiente al control negativo, en el que fue utilizado solo el segundo anticuerpo, la ausencia de señal demuestra que la expresión observada para la proteína Ashwin en la Figura 10B, no se trata de una señal inespecífica (Figura 10C: I, II, III y IV).

Expresión de la Proteína Ashwin en Tejido Testicular Fetal y Adulto

Una vez realizado el análisis de la expresión de Ashwin en el ovario, procedimos a la identificación de la proteína en cortes de testículo fetal y adulto (figura 11 y 12). En la Figura 11A, se pueden observar las tinciones con H&E que se realizaron en cortes histológicos de testículo fetal, los cuales demostraron que las condiciones de corte y procesamiento del tejido fueron los adecuados para obtener imágenes (Figura 11: I y II).

En las tinciones de H&E del testículo fetal, se pudo observar las estructuras celulares más relevantes de esta fase del desarrollo, como la carente tortuosidad de los túbulos seminíferos, lumen pequeño, con una numerosa presencia de células de Sertoli que adoptan un patrón pseudoestratificado, con núcleo ovoides.

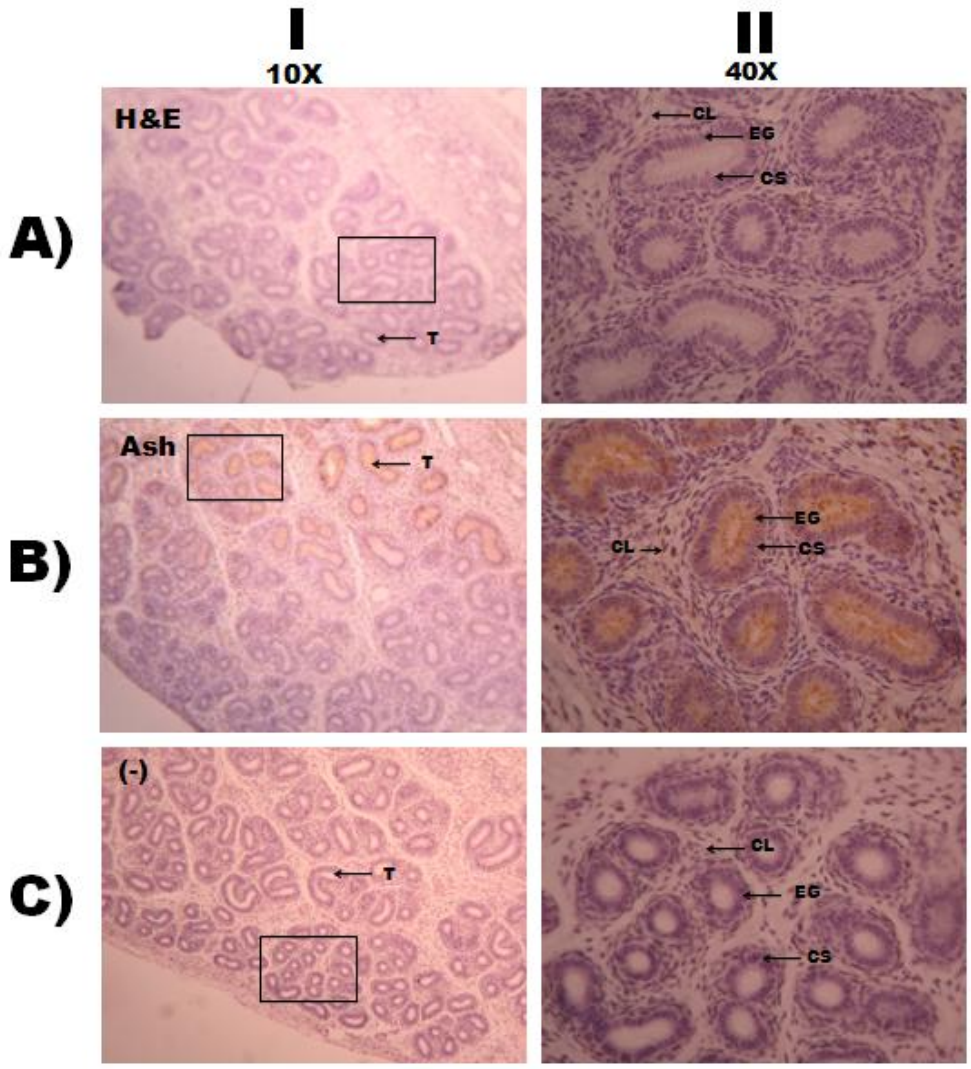

Figura 11. Identificación de la expresión de la proteína Ashwin por inmunohistoquímica en tejido de testículo fetal bovino.

A) Tinción con H&E.

B) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-ashwin y teñida con hematoxilina.

C) Control negativo teñido con hematoxilina.

Todos los experimentos fueron tomados a un aumento de 10X, en los mismos se señalan en un recuadro los campos del corte que fueron analizados a aumento de 40X.

T. Tubo Seminífero. EG. Espermatogonia. CS. Células de Sertoli. CL. Células de Leydig.

Además, se pueden observar las espermatogonias, que son células situadas preferentemente al centro del tubo (Figura 11: II).

Con respecto a las inmunohistoquímicas realizadas para detectar la proteína Ashwin (Figura 11B: I y II), se identificó una específica y alta presencia de la proteína en la región de los túbulos seminíferos, particularmente en las regiones internas del túbulo en donde se encuentran las espermatogonias.

De igual manera a los experimentos anteriores, se consideró la incorporación de un control negativo, que consistió en una inmunohistoquímica realizada solo con el segundo anticuerpo y como era de esperarse, solo se visualizaron las estructuras celulares teñidas con hematoxilina, pero una ausencia de peroxidasa.

