



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE
TRANSCRIPCIÓN SRY EN LA EXPRESIÓN DE
WNT4

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

JESUS BENITEZ GRANADOS

TUTOR DE TESIS:
DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

COMITÉ TUTORAL:
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 05 de septiembre de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **BENÍTEZ GRANADOS JESÚS** con número de cuenta **96201057**, con la tesis titulada **"PARTICIPACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SRY EN LA EXPRESIÓN DE WNT4"**, realizada bajo la dirección de la : **DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA**

Presidente: DR. MARCO ANTONIO CERBON CERVANTES
Vocal: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
Secretario: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
Suplente: DRA. MA. EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE
Suplente: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de diciembre de 2011

M: del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACYT por el apoyo recibido para el desarrollo de esta investigación, en la cual el estudiante fue becario de tiempo completo con el número 202581.

A la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina, al Dr. Ramon Mauricio Coral Vazquez y al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por todo el apoyo y la asesoría.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A Jesus y Lourdes por enseñarme a creer.

A Miriam por la camaradería, comprensión y cariño.

A Chivis y Andrea por la invaluable ayuda y educación (y la lista de los lunes)

A Nubia, Cesar y Paco por escuchar mis sueños.

A Nancy, Fabiola y Daniel por las reuniones de los lunes.

A la Dra. Canto por la honestidad desde aquel primer día.

A todos los que de alguna u otra manera participaron en este trabajo: Josue, Manolo, Checo, Charly, Bladi, Bere, Don Agus, Elith, Erika, Dra. Haydeé, Dr. Garfias. Dr. Vilchis.

Una gran época de mi vida, que me ha permitido crecer y conocer a personas geniales.

“La vida a pesar de todo, es maravillosa”

V V G

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
DIFERENCIACION SEXUAL.....	9
<i>SRY</i>	15
<i>SOX9</i>	17
<i>DAX1</i>	19
<i>SF1</i>	20
<i>WT1</i>	22
<i>WNT4</i>	26
JUSTIFICACIÓN.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
HIPÓTESIS.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
CONSTRUCCION MOLECULAR.....	35
CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCION.....	39
EXTRACCION DE RNA.....	41
WESTERN BLOT.....	43
RESULTADOS.....	50
CLONACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION <i>SRY</i>	51
CULTIVO CELULAR.....	52
WESTERN BLOT	53
EXTRACCION DE RNA.....	54
DENSITOMETRIA.....	55
DISCUSIÓN.....	56

CONCLUSIONES.....	65
PERSPECTIVAS.....	66
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	67

INTRODUCCION

DIFERENCIACIÓN SEXUAL NORMAL

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos más importantes y complejos, ya que permite la perpetuación de las especies con reproducción sexual. El dimorfismo sexual es el resultado de una serie de eventos que se presentan en las etapas más tempranas de la vida requiriéndose para ello un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Éste, se realiza en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica. La diferenciación cromosómica se inicia al momento de la fertilización cuando un espermatozoide que posee un cromosoma "X" o un cromosoma "Y" fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma "X", estableciéndose así el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos. La hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY. El mecanismo posterior de la diferenciación gonadal dependerá de la presencia de factores determinantes de feminización o de masculinización presentes en los autosomas y en los cromosomas sexuales (Ohno et al., 1977). La presencia del cromosoma "Y" es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva independientemente del número de cromosomas "X" presentes en el genoma de un individuo (Goodfellow et al., 1988).

En el humano, la diferenciación sexual cromosómica ocurre al momento de la fertilización, pero el dimorfismo sexual gonadal se hace presente hasta la 6a. o 7a. semana de la vida intrauterina (Kofman et al., 1990). En los embriones de sexo femenino, uno de los principales indicadores del sexo del embrión es la presencia o ausencia de cromatina sexual (cuerpo de Barr). En este estadio indiferenciado del desarrollo sexual, los gametos migran hacia los primordios gonadales desde el saco vitelino. En los humanos, las células primordiales germinales en respuesta a un sustrato permisivo de la matriz extracelular, migran mediante un movimiento

activo de tipo ameboide desde la pared posterior del saco vitelino a lo largo de la pared del intestino posterior y a través del mesenterio dorsal hasta llegar a la región de las crestas genitales, recién formadas. Conforme las células germinales se aproximan a las crestas genitales al final de la quinta semana del desarrollo, pueden verse influidas por factores quimiotácticos secretados por las gónadas en formación (Carlson et al., 2005).

La gónada primitiva se forma por dos tipos de células: las células somáticas de origen mesodérmico y las células germinales primordiales, las cuales, por su temprana diferenciación pueden considerarse de origen autónomo. En el humano, las células de la zona craneal, de origen mesodérmico, se condensan para formar los primordios adrenocorticales, mientras que las de la parte caudal se convierten en crestas genitales, que se pueden identificar a mediados de la quinta semana de edad gestacional (McKay et al., 1983).

Cuando aparecen por primera vez las crestas genitales, tanto los embriones de sexo masculino como femenino, son morfológicamente indistinguibles y se conoce como gónada indiferenciada o gónada primitiva (Carlson et al., 2005). En el caso de los embriones de sexo masculino, la gónada primitiva se transformará en testículo si es que existe presencia y acción del factor determinante testicular (gen *SRY*) (Sinclair et al., 1990), el cual orquestará una cascada de eventos que llevan al desarrollo testicular a partir de la gónada indiferenciada (Figura 1) (López et al., 1995).

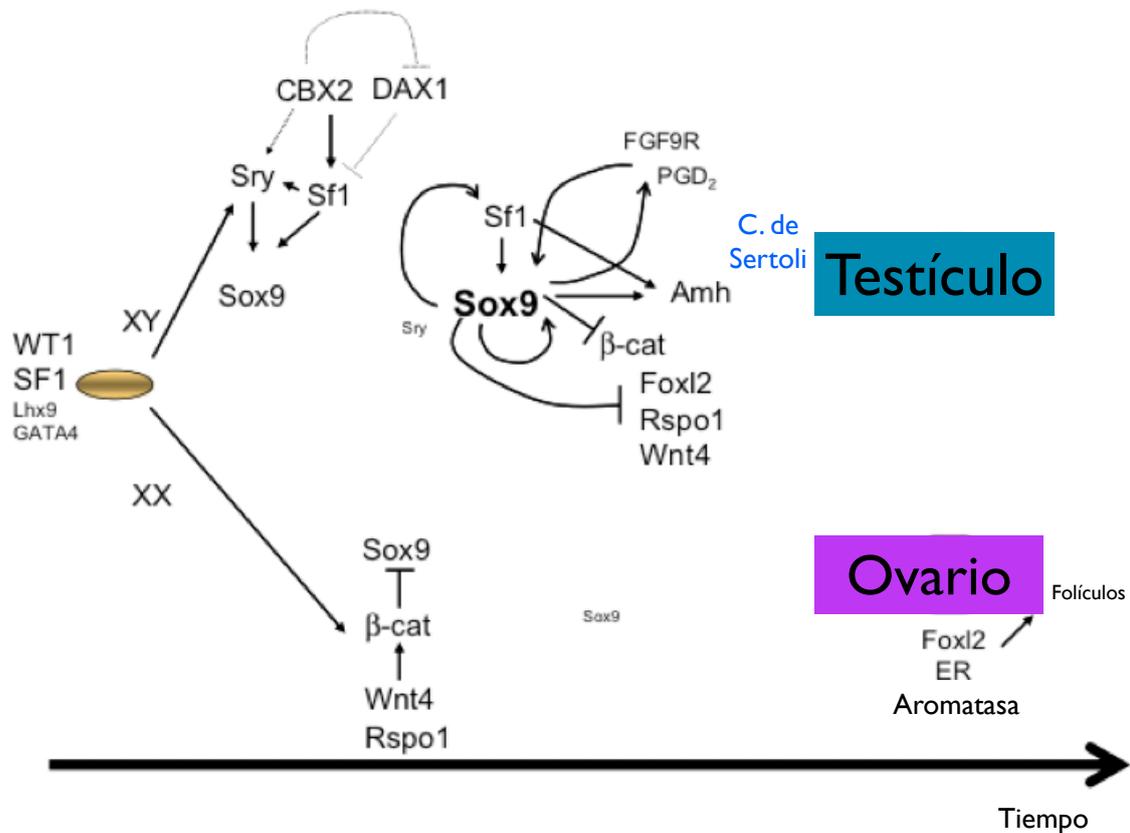


Figura 1. Genes que intervienen en la diferenciación gonadal en el humano. Existen dos grupos de genes diferentes encargados de promover la diferenciación testicular u ovárica. En el caso de la formación testicular la presencia de SRY, SOX9, SF1, FGFR9, AMH, CBX2 inhibe la expresión de genes relacionados con la formación ovárica como son WNT4, RSPO1 FOXL2. La inhibición de SOX9 probablemente por WNT4 y/o RSPO1 así como la ausencia de SRY permiten el desarrollo ovárico. (Biason-Lauber. 2010)

Se ha propuesto que el gen *SRY* (localizado en Yp11.3), induce la proliferación del epitelio celómico de las crestas gonadales así como la migración de células mesonéfricas hacia la cresta gonadal. Esta expresión del gen *SRY* en la cresta genital corresponde al periodo de inicio a la formación del testículo, es decir, en la sexta semana de edad gestacional en el humano y entre los días 10.5 y 12.5 días pos coito en el ratón (Figura 2). Por su parte en las células mesonéfricas, se encuentran los precursores de células de Leydig, de vasos sanguíneos y de otros elementos del tejido intersticial del testículo, así como de las células mioideas peritubulares. La presencia de éstas últimas parece ser determinante para que las

futuras células de Sertoli, provenientes al menos en parte del epitelio celómico, se organicen junto con las células germinales provenientes del saco vitelino, formando estructuras en forma de cordón (cordones testiculares). La interacción entre las células mesoneféricas y las células del epitelio celómico dan lugar a la diferenciación de las últimas, hacia células de Sertoli, las cuales comienzan a mostrar un patrón de expresión específico, caracterizado por un aumento de otras proteínas, como son SOX9, HIM, entre otras (Capel et al.,2000).