Utilizando la misma estructura experimental, procedimos a realizar cortes histológicos de testículo de bovino adulto, los cuales fueron teñidos con H&E pudiéndose concluir que el tejido fue procesado de la manera correcta y las estructuras celulares conservaron su integridad morfológica (Figura 12A: I y II).

El análisis de las estructuras celulares en estas tinciones, con claridad reveló las estructuras generales de los túbulos seminíferos, los cuales se encuentran menos separados como los observados en el testículo fetal, también se encuentran perfectamente delimitados por láminas basales delgadas y tejido conectivo (Figura 12A: I).

También pueden observarse la presencia de espermatogonias, que son células muy cercanas a la membrana basal caracterizadas por núcleos redondos y obscuros (Figura 12A: II).

Posterior a las espermatogonias podemos encontrar células con núcleos más grandes, amorfos, con apariencia de división celular, las cuales son denominadas como espermatocitos primarios y secundarios (Figura 12A: II).

Además, pueden ser detectadas las espermatidas que son células que presentan un núcleo pequeño, son las más retiradas de las láminas basales y cercanas al lumen del túbulo seminífero (Figura 12A: II).

Finalmente se pueden identificar la presencia de las células de Sertoli, las cuales se aprecian con núcleos fusiformes pegados a la lámina basal y con orientación de 90º al centro del lumen. También se puede apreciar células de Leydig que se ubican en los cruces de los pliegues triangulares de la lámina basal (Figura 12A: II).

Una vez evaluado lo anterior, procedimos a los ensayos para la identificación de las poblaciones celulares en el tejido testicular de bovino adulto que expresan a la proteína Ashwin (Figura 12B).

Las observaciones realizadas en aumentos de 10X demuestran una expresión específica de la proteína en los túbulos seminíferos (Figura 12B: I).

En la Figura 12B en la columna II se pueden observar los campos de los tejidos capturados en aumentos de 40X permitieron identificar con más claridad los componentes celulares que constituyen los túbulos seminíferos, demuestran que la proteína Ashwin tiene una expresión positiva y específica en la región donde se localizan los espermatocitos primarios, secundarios y espermatidas, no lográndose identificar en las espermatogonias así como en las celulas de Sertoli y Leydig.