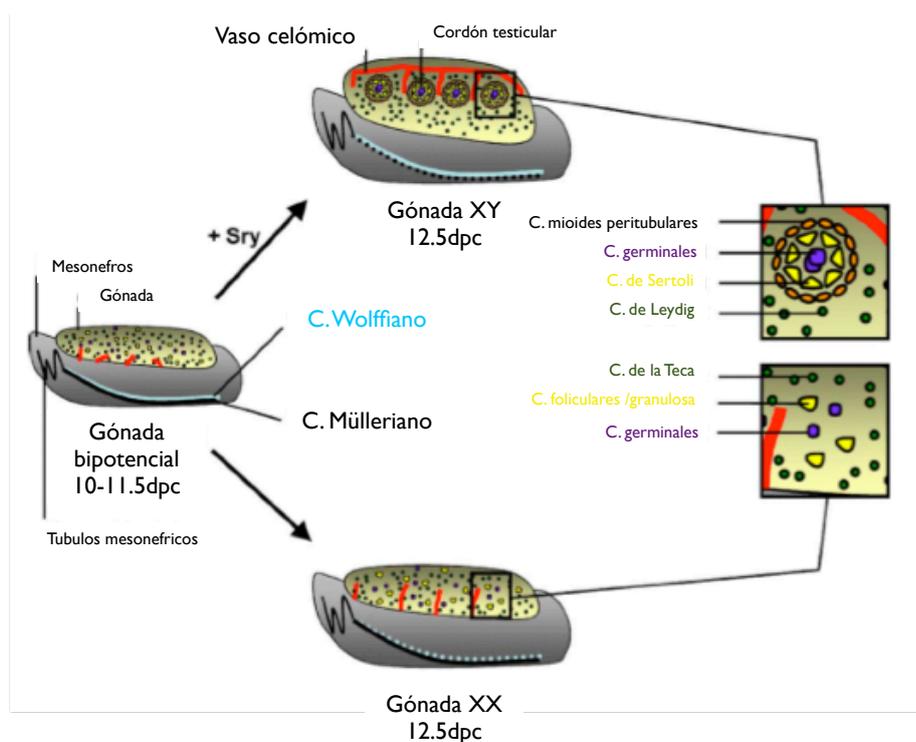


Figura 2: Representación esquemática de los cambios morfológicos y estructurales que ocurren en la gónada indiferenciada en ratón. Antes del 11.5 dpc están presentes los conductos Wolffianos y Müllerianos. A partir del 12.5 dpc después de la estimulación de Sry se lleva a cabo la regresión de los conductos Müllerianos y la diferenciación de los conductos Wolffianos en epidídimo, vasos deferentes y vesículas seminales. En el sexo femenino en ausencia de Sry se lleva a cabo regresión de los conductos Wolffianos y diferenciación de conductos Mullerianos en oviducto, útero y tercio superior de vagina (Modificado Bernard & Harley, 2006).

El mecanismo que lleva a cabo el dimorfismo en mamíferos fue descrito por Jost et al., (1983), quienes demostraron que cuando la gónada primitiva se diferencia a testículo, su producción hormonal induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal es hacia ovario, el fenotipo pasivamente será femenino. Asimismo, observaron que la ausencia temprana de gónadas fetales

también induce un fenotipo femenino (Jost et al., 1983). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común (tubérculo genital pliegues genitales y engrosamientos labioescrotales). Las estructuras primordiales del tracto genital que darán origen a los genitales internos incluyen dos sistemas de conductos presentes en los embriones de ambos sexos: los conductos Wolffianos (mesonéfricos) y los conductos Müllerianos (paramesonéfricos) (Grumbach et al., 1998).

El desarrollo del fenotipo masculino es consecuencia del efecto de tres hormonas fetales sobre los primordios genitales. El primer paso en la diferenciación genital masculina es la involución de los conductos Müllerianos, la cual es mediada por una hormona fetal de origen testicular: la Hormona Inhibidora de las Estructuras Müllerianas (HIM), que es sintetizada por las células de Sertoli. En el humano, este proceso se observa entre la sexta y la octava semana de la gestación y concluye en la décima primera con la desaparición de estas estructuras. HIM es parte de la familia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y actúa a través de dos receptores (tipo I y tipo II). La interacción de HIM y su receptor es muy específica ya que dará al inicio de la fase hormonal de la vía de la diferenciación del macho. Posterior a la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig, las cuales servirán como sustrato anatómico para la producción de testosterona que es la segunda hormona fetal virilizante que participa en la diferenciación del fenotipo masculino. El efecto virilizante de la testosterona se ejerce particularmente sobre los conductos Wolffianos que dan lugar a los genitales internos: epidídimo, vasos deferentes, vesículas seminales y conducto eyaculador (Wilson et al., 1995).

La biosíntesis *de novo* de testosterona en el testículo fetal se lleva a cabo a partir del colesterol teniendo como sustrato al acetato o a las lipoproteínas de baja densidad

del plasma por un mecanismo de endocitosis mediado por el receptor de la hormona. La síntesis de testosterona a partir del colesterol requiere de la presencia de diversos sistemas enzimáticos, que poseen regulación génica autosómica independiente. La testosterona es el andrógeno principal secretado por el testículo y es el precursor de la tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT). Ésta se forma en la célula blanco por la acción de la 5α -reductasa extragonadal y es el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. La DHT, durante la embriogénesis, es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata (Imperato et al., 1994).

La testosterona se une a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona (SHBG) y a la albúmina. El paso de la testosterona libre hacia las células no es dependiente de energía y probablemente está dado por un fenómeno de difusión pasiva. Tanto la testosterona y la DHT se unen, con la misma afinidad a las proteínas receptoras, formando un complejo (andrógeno-receptor) el cual sufre una reacción de transformación que promueve su unión al ADN desencadenando los mecanismos intracelulares que conducen a la virilización de los conductos Wolffianos en la gestación.

Cabe mencionar que durante la embriogénesis, el ovario no secreta HIM ni testosterona, la ausencia de estas dos hormonas ocasiona la diferenciación de los conductos Mülllerianos y la regresión de los conductos Wolffianos, dando así lugar a la formación de los genitales femeninos internos (útero, trompas de Falopio y tercio superior de la vagina).

Por otra parte se sabe que diferentes genes (*WT1*, *SF1*, *SOX9*, *DAX1*, *WNT4* y *DHH*) que codifican proteínas específicas, las cuales están implicadas en el desarrollo gonadal y fenotípico del macho (Achermann et al., 2002; McLaughlin et al., 2004).

GENES QUE INTERVIENEN EN LA CASCADA DE LA DETERMINACION Y DIFERENCIACION SEXUAL MASCULINA. GEN SRY

En 1990 Sinclair et al.,(1990) identificaron el gen que dirige la diferenciación de la gónada primitiva en testículo, denominándosele gen *SRY*. Este gen se encuentra en Yp11.3 y está formado por un sólo exón, no tiene intrones y codifica para un factor de transcripción. El transcrito del *SRY* es de 1.1 kb y la región traducida está constituida por una proteína de 204 aminoácidos, con un peso molecular de 23.9 kDa que se localiza en el núcleo (Su et al.,1993; Dubin et al., 1994; Poulat et al., 1995; Harley et al., 2003). La unidad transcripcional del gen *SRY* se encuentra precedida por dos pequeñas zonas ricas en G-C que cubren parte de la región 5' no traducida. Dentro de estas zonas se han identificado sitios de unión a factores de transcripción, además de secuencias que podrían incrementar la transcripción (Su et al.,1993; Desclozesaux et al.,1998; Hossain et al., 2001; Matsuzawa-Watanabe et al., 2003). Asimismo, se ha identificado en dicha región, una secuencia consenso AACAAA a la cual se une la proteína *SRY*; esta secuencia actúa como un mecanismo de regulación de la expresión del gen (Nasrin et al., 1991; Harley et al.,1992). Diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la caja HMG de la proteína *SRY* (proteínas del grupo de alta movilidad) es el motivo de unión al ADN e induce el doblamiento del mismo en un ángulo de 70° (Ferrari et al., 1992). Esta propiedad de alterar significativamente la estructura del ADN, sugiere que dicha proteína participa en la diferenciación testicular, al promover la interacción proteína-proteína y/o en la unión de complejos de proteínas con el ADN a través del desdoblamiento del mismo (Werner et al., 1995; Tang et al., 1998).

Aún no se ha podido establecer el momento preciso en el cual las estirpes celulares gonadales se diferencian hacia lo femenino o masculino. En el humano como en el ratón, el inicio de la expresión del ARNm del *SRY* define que la gónada indiferenciada se transforme en testículo (Harley et al., 2005) y esta expresión se observa principalmente en la cresta genital durante el período que corresponde al inicio de la formación del testículo, es decir entre la sexta y séptima semana de edad gestacional en el humano y entre los días 10.5 y 12.5 poscoito en el ratón (Koopman et al., 1990; Hacker et al., 1995). En los ratones machos, la expresión del *Sry* en la gónada indiferenciada inicia diversos eventos morfológicos que incluyen la diferenciación de las células de Sertoli, la migración de las células mesonéfricas hacia la gónada y la reorganización de la vasculatura gonadal (Brennan et al., 2002). La expresión del *SRY* humano a diferencia del *Sry* del ratón, continúa en la vida adulta, sugiriéndose que el *SRY* participa en otros procesos diferentes a la determinación testicular (Harley et al., 2000).

Existen diversas evidencias en la literatura que confirman que el gen *SRY* es el factor determinante testicular; algunas de éstas son las siguientes: 1) está localizado en *Yp*, adyacente a la región pseudoautosómica y es capaz de inducir la diferenciación testicular en el ratón (Sinclair et al., 1990) y como ha sido demostrado por nuestro grupo de trabajo, en el hombre (Lopez et al., 1995); 2) algunas disgenesias gonadales puras XY (padecimiento en el cual los testículos se encuentran sustituidos por estrías gonadales) presentan mutaciones en el gen *SRY* (Cameron & Sinclair., 1997; Schäfler et al., 2000; Assumpcao et al., 2002); 3) en el ratón, la expresión del gen *Sry* se correlaciona con el inicio de la determinación testicular (Koopman et al., 1990); 4) la inserción de un fragmento de ADN de 14 kb, que incluye al gen *Sry* del cromosoma Y a ratones transgénicos XX, puede inducir la

diferenciación testicular (Koopman et al., 1991) y 5) éste es un gen evolutivamente conservado en el cromosoma Y de mamíferos metaterios y euterios (Foster et al., 1992).