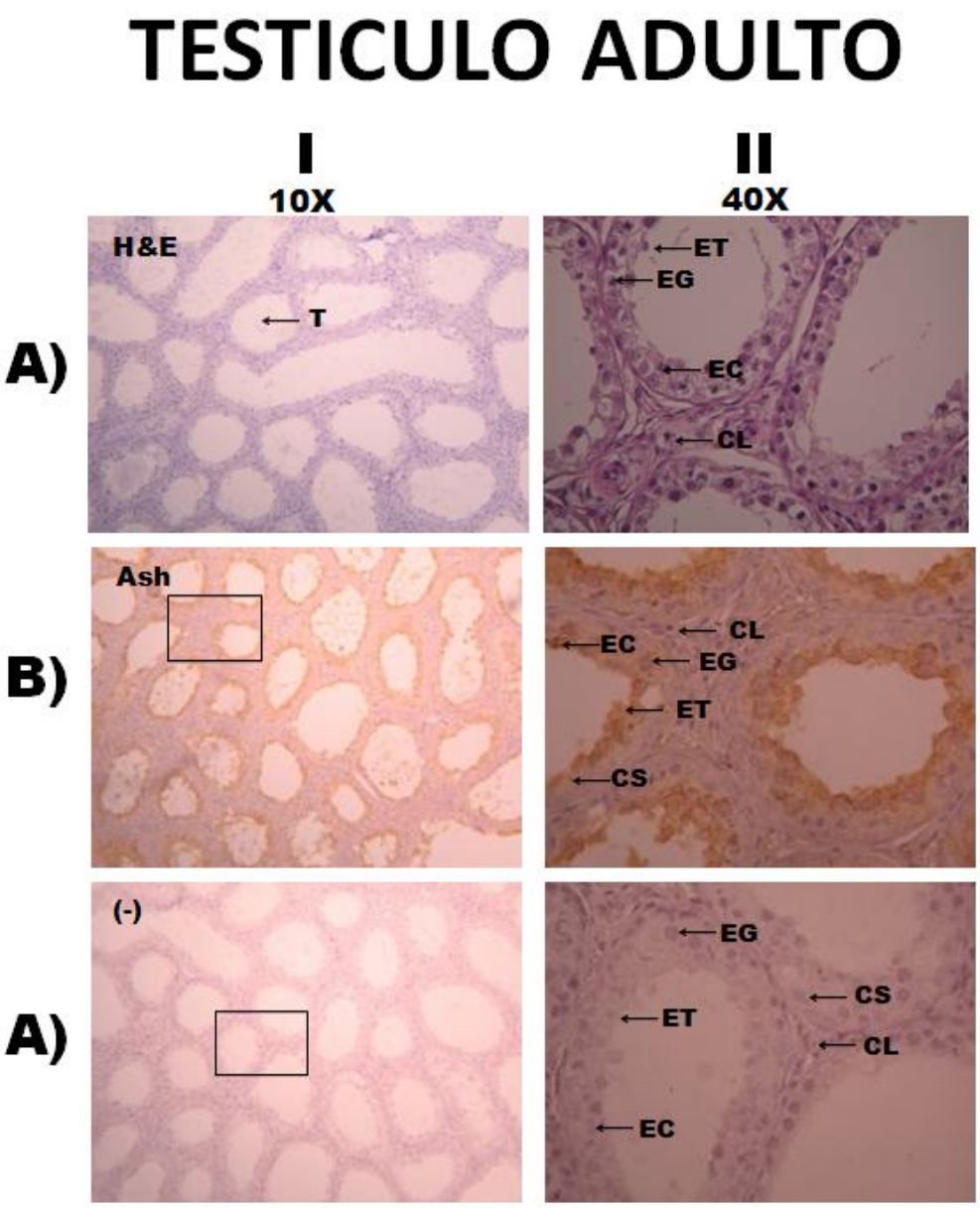

Figura 12. Identificación de la expresión de la proteína Ashwin por inmunohistoquímica en tejido de testículo bovino adulto.

A) Tinción con H&E.

B) Inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-ashwin.

C) Control negativo teñido con hematoxilina.

Los experimentos fueron tomados a un aumento de 10X, en los mismos se señalan en un recuadro los campos del corte que fueron analizados a aumento de 40X.

T. Tubo seminífero. EG. Espermatogonia. EC. Espermatocitos primarios y secundarios. ET. Espermatidas. CS. Células de Sertoli. CG. Células de Leydig. LB. Lámina basal.

Por otro lado, las observaciones hechas en el experimento control, que consiste en la inmunohistoquímica realizada en tejido testicular utilizando solo el segundo anticuerpo que contiene el complejo Avidina-Biotina (Figura 12C), demuestran una ausencia completa de señal de peroxidasa, lo que sustenta que la inmunohistoquímica anterior (Figura 12B) realizada con el anticuerpo que detecta a la proteína Ashwin (primer anticuerpo), genera una señal autentica y no inespecífica (Figura 12C: I y II).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo de investigación se logró por medio de un ensayo de transcripción *in vitro* y marcaje con alexa fluor 488, la síntesis de un ARN complementario (antisentido) al ARNm que codifica para la proteína Aswhin. Los ensayos de hibridación *in situ* realizados en cortes histológicos de ovario bovino, permitieron identificar la distribución de la expresión del ARNm que es transcrito de manera natural por las distintas poblaciones celulares que componen al ovario adulto, identificando una baja presencia en la mayoría de las células estromales que componen a este órgano. Sin embargo, se pudo observar una alta presencia del ARNm en el folículo, particularmente en la región del ovocito. Si bien la presencia del ARNm en muchas de las células del ovario indica una posible función generalizada de la proteína Ashwin en este órgano, la particular sobre expresión en el folículo indica la importancia de este gen en el desarrollo folicular.

Las observaciones anteriores fueron apoyadas con los ensayos de inmunohistoquímica realizados con el anticuerpo anti-ashwin, en cortes histológicos de ovario y testículo de estadios fetales y adultos. Estos demostraron que en el ovario fetal y adulto existe una expresión importante y especifica de la proteína en el ovocito a través de todos los momentos del desarrollo folicular (folículos primordiales, primarios, secundarios y de Graff). Estos resultados permiten concluir que las posibles funciones de la proteína Ashwin se centran en el desarrollo del ovocito en el ovario, un aspecto que tiene

que ser evaluado en el ovulo para comprender los mecanismos moleculares específicos en los que esta participa.

Con respecto al testículo, se demostró la presencia específica de la proteína en los túbulos seminíferos en las dos condiciones de desarrollo. Sin embargo, un análisis microscópico más detallado, revelo que la proteína durante el desarrollo fetal es expresada específicamente en las espermatogonias. Una vez que el testículo llega a la etapa adulta la expresión se intensifica en los espematocitos primarios, secundarios y espermátides, así como en células de Sertoli. En conjunto estos resultados permiten concluir que en el testículo, la proteína Aswhin durante la etapa fetal tiene una importancia en el desarrollo y las funciones de las espematogonias, sin embargo en la etapa adulta sus funciones se trasladan de manera específica a los momentos de diferenciación celular de las espermatogonias que conducen al desarrollo de los espermatozoides.

Los resultados aquí presentados comprueban la potencial importancia de esta proteína en los procesos reproductivos de mamíferos, particularmente de una especie comercial como lo es el bovino. Además, enriquece la idea de que la participación de la proteína está relacionada con la determinación, desarrollo y diferenciación de las células germinales como son los óvulos y espermatozoides. Si bien estos experimentos no explican los mecanismos moleculares concretos en los que participa, se recomienda futuros trabajos experimentales de supresión de la expresión del ARNm por ARNi en embriones tempranos bovinos y la evaluación de sus efectos en el desarrollo.