A pesar de que la evidencia a favor del gen *SRY* como el factor determinante testicular es sólida, la observación de que algunas alteraciones de la diferenciación sexual no están ligadas al cromosoma Y, ha llevado a proponer que otros genes autosómicos y/o ligados al cromosoma X intervienen en el desarrollo gonadal, constituyéndose todos ellos como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (Torres-Lopez et al., 1996; Veitia et al., 2001).

SOX9

La proteína SOX9 es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación testicular. El gen SOX9 en el humano se localiza en el cromosoma 17 (bandas q24.1-q25.1), está formado por 3 exones y codifica para un factor de transcripción. El transcrito es de 4.3 kb y la región traducida está constituida por una proteína de 509 aminoácidos con un peso molecular de 56 kDa. En forma similar al gen *SRY*, SOX9 presenta un dominio de unión al ADN (caja HMG), pero a diferencia del mismo, presenta una región de 41 residuos (aminoácidos 339-379) formada totalmente de prolina, glutamina y alanina; dicha región actúa como un dominio de transactivación. El dominio HMG de SOX9 al igual que el *SRY*, reconoce secuencias consenso (AACAAAT, entre otras) y se une al ADN y lo dobla, activándose la transcripción de genes blanco (Mertin et al., 1999).

Los estudios llevados a cabo en murinos, demostraron que *Sox9* se expresa en la cresta genital de los machos pero no en la de las hembras. Los transcritos de *Sox9* pueden ser detectados en el linaje de las células de Sertoli del macho, entre

los 10.5 y 11.5 días pos coito en coincidencia con el tiempo en que el gen *Sry* alcanza su pico máximo de expresión. Con base en lo anterior, se ha sugerido que *Sry* pudiese regular directamente o indirectamente en forma positiva la expresión de *Sox9*. Esta expresión se observa sólo en los cordones sexuales a los 13.5 días pos coito y se mantiene en dichas estructuras durante el desarrollo testicular. En el humano, *SOX9* se expresa siguiendo un patrón similar al del ratón lo cual indica que *SOX9* desempeña un rol importante en la diferenciación y función de las células de Sertoli (Harley et al., 2003).

Las evidencias en la literatura apoyan que *SOX9* posee un rol determinante en la diferenciación gonadal, ya que se ha descrito que el 75% de los sujetos con displasia campomélica y mutaciones en *SOX9* presentan reversión sexual 46, XY. De igual forma en 1999, Huang et al., describieron un sujeto con síndrome de varón XX, el cual tenía duplicado el gen *SOX9* y era *SRY* negativo. Estos investigadores sugieren que la dosis extra del gen fue suficiente para iniciar la diferenciación testicular en ausencia del gen *SRY*. Asimismo, se ha descrito que *Sox9* es capaz de inducir el desarrollo testicular en ratones transgénicos XX (Vidal et al., 2000).

Con base en los antecedentes anteriores y de que alrededor del 20% de los sujetos con síndrome de varón XX (el cual se caracteriza por la presencia de testículos bilaterales en individuos con cariotipo 46,XX) y el 90% de los individuos hermafroditas verdaderos 46,XX (individuos que poseen tanto tejido ovárico como testicular, ya sea en gónadas separadas o formando un ovotestes), son *SRY* negativos, además de que existe la posibilidad de que ambas entidades patológicas, constituyen parte del espectro de la misma alteración; consideramos que la presencia de una doble dosis del gen *SOX9*, pudiera explicar el dimorfismo sexual que se presenta en ambas patologías (Jahrira et al., 2000).

DAX 1 (NR0B O DSS)

El gen *DAX1* pertenece a la superfamilia de receptores nucleares huérfanos, el cual se expresa en las glándulas suprarrenales, en las gónadas, en el núcleo ventromedial del hipotálamo y en los gonadotrófos de la hipófisis. El locus de este gen, se localiza dentro de una región mínima en el cromosoma X (Xp21), cuya duplicación da lugar a reversión sexual 46,XY en sujetos con un gen *SRY* intacto (reversión sexual sensible a dosis) (Achermann et al., 2001).

Este gen está constituido por dos exones y codifica para una proteína de 470 aminoácidos; su región C-terminal es similar a los dominios de unión al ligando de los receptores hormonales nucleares, sin embargo su región N-terminal presenta una estructura que no se observa en otros receptores nucleares. Dicha región está compuesta por tres repetidos de aminoácidos (secuencia LXXLL), los cuales probablemente permiten que lleve a cabo la interacción proteína-proteína. Este gen actúa en parte inhibiendo la transcripción de otros genes (incluyendo *SF1* y los receptores de estrógenos y andrógenos) (Holter et al., 2002).

El gen *Dax1/DAX1* se expresa en la cresta urogenital del ratón los 10.5 dpc y en el del humano a partir del día 33 posovulación (la cual es paralela a la expresión del gen *SF1*). En el ratón esta expresión se detecta en la gónada del macho hasta el 12 dpc y posteriormente disminuye en el testículo, pero continúa expresándose en el ovario. (Ikeda et al., 2001). Esta expresión dimórfica indica que *Dax1* desempeña un rol importante en la determinación sexual. Los estudios llevados a cabo en ratones XY nulos para *Dax1*, demostraron que éstos eran hipogonádicos e infértiles y presentaban alteraciones en la arquitectura testicular caracterizada por degeneración progresiva de los túbulos seminíferos, pérdida de las células germinales, hiperplasia de las células de Leydig y deficiencia de las células miodes

peritubulares ya que también presentan alteraciones en la morfología y peso de los testículos (el peso es por debajo de la mitad de los testículos de los ratones silvestres), así como alteraciones en la espermatogénesis, sugiriendo así que *Dax1* actúa en la regulación de la función testicular. Sin embargo en los ratones XX nulos para este gen, no se documentó alteraciones en los ovarios. Debido a esto, se postuló que *Dax1* desempeña un rol esencial en la diferenciación testicular (Jeffs et al., 2001; Meeks et al., 2003).

Se ha descrito en la literatura diversos casos de sujetos con reversión sexual 46, XY en los cuales se demostró la presencia de una duplicación parcial de Xp con un gen *SRY* intacto. Los sujetos afectados presentan un fenotipo heterogéneo que va desde ambigüedad de genitales hasta genitales externos femeninos. Con base en lo anterior, se postuló que la presencia de una doble dosis del locus *DDS* fue suficiente para impedir la diferenciación testicular. A diferencia de una sobreexpresión del gen, mutaciones en *DAX1* dan lugar a hipoplasia suprarrenal congénita asociado con hipogonadismo hipogonadotrópico, sin presencia de alteraciones en la arquitectura testicular (Sanlavielle et al., 2004).

SF1 (NR5 A1)

El gen *SF1* (homólogo al factor 1 *Fushi tarazu* [Ftz-F1] de la *Drosophila melanogaster*) es considerado un gen regulador maestro del sistema reproductivo, cuya función es esencial para la homeostasis endocrina en la vida posnatal. En el humano, este gen se localiza en el cromosoma 9q33 (Taketo et al., 1995), está formado por 7 exones y codifica para un receptor nuclear huérfano de 461 aminoácidos con un peso molecular de 52 KDa. El gen *SF1* presenta diferentes transcritos, que se forman por la presencia de promotores y sitios de procesamiento alternativo en el ARNm, que codifican diferentes proteínas con

diferentes funciones biológicas. La proteína SF1 está constituida por dos dedos de zinc, lo cuales conforman el dominio de unión al ADN, una caja A o caja FTZF1, una región de bisagra y un dominio con función de activación 2 (AF2). El primer dedo de zinc contiene una caja proximal (caja P) que le confiere especificidad en el reconocimiento del sitio de unión al ADN; la caja A o caja FTZFA estabiliza la unión monomérica al ADN y la región de bisagra y el dominio AF2 participan en la activación transcripcional (Parker et al., 1997).

En el ratón la expresión de *Sf1* precede a la expresión del *Sry* y se puede observar en la cresta urogenital de machos y hembras a partir del 9 dpc. Esta expresión se puede observar específicamente en los precursores de las células esteroideogénicas de las glándulas suprarrenales y de las gónadas (Ikeda et al., 1994). En el 12.5 dpc, en el cual ya se formaron los cordones testiculares, la expresión de *Sf1* persiste y se puede observar tanto en las células esteroideogénicas de Leydig como en los cordones testiculares. La expresión de *Sf1* en las células de Sertoli, indica que este gen tiene un rol en el desarrollo gonadal diferente a la regulación de la expresión de las enzimas esteroideogénicas. Asimismo, este gen tiene una expresión sexual dimórfica, es decir su expresión persiste en el testículo y desaparece en el ovario entre los 13.5 y 16.5 días pos coito (Ikeda et al., 1994).

En el humano, *SF1* se expresa siguiendo un patrón similar al del ratón, lo cual indica que este gen desempeña un rol importante en la diferenciación y función de las células de Sertoli. Durante la diferenciación gonadal, *Sf1* interactúa con diversos factores de transcripción involucrados en la diferenciación gonadal (WT1, SOX9 y DAX1) Los estudios llevados a cabo en ratones nulos homocigotos para *Sf1*, demostraron que éstos presentaban agenesia de glándulas suprarrenales y de

gónadas, reversión sexual XY, persistencia de estructuras Müllermanas, así como una disminución en la síntesis de gonadotropinas hipofisarias y ausencia del núcleo hipotalámico ventromedial. Sin embargo los ratones heterocigotos presentaban un fenotipo igual al de los ratones silvestres (Ozisik et al., 2002).