LITERATURA CITADA

Barnett A., B. Mandon-Pepin, C. Cabaus, E. Poumerol, E. Paihoux y C. Cotinot. 2008. Identification of transcripts involevel in meiosis and follicle formation diring ovine ovary development. Biomed central Genetycs. 9:436-437.

Bergfeld E. G. M., F. N. Kojima, A. S. Cupp, M. E. Wehrman, K. E. Peters, V. Mariscal, T. Sánchez y J. E. Kinder. 1996. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17ß-estradiol in bovine females. Biol Reprod*. 54*:546-553.

Castrillon, D. H., J. Q. Bradley, T. Y. Wang, C. Quigley y Ch. P. Crum. 2000. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. PNAS. 97:9585-9590.

Chuaire L y M. C. Sánchez. 2010 Células germinativas primordiales femeninas: origen y migración hacia los primordios gonadales. Colombia Médica. Universidad del valle. Cali, Colombia. 33:171-178.

Donohoe, M. E., S. S. Silva, S. F. Pinter, N. Xu y J. T. Lee. 2009. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctcf and also controls X-chromosome pairing and counting. Nature 460:128-132.

Espinoza J. L, R Ortega, A Palacios, J. Vale y C. F Aréchiga. 2007. Crecimiento folicular ovárico en animales domésticos ínterciencia. INERCIENCIA. 32.2.

Faddy M. J. y R. G. Gosden. 1996. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. Human Reprod*.* 11:1484-1486.

Faure R. y C. Morales. 2003. la pubertad de la hembra bovina: i. aspectos fisiológicos*.* Salud Animal. 25.1.

Fortune J. E. 2002. Activation of primordial follicles. En Eppig J, Hegele-Hartung CH, Lessl M (Eds.) The future of the oocyte basic and clinical aspects*.* Springer. Nueva York, EEUU. ESFR. 41:11-21.

George F. y J. Wilson. 1994. Sex Determination and Differentiation. In: The physiology of Reproduction. Second edition. New York. E. Knobil and J D Neill Raven Press Ltd. 3-28. (Abstract)

Graves, J. A. 2002. Evolution of the testis- determining gene—the rise and fall of SRY. Novartis Found. Symp. 244, 86–97; discussion 97–101, 203–206, 253–257.

Giraldez, A. J., Y. Mishima, J. Rihel, R. J. Grocock, D. S. Van, K. Inoue, A. J. Enright, y A. F. Schier. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. Science 312:75-79.

Gubbay J., J. Collignon. P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Münsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow y R. Lovell. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346, 245-250.

Herrera, L., C, Ottolengi, J. E. Garcia-Ortiz, M. Pellegnini, F. Manini, M.S.H. Ko, R. Nagaraja, A. Forabosco y D. Schessinger. 2005. Mouse ovary developmental RNA and protein markers from gene expression profiling Dev. Biol. 279.271-290.

Henao G. y L. E. Trujillo. 2003. Dinámica folicular y función lútea durante la gestación temprana. estudio de un caso en bos indicus. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Departamento de Producción Animal, AA1027 Medellín, Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía. 56. 1: 1779-1788.

Hinkins M., Huntriss J., Miller D. y HM Picton. (2005). Expression of polycomb-group genes in human ovarian follicles, oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction*. 130; 883-888.

Lechuga-Valles R. 2010. Desarrollo de una librería de ADNc para el aislamiento y caracterización de genes que intervienen en el desarrollo folicular del ovario ovino. Tesis Maestría en Ciencias. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chih. Méx.

Lei L., P. Zheng y J. Dean. 2010. Maternal control of early mouse development. 137:859-870.

Michael R., G. Miranda, R. Anderson, J. Heasman y C. Wylie. 2000. The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. PubMed. 191;143-152.

Majid El, Mestrah., Philip E. Castle., Girum Borossa y Frederick W. K. 2002. Subcellular Distribution of ZP1, ZP2, and ZP3 Glycoproteins During Folliculogenesis and Demonstration of Their Topographical Disposition Within the Zona Matrix of Mouse Ovarian Oocytes. Biology of Reproduction 66:866 876.

Morales-Adame D., 2012. Análisis de la distribución de la proteína Ashwin en células HeLa. Tesis de licenciatura. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih. Méx.

Nilsson E. E. y MK Skinner. 2001. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. J. Soc. Gynecol. Invest. 8:17-20

Orozco-Lucero E., 2010. Desarrollo de un vector lentiviral para la expresión artificial del gen figla. Tesis Maestría en Ciencias. Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih. Méx.

Pangas SA. y A Rajkovic. 2006. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. PubMed. 12; 65-76.

Pérez C., C. Rodríguez, F. España, M. Hidalgo, J. Dorado y J. Sanz. 2002. Diagnóstico de quistes ováricos en vacas repetidoras de celos, Rev. Col. Cienc. Pec. 15:51-62.

Peña J., O. Góngora y J Estrada. 2007. Factores de crecimiento en el desarrollo folicular, embrionario temprano e implantación. Implicaciones en la producción de embriones bovinos. Córdoba: 942-954.

Saunders C. M., M. G. Larman, J. Parrington, L. J. Cox, J. Royse, L. M. Blayney, K. Swann, y F. A. Lai. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. Development 129: 3533-3544.

Schmidt A., Jeanene Mde Avila, Derek J. McLean. 2006. Grafting Period and donor age affect the potential for spermatogenesis in bovine ectopic testis xenografts. Biology of Reproduction 75:160-166.

Senbon S., Y. Hirao y T. Miyano. 2003. Interactions between the oocyte and surrounding somatic cells in follicular development: lessons from in vitro culture. J. Reprod. Dev. 49:259-269.

Serna-Hernández. G. 2014. Caracterisacion funcional y molecular de la señal de localización nuclear de la proteína Ashwin. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas.. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih. Méx.

Shima, J. E., D. J. McLean, J. R. McCarrey, y M. D. Griswold. 2004. The murine testicular transcriptome: characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. Biol Reprod. 71:319–330.

Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Frischauf, R. Lovell-Badge y P. N. Goodfellow, 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature. 4:346- 240.

Sonali S. P., B. A. Tara J. A. Uzman, C. H. Lou, H. Gohil y A. K. Sater 2006. Novel gene ashwin functions in Xenopus cell survival and anteroposterior patterning. Developmental dynamics. 235:1895–1907.

Soto-Orduño E. 2011. Identificación de genes relacionados con el desarrollo de la línea germinal femenina a partir de una librería de ADNc de ovario fetal bovino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas.. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chih. Méx.

Soto-Suazo M. y T. M. Zorn. 2005. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects School of Medicine, Faculty of Medical Sciences, University of Santiago de Chile, Chile, Department of Cell and Development Biology, Institute of Biomedical Sciences. University of São Paulo, Brazil. Anim. Reprod. 23:147-160,

Suzumori, N., Ch. Yan, M. Matzuk, y A. Rajikovic. 2002. Nobox is a homeobox-enconding hene preferentially expressed in primordial and growing occytes. Mechanisms of Development 127:4615-4654.

Sutovsky P. y G. Schatten. 2000. Paternal contributions to the mammalian: fertilization after sperm-egg fusion. Int. Rev. Cytol. 195:1-65.

Tohei A., F. Shi., M. Ozawa., H. Takahashi., I. Shimohira., T. Kojima., G. Watanabe y K. Taya. 2000. Dynamic changes in plasma concentration of gonadotropins, inhibin, estradiol-17b and progesterone in cows with ultrasound-guided follicular aspiration. Theriogenology.

Vanderhyden B. C. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. Front. Bioci. 7:2006-2022.

Wrobel KH. y F. Sub. 1998. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. Anatomy Embryology. 197; 451-467.

Zheng, P. y J. Dean, 2009. Role of Filia, a maternal effect gene, inmaintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 7473-7478.