A diferencia de los ratones transgénicos heterocigotos para el gen *Sf1*, las mutaciones heterocigotas en el gen *SF1* en los humanos si dan lugar a alteraciones caracterizadas por insuficiencia suprarrenal y reversión sexual XY . Recientemente, dos grupos de investigadores diferentes describieron dos sujetos con disgenesia gonadal 46,XY sin insuficiencia suprarrenal; en ambos sujetos se demostró la presencia de mutaciones heterocigotas en el gen *SF1*. Con base en lo anterior podemos postular que el espectro fenotípico de las mutaciones en este gen es amplio (Achermann et al., 2002).

Con base en los antecedentes anteriores, consideramos que ambos genes (*WT1* y *SF1*) son candidatos para explicar el dimorfismo sexual que se presenta en los individuos con disgenesia gonadal pura 46, XY, es decir sujetos que presentan un cariotipo 46, XY y un fenotipo femenino con estrías gonadales bilaterales (en su forma completa) o un fenotipo ambiguo con testículos disgenéticos (Berkovitz et., 1991; Canto et al., 2003).

WT1

El gen *WT1* fue identificado originalmente como un gen supresor de tumor, que desempeña roles críticos en los diversos procesos del desarrollo durante la embriogénesis (Kreidberg et al., 1993; Herzer et al., 1999).

En el humano se encuentra localizado en el cromosoma 11p13, está formado por 10 exones que codifican para un factor de transcripción de 429 aminoácidos. El gen *WT1* tiene tres sitios de inicio de la transcripción que codifican diversas

proteínas nucleares, uno de los ARN se forma por un simple nucleótido que indica el inicio de la transcripción y los otros dos se forman por dos sitios de procesamiento alternativo en el ARNm: uno localizado en el exón 5 (el cual da lugar a la inserción de 51 nucleótidos que codifican para un segmento de 17 aminoácidos) y el otro localizado en el sitio donador del procesamiento alternativo al final del exón 9, lo que da lugar a la adición de tres aminoácidos (isoforma KTS), entre el 3er. y 4to. dedo de zinc (Haber et al., 1991; Bruening et al., 1996). Se han descrito cuatro isoformas principales de *WT1* de acuerdo al sitio de inicio de la transcripción y de los sitios de procesamiento alternativo en el ARNm: *WT1-A* (-exón 5/-KTS), la *WT1-B* (+exón 5/-KTS), la *WT1-C* (-exón 5/+KTS), la *WT1-D* (+exón5/+KTS), todas ellas con un peso molecular de 52-54 KDa (Haber et al., 1991). Todas las isoformas presentan cuatro dedos de zinc localizados en la región carboxilo-terminal (C-terminal) de la proteína, los cuales son el sitio de unión al ADN; así como dos dominios independientes de transactivación en su región amino-terminal (N-terminal), por lo que actúan como un activador o supresor transcripcional dependiendo del contexto cromosómico o celular (Rauscher et al., 1990; Wang et al., 1993; Larsson et al., 1995). De igual forma, la expresión de las isoformas +KTS/-KTS se mantiene en una proporción constante en todos los tejidos en los que se expresan, por lo que las alteraciones que modifican esta proporción pueden conducir a la presencia de patologías en el humano (Hammes et al., 2001).

Además de su función de gen supresor de tumor, el gen *WT1* desempeña un rol esencial en el desarrollo normal del sistema genitourinario. La expresión de *WT1* y de *SRY* se superpone durante la diferenciación gonadal temprana de las gónadas masculinas. En el ratón, el gen *Wt1* se expresa continuamente en las

células somáticas de las gónadas desde el día 9.5 poscoito, mientras que el gen *Sry* se expresa en forma transitoria en las mismas células desde el 10.5 al 12.5 dpc (Pelletier et al., 1991; Amstrong et al., 1993; Hacker et al., 1995).

En los humanos la expresión de *WT1* se detecta a partir del día 32 posovulación en la cresta gonadal tanto de los embriones masculinos como femeninos y esta expresión, se incrementa en el día 42 posovulación, a diferencia del *SRY*, el cual se expresa en forma importante en el día 44 posovulación (Hanley et al., 2000).

Se ha propuesto que *WT1* regula al gen *SRY*, las evidencias que apoyan lo anterior son las siguientes: 1) La presencia de mutaciones tanto en *WT1* como en el *SRY* dan lugar a reversión sexual 46, XY. 2) El patrón de expresión de *WT1* y *SRY* en la gónada se traslapan. 3) *WT1* puede regular en forma positiva el promotor del *SRY* al unirse a sus elementos *cis* 4) Asimismo, *WT1* puede en forma directa transactivar la expresión endógena del *SRY* en su contexto cromosómico nativo (Hossain et al., 2001).

Asimismo, la presencia de mutaciones específicas en el gen *WT1* pueden dar lugar a dos síndromes diferentes en el humano: el síndrome de Denys-Drash (caracterizado por esclerosis mensajial difusa, pseudohermafroditismo masculino y tumor de Wilm's) (Pelletier et al., 1991) y el síndrome de Fraiser. En este último síndrome los sujetos afectados pueden presentar esclerosis glomerular focal y reversión sexual 46,XY; sin embargo, se ha descrito un sujeto que solamente presenta reversión sexual 46,XY y otro sujeto con ambigüedad de genitales, sexo de asignación femenino sin alteraciones en el riñón. En el 2001, Hammes et al., generaron un modelo de ratones con síndrome de Frasier los cuales no producían dos isoformas de *Wt1*. Los ratones que no expresaban la isoforma KTS,

presentaron reversión sexual completa XY (fenotipo femenino y estrías gonadales), secundario a una importante reducción en la expresión del gen *Sry*. Con base en lo anterior, los autores postularon que WT1 sin la isoforma KTS (Wt1–KTS) y WT1 con la isoforma KTS (WT1+KTS), desempeñan funciones biológicas diferentes durante la determinación sexual. Esto confirma que el espectro fenotípico secundario a la presencia de mutaciones en el gen *WT1* es heterogéneo (Kohler et al., 2004).

WNT-4

Las proteínas Wnt son una familia de moléculas de señalización involucradas en múltiples procesos de desarrollo, incluida la gastrulación, formación de eje, polaridad celular, diferenciación de células madre embrionarias y desarrollo de órganos (Cadigan & Nusse, 1997). Existen dos tipos de proteínas Wnt (Du et al., 1995): las proteínas Wnt canónicas (Wnt1, Wnt3A y Wnt8) las cuales funcionan mediante un mecanismo molecular común y las proteínas Wnt no canónicas (Wnt4, Wnt5A y Wnt11) que funcionan a través de diversos mecanismos.

Los Wnt canónicos, cuyo prototipo es Wnt3A, desencadena una señal mediante β -catenina (Brembeck et al., 2005); en ausencia de señal, β -catenina citoplasmática es fosforilada por la cinasa de caseína I (CKI) por la cinasa de sintetasa de glucógeno 3 beta (GSK3 β), en esta forma fosforilada β -catenina es degradada por ubiquitinación. Cuando una proteína Wnt canónica se une al receptor Fzd/Lrp en la membrana celular, se inicia una cascada de eventos que concluye con la inactivación de GSK3 β . La forma no fosforilada (estable) de β -catenina se acumula en el núcleo, donde interactúa con Tcf/Lef para activar la transcripción de genes blanco (Gottardi & Gumbiner, 2004).

El gen *WNT-4* en el humano se localiza en el cromosoma 1, específicamente en la banda p35, está formado por 5 exones y codifica para una proteína de secreción de 351 aminoácidos con un peso molecular de 25 kDa (Jordan et al., 2001). Existen estudios *in vivo* e *in vitro* que demuestran que Wnt4 usa otras vías además de β -catenina. La transfección en células HEK293 con *Wnt4* muestra la activación de JNK, el cual es activado por Pax2 (Cai et al., 2002), recientemente se ha demostrado que Pax2 se une al promotor de *WNT4* y favorece la actividad

transcripcional de este gen durante la nefrogénesis (Torban et al., 2005). Aunado a esto, los conductos Mülllerianos y Wolfianos de los ratones $XX^{Pax2^{-/-}}$ y $XY^{Pax2^{-/-}}$ se desarrollan parcialmente y degeneran durante la embriogénesis. El fenotipo de los conductos Mülllerianos en $Pax2^{-/-}$ es similar al fenotipo observado en $Wnt4^{-/-}$. La vía de activación JNK dependiente de Wnt4, ha sido descrita *in vitro* en la transformación mesénquima-epitelio en células progenitoras de riñón (Osafune et al., 2006). Otro mecanismo de acción de Wnt4 independiente de β -catenina puede ser la unión con el receptor Frizzled 6 (Fzd6); (Lyons et al., 2004). Fzd6 activa la cinasa de la proteína C sensible a calcio (Pkc), la cinasa II de la proteína dependiente de calmodulina (CamkII) y la cinasa activadora de TGF β – cinasa 1 nemo like (Tak1 – Nlk), esta activación conduce a la inactivación de la vía Wnt canónica (Kuhl et al., 2000). El hecho de que Wnt4 puede desencadenar diferentes respuestas en distintos tipos celulares, refleja una tendencia general en nuestra comprensión de la señalización Wnt4: la respuesta a un estímulo dado no sólo depende del tipo de proteína Wnt presente, sino también en cual de los receptores afines se expresa en la membrana celular. Además se ha descrito Wnt4 puede afectar los niveles de β -catenina en el citoplasma, núcleo y en la membrana celular. No se conoce con claridad como se lleva a cabo la regulación entre Wnt4 y β -catenina en el desarrollo gonadal, se ha demostrado que β -catenina y Sf1 interactúan físicamente, lo que provoca una actividad sinérgica que conduce a la activación de genes involucrados en la diferenciación gonadal como el receptor tipo II de la sustancia inhibidora de conductos Mülllerianos (*MISRII*, Hossain & Saunders, 2003), *Dax1* (Mizusaki et al., 2003), *Inhibina α* (Gummow et al., 2003) y otras enzimas involucradas en la esteroidogénesis (Jordan et al., 2003). También se ha propuesto que Wnt4 puede reclutar β -catenina, impidiendo su unión con el

promotor *StAR* (Proteína reguladora de la esteroidogénesis) y la consecuente inhibición de esteroidogénesis, principalmente la síntesis de testosterona en la gónada femenina.

Existen diversos estudios de la participación de *Wnt4* en la diferenciación gonadal en modelos murino. La gónada del ratón se diferencia a partir del día 11 poscoito, por lo que *Wnt4* se expresa en ese momento en el mesénquima de la gónada indiferenciada de ambos sexos y en el mesonéfricos, pero esta expresión se encuentra ausente en los túbulos mesonéfricos y en los conductos Wolffianos. Al iniciarse la diferenciación sexo específica de la gónada (alrededor del 11.5 dpc), la expresión de *Wnt4* se encuentra regulada en forma negativa en la gónada masculina, pero se mantiene en el ovario en desarrollo. Lo anterior indica que *Wnt4* pudiese regular, en forma negativa, el camino de la diferenciación masculina y sugiere que desempeña un rol importante en el desarrollo del ovario (Vainio et al., 1999).

Vainio y cols.,(1999) demostraron en ratones XX, que la delección homocigota del gen *Wnt4* conduce a una masculinización caracterizada por fenotipo gonadal masculino, ausencia de derivados Mülllerianos y diferenciación de los conductos Wolffianos; así como una activación ectópica en el ovario de los genes que codifican para las enzimas que intervienen en el biosíntesis de la testosterona. Con base en lo anterior, los autores proponen que la interrupción de la señal de *Wnt4* está asociada con el inicio de la biosíntesis de esteroides, dándose lugar a la masculinización de la gónada XX. Asimismo, Jeays-Ward et al., (2003) observaron que las gónadas en desarrollo de los ratones $XX^{Wnt4^{-/-}}$ presentaban células endoteliales y esteroidogénicas y como consecuencia la formación de vasos sanguíneos específicos

del macho, los cuales son necesarios para el transporte de testosterona y para dar lugar al fenotipo masculino.

Posteriormente, Jordan et al., (2003) estudiaron ratones transgénicos machos XY y observaron que la sobreexpresión de *Wnt4* se traducían en una desorganización de la vasculatura testicular, así como en una disminución tanto de la testosterona sérica como de la proteína reguladora de la esteroidogénesis. Por otra parte, Jeays-Ward et al., (2004) demostraron en dichos ratones un defecto tanto en la diferenciación de las células de Sertoli como en las células de Leydig. Con base en las evidencias anteriores, se puede postular que *Wnt4/WNT4* desempeña un papel importante en el desarrollo celular y molecular de la gónada masculina mediante un mecanismo que aun no se ha dilucidado con precisión.

JUSTIFICACION

De acuerdo con los estudios recientes existen diversas evidencias que apoyan que el destino morfológico de la gónada indiferenciada depende de un delicado equilibrio entre genes que promueven o inhiben el desarrollo testicular, constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (Swain et al.,1999; Jordan et al., 2003). Actualmente, no se conoce con certeza cómo el gen *SRY* inicia el programa de expresión de genes requeridos para comprometer el desarrollo de la gónada bipotencial hacia testículo; además, no se han identificado corriente abajo de la cascada de la diferenciación sexual, genes blanco sobre los cuales *SRY* pueda ejercer su función para promover la diferenciación testicular (Harley et al., 2003).

Uno de los genes autosómicos propuestos es *WNT4* (Sim et al., 2002). Las investigaciones llevadas a cabo en ratones $XX^{Wnt4-/-}$ han demostrado que la ausencia de *Wnt4* conduce a la masculinización de dichos ratones (Vainio et al.,1999) y la sobreexpresión de este gen en ratones XY da lugar a una desorganización de la vasculatura testicular, a una disminución tanto de la testosterona sérica como de la proteína reguladora de la esteroidogénesis, así como un defecto tanto en la diferenciación de células de Sertoli como de células de Leydig (Jordan et al., 2003; Jeays-Ward et al., 2004). Asimismo, se describió en la literatura un sujeto con disgenesia gonadal 46,XY con una duplicación del gen *WNT4*, en el cual se postula que esta doble dosis, posiblemente impidió la diferenciación de la gónada hacia testículo (Jordan et al.,2001).

Jeays-Ward et al.,(2004) proponen que *WNT4* es una proteína involucrada en la diferenciación gonadal de los mamíferos y de que ésta actúa “corriente abajo” al gen *Sry* pero “corriente arriba” a los genes *Sox9* y *Dhh* (ambos genes

involucrados en la diferenciación testicular). Por otra parte, Sim et al., (2002) describieron la secuencia del promotor de *WNT4*, en el cual se puede observar una secuencia consenso que puede ser reconocida por el factor de transcripción SRY, de tal forma, la posible unión del SRY a esta secuencia consenso, pudiera regular la expresión de *WNT4*.

Hasta el momento no existen estudios que demuestren esta función de regulación, el demostrar que el SRY regula la expresión de *WNT4*, determinaría bases importantes en los mecanismos involucrados en la diferenciación gonadal masculina.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación del factor de transcripción SRY sobre la expresión del promotor del gen *WNT-4*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

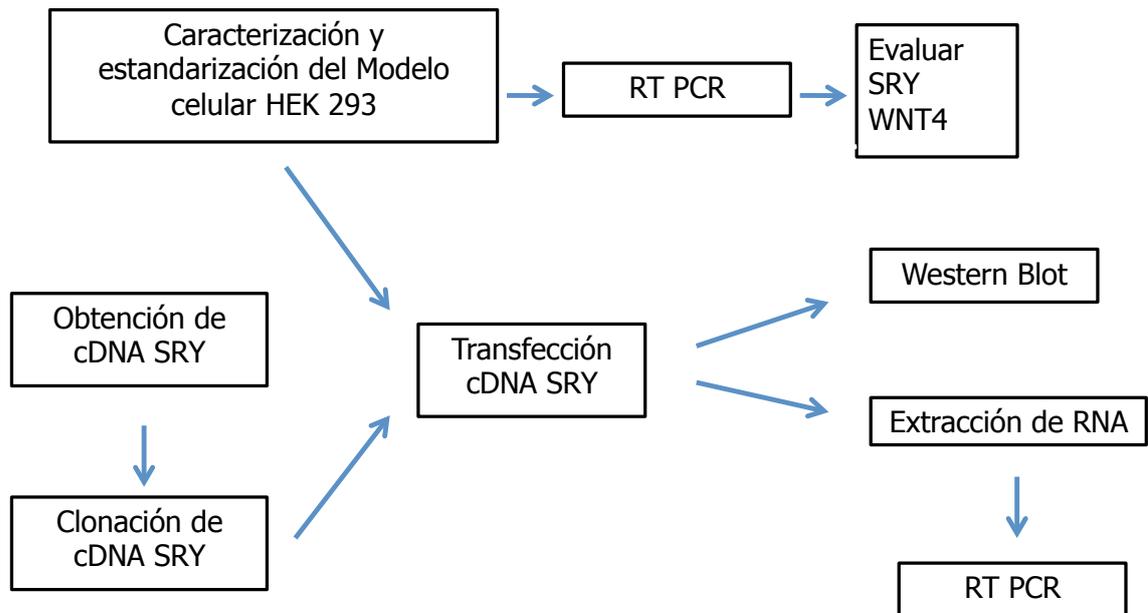
- Clonar el factor de transcripción SRY en un vector de expresión.
- Desarrollar cultivo celular HEK293 (Human Embryonic Kidney 293)
- Realizar la transfección con la construcción molecular que incluye el factor de transcripción SRY en las células HEK293
- Demostrar la presencia de la proteína SRY en células HEK293 transfectadas
- Realizar la extracción de RNA de las células HEK293 transfectadas y analizar los niveles de mRNA de WNT4

HIPÓTESIS

El factor de transcripción SRY regula la expresión del promotor del gen *WNT4*.

MATERIAL Y METODOS

Metodología propuesta.



CONSTRUCCION MOLECULAR Y VERIFICACION DEL PRODUCTO

CONSTRUCCION MOLECULAR CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN SRY

Inicialmente se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la región codificante del gen *SRY* (GENE ID6736), debido que este consta de un solo exón se obtuvo ADN genómico de linfocitos de sangre de un individuo masculino control. La PCR se realizó con los siguientes oligonucleótidos:

SRY5' sentido: 5'GCGCCTCGAGGCCGCCATGCAATCATATGCTTCTGC3'

SRY3' antisentido: 5' GCGGCCGCCAGCTTTGTCCAGTGGCTGTA 3'

Adicionalmente al oligonucleótido sentido se le inserto la secuencia consenso que reconoce el sitio múltiple de clonación del vector pTARGET(Promega) correspondiente a la enzima de restricción *XhoI*. Por otra parte al oligonucleótido antisentido se le agrego la secuencia que reconoce el sitio múltiple de clonación de pTARGET (Promega) correspondiente a la enzima de restricción *NotI*. Las condiciones de PCR fueron las siguiente: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de amplificación con los siguientes pasos: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 57.5°C y 30 segundos de polimerización a 72°C, una extensión final de 72°C durante 5 minutos; la mezcla de reacción se preparó con 50ng de ADN genómico, buffer 1X, MgCl 1.5mM , 2.5mM, oligonucleótidos, 1U de *Taq* DNA polimerasa(Invitrogen). El producto único de amplificación fue separado en un gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio; posteriormente se purificó el fragmento por columna (Promega) y se preparó para ser secuenciado (BigDye® Terminator v3 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del proveedor. De esta manera se pudo comprobar que la secuencia

del fragmento obtenido del *SRY* corresponde con la secuencia reportada en el banco de genes.

Una vez obtenido el producto de la amplificación, este fue subclonado en el vector pTARGET(Promega) el cual es un vector de expresión para productos de la PCR que presenta el promotor de citomegalovirus (CMV), así como el gen de resistencia para ampicilina y neomicina. Una vez clonado el producto se sometió a tratamiento con 1 µl de la enzima de restricción *EcoRI* (10,000 U/ml), 2.5 µl del amortiguador óptimo para la enzima NEBuffer 1 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9) y 1 µg de ADN plasmídico. Las reacciones se incubaron a 37°C de 16-20 horas. Posteriormente, para verificar la separación del gen *SRY* y el plásmido, los productos de cada reacción fueron nuevamente analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y teñidos con bromuro de etidio al 0.002%. En todos los casos, se incluyó un marcador de peso molecular, para corroborar el peso del inserto y del plásmido así como una muestra de ADN plasmídico sin enzimas de restricción (control).

Para verificar la secuencia del gen *SRY*, nuevamente se llevó a cabo la secuenciación del mismo con un estuche comercial (BigDyeTM, terminator cycle sequencing ready reaction kit de PE Biosystems) siguiendo las instrucciones del proveedor, así como las condiciones dadas por el mismo. Las reacciones fueron analizadas en un secuenciador automático ABI-PRISM 377®. Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a realizar su análisis por BLAST y se comprobó que la identidad y la integridad de la secuencia que se obtuvo fuera igual al gen *SRY* descrito en el banco de genes. De esta manera se realizó y verificó la construcción molecular pTARGET-SRY.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES POR CHOQUE TÉRMICO

El gen *SRY* fue clonado en el vector de expresión pTARGET(Promega) unidireccionalmente entre los sitios *Xho I*, (rio arriba) y *Not I* (rio abajo). Se procedió a la transformación en células competentes *E. coli* DH5 α de la siguiente forma: en 10 tubos de 1.5 ml que contenían cada uno 100 μ l de células competentes (DH5 α), se adicionó a cada uno de 50 a 100 ng de la construcción molecular pTARGET-SRY, los tubos se dejaron incubando por 10 min en hielo con agitación suave cada 30 seg. Al finalizar la incubación, los tubos se colocaron en baño de agua a 42°C/45 seg (período crítico para el rendimiento de las reacciones), e inmediatamente se colocaron los tubos en hielo por 2 min, a cada tubo se agregó 1 ml de medio Luria Bertani (LB) sin antibiótico y se incubaron durante 1.5 h a 37°C con agitación de 350 revoluciones por minuto (rpm). Cuando finalizó la incubación, se transfirió el contenido de cada tubo a tubos nuevos para ser centrifugados por un tiempo de 5 min a 4000 rpm, a continuación se retiró el sobrenadante y se dejó en cada tubo, aproximadamente de 100 a 200 μ l (con ese volumen se resuspendió el botón).

Por último se sembraron 100 μ l de células competentes (botón) por cada caja Petri, que contenían cada una, LB agar con 100 μ g/ml de ampicilina; con el fin de que crecieran las células se dejaron las cajas Petri en incubación a 37°C toda la noche (Sambrook & Russel, 2001).

Debido a que el vector pTARGET presenta el gen de resistencia a la ampicilina, las clonas resistentes a dicho antibiótico fueron purificadas en nuevas placas de cultivo para eliminar a las no portadoras de los plásmidos (segunda siembra) en nuevas cajas Petri que contenían LB agar con 100 μ g/ml de ampicilina (Sambrook y Russel, 2001).

EXTRACCION DE ADN PLASMIDICO

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó un estuche comercial (PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits) siguiendo las indicaciones del proveedor. Con la finalidad de continuar creciendo una colonia de las células transformadas se procedió a colocar en un matraz 20 ml de medio LB con ampicilina (se utilizaron 4 matraces de 50 ml) y se dejó incubando a 37°C s con agitación de 250 rpm por 16 horas. Posteriormente, el cultivo celular fue transferido a 4 tubos de 50 ml cada uno, se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min y al finalizar se procedió a retirar el sobrenadante dejando únicamente el botón. Después se adicionaron 4 ml del amortiguador R3 con amortiguador de resuspensión de RNAasa A, (Tris-HCl 50 mM; pH 8.0; EDTA10mM) hasta que se obtuvo un botón completamente homogenizado. El cultivo celular homogéneo se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml y se le adicionó 4 ml del amortiguador de lisis L7 (NaOH 0.2 M y SDS al 1%), los tubos se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min; a continuación, a cada tubo se le agregó 4 ml del amortiguador de precipitación N3 (acetato de potasio 3.1 M, pH 5.5) e inmediatamente se mezclaron por inversión hasta obtener una mezcla homogénea, se procedió a centrifugar los tubos a 12000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Previamente, a todo el procedimiento anterior, con la finalidad de equilibrar las columnas, se procedió a montar la columna por cada tubo, para la purificación del ADN plasmídico, adicionándole 10 ml del amortiguador de equilibrio EQ1 (acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.6 M, Triton® 100X al 0.15%, pH 5.0).

Posteriormente, se cargó el sobrenadante en la columna ya equilibrada (una columna por cada tubo) y el contenido comenzó a drenar por gravedad a un tubo nuevo de 15 ml. Durante el transcurso de este paso, a cada columna se le agregó 10 ml, dos

veces el amortiguador de lavado W8 (acetato de sodio 0.1 M, NaCl 825 mM, pH 5.0) y al termino de este procedimiento, se retiraron los tubos donde se drenó la solución y se cambio nuevamente a tubos nuevos, colocándolos por debajo de cada columna. Con el fin de eluir el ADN, a cada columna se le agregó 5 ml del amortiguador de elución E4 (Tris-HCl 00 mM; pH 8.5; NaCl 1.25 M), se procedió a recuperar el ADN en tubos de 15 ml, se agregó a cada tubo, 3.5 ml de isopropanol y los tubos se centrifugaron a 4°C/3min/15000 rpm. Una vez finalizado lo anterior se retiró el sobrenadante y se recuperó el botón de cada tubo. A continuación se resuspendió el botón en 3 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos y nuevamente se retiró el sobrenadante de cada tubo y se procedió a secar el botón de cada uno de los tubos a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente el ADN plasmídico (botón) se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 0.1 mM).

CUANTIFICACIÓN, VERIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL ADN PLASMIDICO

La cuantificación del ADN plasmídico se llevo a cabo por espectofotometría (Aenor ND -3300 Nanodrop ®) y la verificación e integridad de los productos de cada reacción fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etíidio.

CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN

CULTIVO CELULAR

La línea celular HEK293 derivada de riñón de embrión humano (ATCC 1573) fue mantenida en cajas Petri de 5 centímetros de diámetro con medio DMEM adicionado con 1.5% de antibiótico/antimicótico (Gibco) y suplementado con

suero fetal bovino a una concentración final de 10%. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C en presencia de CO₂ al 5%.

CONTEO DE CÉLULAS HEK293

Cuando las células alcanzaron una confluencia de 85% se añadió 3ml de tripsina a cada caja Petri y se centrifugó 3 minutos a 2500 rpm se tomaron 15µl de células (botón) que se obtuvo después de la centrifugación y que habían sido resuspendidas en 4 ml de medio DMEM suplementado, se colocaron en cada canal superior e inferior de la cámara de Neubauer, se les colocó un cubre objetos y posteriormente se procedió al conteo celular de cada cuadrante de la cámara, empleando un microscopio de campo claro para el conteo. Para obtener el número y volumen correcto de células que debieron ser sembradas, se utilizó la siguiente fórmula: *Número de células por ml = El promedio del No. de células de cada cuadrante (4) X 10,000*

Después de obtener el cálculo óptimo, se sembraron en cajas Corning® de 6 pozos (2.5 centímetros de diámetro). por duplicado 150,000 células cada pozo a 37°C para los tiempos de extracción correspondientes a 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 y 48 horas con CO₂ al 5%.

TRANSFECCION DE CELULAS HEK293

Al concluir las 24 horas en medio de crecimiento, se procedió a la transfección de la construcción pTARGET-SRY en la línea celular HEK293, de la siguiente manera: para cada pozo, en un tubo de 0.5ml se adicionó 100 µl de medio DMEM (sin suplementar), 4 µl de lipofectamina™2000 y 1 µg de ADN, la reacción se homogenizó suavemente y se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente dentro de la campana del cuarto de cultivo. Para las reacciones que contenían los controles, no se les adicionó el ADN (1 µg). Durante este periodo de incubación, a

cada pozo de las cajas de cultivo se les retiro el medio DMEM suplementado con SFB al 10% y se les substituyo por 1 ml de medio DMEM sin suplementar con antibiótico-antimicótico al 1.25%. Posteriormente, a cada pozo se adicionó por goteo suave (del “stock” que se preparo previamente en los tubos de 0.5 ml) los 106 μ l del volumen total de la reacción. Después que se sembraron todos los pozos, las cajas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% por un período de 5 horas, siempre observando al microscopio, que las células no presentaran alteraciones en su morfología por parte de la lipofectamina; posterior a este tiempo, se le retiró el medio DMEM sin suplementar y se le adicionó 1 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1.25%, se procedió a incubar las cajas a 37°C y se realizó la extracción de RNA en los tiempos indicados (1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas) así como extracción de proteínas nucleares y citoplasmáticos a las 48 horas.

EXTRACCION DE RNA Y TRANSCRIPCION INVERSA ACOPLADA A PCR

EXTRACCION DE RNA

Para la obtención del mRNA) de *WNT4* se purificó RNA total de las células transfectadas utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor:

Se agregó 1 ml de Trizol a cada pozo y se homogenizó con agitación de 20 a 40 seg. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5ml previamente enfriado. Se agregaron 200 μ l de cloroformo frío, se agitó durante 15 seg e incubó en hielo durante 5 min. Nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C, al finalizar se recuperó la fase acuosa y se en un tubo nuevo de 1.5ml frío y agregó 500 μ l de isopropanol para precipitar el RNA. Se incubó a -70 °C durante 30 min. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4°C. Una vez concluido se procedió a

extraer y desechar el sobrenadante (cuidado de no tocar el botón de RNA que se encuentra precipitado al fondo).

Se procedió a realizar lavados con 1 ml de etanol al 70% en H₂O DEPC, centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y posteriormente se decantó el etanol y se dejó secar el RNA durante unos 10 min aproximadamente a temperatura ambiente. Por último se resuspendió en 30 µl de H₂O DEPC, se reservó 5 µl para cuantificar y correr un gel de integridad. Almacenar a -70 °C.

La concentración y pureza del ARN fueron determinadas por medición espectrofotométrica 260/280nm.

TRANSCRIPCIÓN INVERSA ACOPLADA A PCR

Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR con 3 µg de ARN total, hexámeros (50ng/µl), RT buffer (Tris HCl 200mM; pH8.4; KCl 500mM), MgCl₂ 25mM, DTT 0.1M, dNTP mix 10mM, Superscript™ RT (200U/µl), RNaseOUT™ (40U/µl), *E. Coli* RNase H (2U/µl) DEPC treated water (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las condiciones que se usaron en el termociclador fueron las siguientes: 65°C por 5 minutos, pausa, se colocó en hielo durante 1 minuto, se agregó 10 µl del mix para síntesis de cDNA, posteriormente se pusieron las muestras a 25°C por 10 minutos, seguidos de una temperatura de 50°C por 50 minutos, 85°C por 5 minutos, pausa y se procedió a agregar 1 µl de RNase H a 37°C por 20 minutos.

Las secuencias de los oligonucleótidos específicos para la amplificación del mRNA de WNT4 fue la siguiente:

WNT4 sentido 5'GTCAGGATGCTCTGACAACA3'

WNT4 antisentido 5'TCTTTACCTCACAGGAGCCT3'

El mRNA de GAPDH se amplificó como control endógeno usando los siguientes oligonucleótidos:

GAPDH sentido 5´ATCCCATCACCATCTTCCAG3´

GAPDH antisentido 5´TGTGGGTCATGAGTCCTTCCA3´.

Las condiciones de la PCR fueron las siguiente: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de amplificación con los siguientes pasos: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 57.5°C y 30 segundos de polimerización a 72°C, una extensión final de 72°C durante 5 minutos

DENSITOMETRIA

Sobre las bandas obtenidas para WNT4 y GAPDH en los geles de agarosa al 1% se hizo un análisis utilizando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/features.html>). Con los valores resultantes se obtuvo una proporción para realizar una gráfica respecto a la expresión de WNT4. De la misma manera se realizó el análisis para las bandas en el gel de agarosa al 1% correspondientes para SRY con el objetivo de verificar la presencia en las células transfectadas.

WESTERN BLOT

SÍNTESIS DE LA PROTEÍNAS SRY *IN VITRO*

Con el fin de llevar a cabo el proceso de transcripción/traducción de la proteína SRY para usarla como control positivo en el Western Blot se utilizó un estuche comercial (TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems de Promega) siguiendo las recomendaciones del proveedor; brevemente: para cada reacción se colocó en un tubo de 1.5ml, 40µl del Quick Master Mix TNT®, 1 µl de metionina (1mM), 0.5 µg de ADN plasmídico de la construcción molecular pTARGET-SRY y 6.5

µl de H₂O libre de nucleasas, para dar un volumen final de la reacción de 50 µl; todas las reacciones se realizaron a 4°C. Se utilizó como control la reacción con todos los reactivos mencionado anteriormente, excepto el ADN plasmídico. Posteriormente, todos los tubos que contenían cada construcción, así como sus controles, se incubaron en termociclador Biorad® a 30°C/90 min.

OBTENCION Y CUANTIFICACIÓN DE EXTRACTOS PROTEÍNICOS

EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA SRY.

Para la extracción de la proteína SRY, se utilizó un estuche comercial (NEPER® Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para cada caja de cultivo que contenían a las células HEK293 (6 pozos) que alcanzaron una confluencia de 80-90%, se procedió a remover el medio de cada pozo y se le adicionó 400 µl de la solución de lavado, posteriormente, a cada pozo se le adicionó 200 µl del amortiguador de permeabilización celular, se agitó la caja suavemente y se dejó incubar por 10 min a 4°C. A continuación a cada pozo se le adicionó 300 µl del amortiguador de extracción de proteína de membrana y con el fin de remover las células de los pozos, se procedió a incubar la caja por 30 min a 4°C con agitación a 450 rpm; una vez realizado lo anterior, se procedió a transferir las células de cada pozo a tubos de 1.5 ml, se centrifugaron a 13000 rpm por 20 min a 4°C, finalmente el sobrenadante de cada tubo (fracción de las proteínas de membrana) fue removido y transferido a tubos nuevos de 1.5ml, adicionalmente se procedió realizar alícuotas para su uso inmediato y el resto de las alícuotas fue almacenado a -70°C.

CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SRY POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se realizó una curva patrón con volúmenes variables de proteína albúmina sérica bovina desde 0 μ l hasta 13.5 μ l, con un volumen constante de reactivo de Bradford (Tabla 1). Las pruebas se realizaron por duplicado.

Tabla 1. Elementos para estandarización de la técnica de Bradford

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA [0.5mg/ml] Volumen en μ l	0	1.5	3	4.5	6	7.5	9	10.5	12	13.5
dd H ₂ O Volumen en μ l	400	398.5	397	395.5	394	392.5	391	389.5	388	386.5
Reactivo de Bradford (μ l)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Una vez obtenida la curva estándar, se procedió a sustituir la proteína albúmina sérica bovina por la proteína de nuestro interés (SRY), lo anterior fue con el fin de obtener la concentración, tanto de la proteína SRY obtenida de las células HEK293 como de la proteína SRY sintetizada por traducción-transcripción (TnT®).

IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA SRY EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

La identificación de la proteína SRY se realizó en 2 geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), uno al 13.5% correspondiente al gel de corrida y el otro al 5%, correspondiente al gel concentrador, ambos de 1.5 mm de grosor.

Cada gel de corrida fue elaborado con los siguientes reactivos: 4.5 ml de acrilamida/bis acrilamida (30%/8% peso/vol), 2.5 ml del amortiguador Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 100 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio al 10% peso/vol), 5 µl de TEMED (N,N,N',N'- tetrametiletilenediamina), 50 µl de persulfato de amonio (PSA) y 2.9 de ddH₂O a un volumen final de 10.5 ml. La parte concentradora de los geles se elaboró con los siguientes reactivos: 1.7 ml acrilamida/bis acrilamida (30%/8% peso/vol), 2.5 ml del amortiguador Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), 100 µl de SDS al 10% (peso/vol), 5 µl de TEMED, 50 µl de PSA y 5.7 ml de ddH₂O a un volumen final de 10.5 ml. Con el fin de ver la integridad de las proteínas, se corrieron 1µg de proteína con 3 µl del amortiguador de carga de proteína (Tris-HCl 1.5M, pH 6.8, glicerol al 8%, SDS al 10%, azul de bromofenol al 0.05%, β-mercaptoetanol y dd-H₂O) en cada pozo. Previo a realizar la electroforesis, todas las muestras se calentaron a 90-95° C por 5 min, y subsecuentemente, se cargaron las muestras en los geles de poliacrilamida en cada pozo del gel, los cuales ya se encontraban dentro de la cámara de electroforesis con el amortiguador de corrida al 1X (3g de Tris-base, 1.44g de glicina y 1 L de dd-H₂O), se procedió a ajustar el voltaje a la cámara de electroforesis a 80 volts durante 120 minutos

TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS A MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Con el fin de identificar a las proteínas de nuestro interés en una mezcla compleja de moléculas, se procedió a transferir a dichas proteínas de un medio gelificado a una membrana de nitrocelulosa para su análisis, de la siguiente manera: se cortaron dos membranas de nitrocelulosa a la medida del gel de poliacrilamida que fue de aproximadamente de 7.5 por 5.5 cm y se utilizaron 6 papeles filtro (Watman No 3) del mismo tamaño, las membranas fueron colocadas en el amortiguador de transferencia 1X por 10 min (3.03 g de Tris-base, 14.4 g de glicina, 200 ml de

metanol y 800 ml de dd-H₂O). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se retiraron de la cámara y se colocaron en el siguiente orden; cassette, fibra, dos papeles filtro (Watman No 3), gel, membrana, dos papeles filtro y nuevamente una fibra, después de esto se cuidó que no se formaran burbujas en la membrana y se cerró el cassette para que fuera montado en la cámara de transferencia, llenando toda la cámara con el amortiguador de transferencia al 1X (el cual se coloca a 4°C 60 minutos previamente) y se procedió a realizar la electroforesis con un voltaje de 300 mA durante 2.5 horas a 4°C. Subsecuentemente, se desmontaron los dos cassettes y se retiró la membrana de nitrocelulosa de cada uno, para teñirla con rojo de Ponceau (rojo de Ponceau al 2% y ácido acético al 1%) por 5 min, se enjuagaron con H₂O-dd para quitar el excedente de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente (todo esto se realizó por triplicado para cada gel).

BLOQUEO DE LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA

Una vez que se transfirieron las proteínas SRY en las membranas de nitrocelulosa, tanto las proteínas sintetizadas por transcripción-traducción *in vitro* (TNT®) así como la transfección de las construcciones moleculares en la línea celular HEK-293, se procedió a bloquear cada una de las membranas de la siguiente manera: se utilizó 20 ml de leche al 5% con PBS-Tween20 al 1X (8g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.5g de Na₂HPO₄· 7H₂O, K₂HPO₄ y 1ml de Tween20) durante 3 hrs con agitación constante a temperatura ambiente, finalizado el tiempo de bloqueo, se procedió a lavar la membrana con PBS-Tween20, en 4 ocasiones durante 10 min en agitación constante, todo lo anterior con la finalidad de eliminar el exceso de leche.

INCUBACIÓN DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIO Y SECUNDARIO

Una vez finalizado los cuatro lavados de cada membrana, se procedió a poner el anticuerpo primario policlonal contra la proteína SRY (Abcam®) el cual fue hecho en

conejo en una concentración 1:1000 1 μ l de anticuerpo SRY en 999 μ l de PBS-T colocados en un tubo de 1.5ml, se mezcló el tubo y se dejó a 4°C, se colocó la membrana en un contenedor y se le adicionó en cada carril de proteína transferida en la membrana de nitrocelulosa y se dejó incubar toda la noche en movimiento constante a 4°C. Posteriormente, se retiró la membrana del contenedor y se lavó con PBS-T durante 10 minutos a temperatura ambiente y movimiento constante en 4 ocasiones, se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario, a una concentración 1:15000, los cuales se colocaron en cada carril de proteína transferida a la membrana de nitrocelulosa y se dejó incubar durante 1.5 horas a temperatura ambiente con movimiento constante. Con el fin de quitar el excedente de anticuerpo secundario, se retiró la membrana del contenedor y se lavó con PBS-T durante 10 minutos con movimiento constante (se hicieron 4 lavados de 10 minutos), al término de los lavados se procedió a preparar cada una de las membranas de nitrocelulosa para su revelación con luminol y peroxidasa. Para cada membrana, se colocó un cassette, un acetato, de 12 x 15 cm, la membrana de nitrocelulosa, 100 μ l de luminol y peroxidasa por cada carril de proteína transferida en la membrana (50 μ l de solución A y 50 μ l de solución B), se selló la membrana con otro acetato, de las mismas dimensiones, y se procedió al revelado.

REVELADO EN PLACAS

Este proceso se llevó a cabo en el cuarto oscuro. Previamente se cortaron varias placas de revelado con una dimensión igual a la membrana de nitrocelulosa (7.5 x 5.5 cm), las cuales se utilizaron a diferentes tiempos de exposición con el luminol y peroxidasa; los tiempos que se manejaron en cuanto a exposición fueron 1, 5 y 10 min. Cada una de las placas se colocaron sobre el acetato (la membrana de nitrocelulosa quedó en la parte de en medio) y con el cassette cerrado. Una vez

finalizado el tiempo de exposición de cada placa, se retiraron del cassette y la placa se sumergió en solución reveladora durante 1 minuto en movimiento constante, se retiro el excedente de solución reveladora con dd-H₂O e inmediatamente se sumergió en solución fijadora durante 2 minutos; posteriormente, la placa se sumergió en dd-H₂O para retirar el excedente de solución fijadora y cada placa se dejó secar a temperatura ambiente. Para los diferentes tiempos que se manejaron en cuanto a exposición en el luminol peroxidasa, el procedimiento fue el mismo.

RESULTADOS

Los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la regulación de los genes que participan en la diferenciación gonadal en mamíferos mediante represión o expresión transcripcional han sido poco explorados. Lo anterior es muy importante si consideramos el hecho de que la regulación de los genes que participan en la diferenciación gonadal es crítica para el correcto desarrollo morfológico y funcional de la gónada tanto masculina como femenina. Así mismo y de acuerdo al reporte de Sim et al. (2002) en la que describe un sitio putativo para SRY decidimos analizar, si este factor de transcripción tiene una participación en la regulación de *WNT4*. En el humano la diferenciación gonadal se lleva alrededor de la sexta semana de desarrollo embrionario, por este motivo y por condiciones éticas decidimos trabajar con un modelo celular, la línea HEK293 (ATCC 1573) células humanas derivadas de riñón embrionario; resulta importante mencionar que no existe una línea celular derivada de gónadas que cumpliera con las características necesarias para nuestros objetivos.

CLONACION DEL FACTOR DE TRANSCRIPCION SRY EN pTARGET

De manera paralela a la estandarización y caracterización del cultivo celular, se llevó a cabo la clonación del gen *SRY* en el vector de expresión pTARGET. Mediante amplificación del producto de interés a partir de DNA genómico (solo tiene un exón) utilizando oligonucleótidos específicos flanqueados con secuencias consenso de enzimas de restricción presentes en el sitio múltiple de clonación del plásmido. El producto obtenido se verificó mediante amplificación por la PCR y secuenciación automatizada (Figura 4).

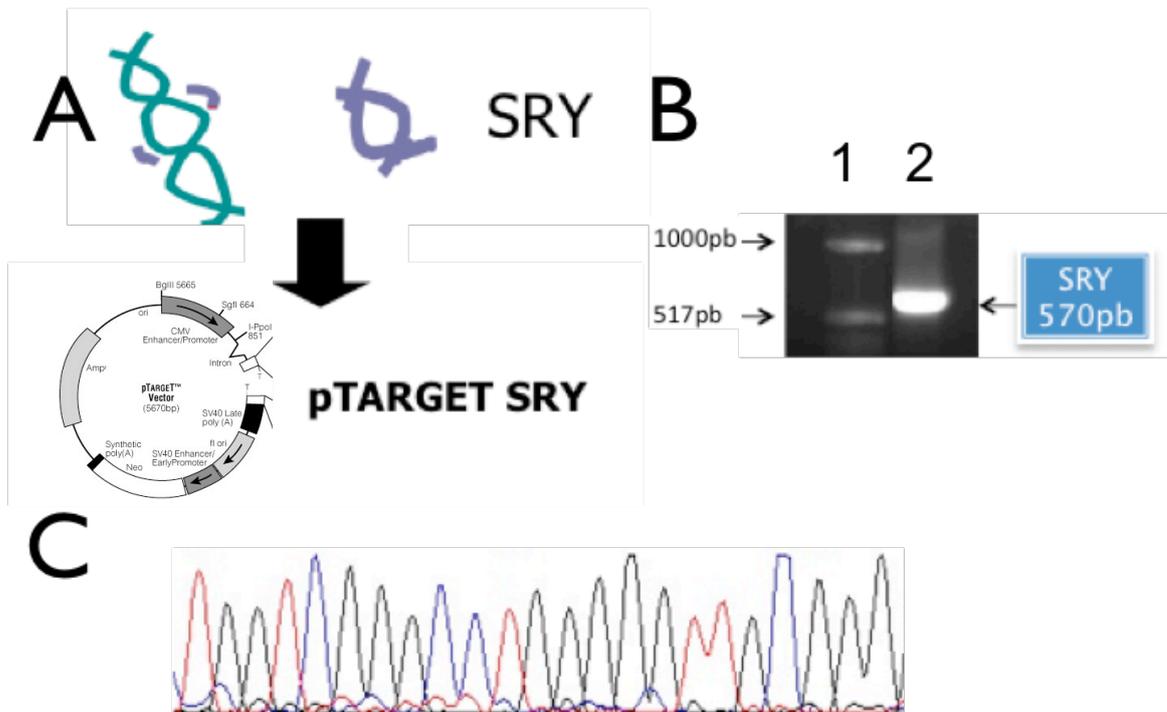


Figura 4. **A** Representación esquemática de la construcción molecular pTARGET-SRY. **B** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del producto de PCR correspondiente a *SRY*, usando como templado el DNA plasmídico, en el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular **C** Electroferograma de una región correspondiente a la secuenciación de *SRY*.

CULTIVO CELULAR

Una vez elegido el modelo celular se procedió a estandarizar las condiciones de cultivo con el medio de crecimiento correspondiente de acuerdo a las especificaciones descritas en metodología (Figura 3A). Posterior a la estandarización del cultivo celular, procedimos a caracterizarlo mediante análisis de *SRY* y *WNT4* mediante RT-PCR. En la figura 3 (panel B) se muestra la expresión en de los genes *WNT4* (carriles 2 y 3) que corresponden a *WNT4* a partir de RNA de células HEK293 y sangre (leucocitos) respectivamente. El gen *SRY* (carriles 4 y 5) que corresponde al RNA de células HEK293 (negativo) y RNA de leucocitos de un sujeto masculino (positivo). Con base en estos resultados podemos determinar que el modelo HEK293 no expresa *SRY* (es decir, es *SRY* negativo) pero si expresa *WNT4* (*WNT4* positivo). Estos resultados son muy importantes, ya que nos permite cumplir objetivo de demostrar que los cambios en la expresión de *WNT4*, probablemente son secundarios a la transfección con la construcción molecular que incluye el factor de transcripción *SRY* en este modelo celular (Figura 3B).

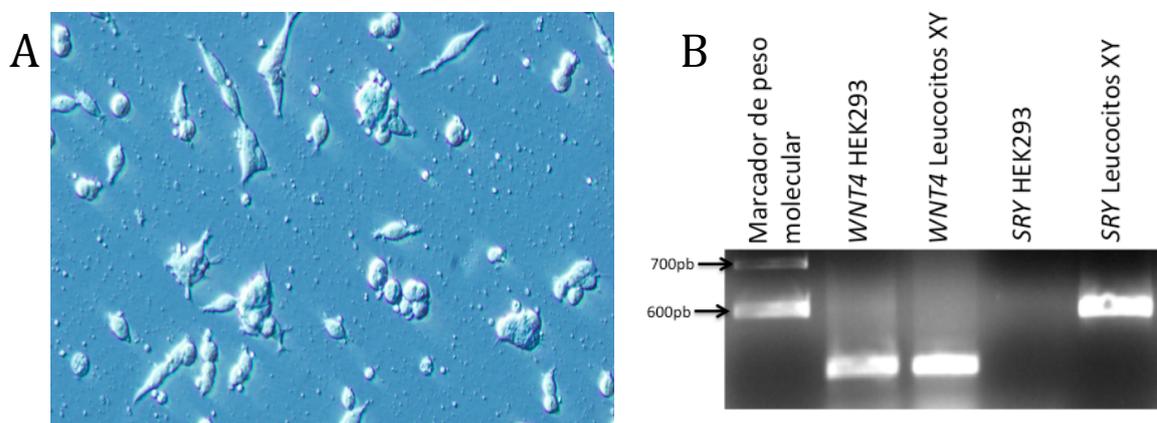


Figura 3. Estandarización y caracterización del cultivo celular. A Células HEK293 a las 24 horas de siembra. 40X. B Análisis de expresión mediante RT-PCR de los genes *WNT4* y *SRY* en HEK293 y leucocitos.

WESTERN BLOT

Por otra parte con el objetivo de verificar la presencia de la proteína SRY se realizó un WesternBlot (WB), para el cual se utilizan extractos nucleares de células HEK293 transfectadas y no transfectadas, así mismo se utilizó la proteína SRY obtenida por ensayo de transcripción traducción in vitro como control positivo (SRY TnT). La diferencia de intensidad entre la banda de SRY TnT y la banda SRY TRANSFECCION (+) se debe a que en el caso de la primera, solo hay proteína SRY mientras en la segunda son extractos nucleares totales de la cual solo una parte es SRY. Asimismo se presenta la banda correspondiente a la proteína nucleína, la cual se uso como control (Figura 7).

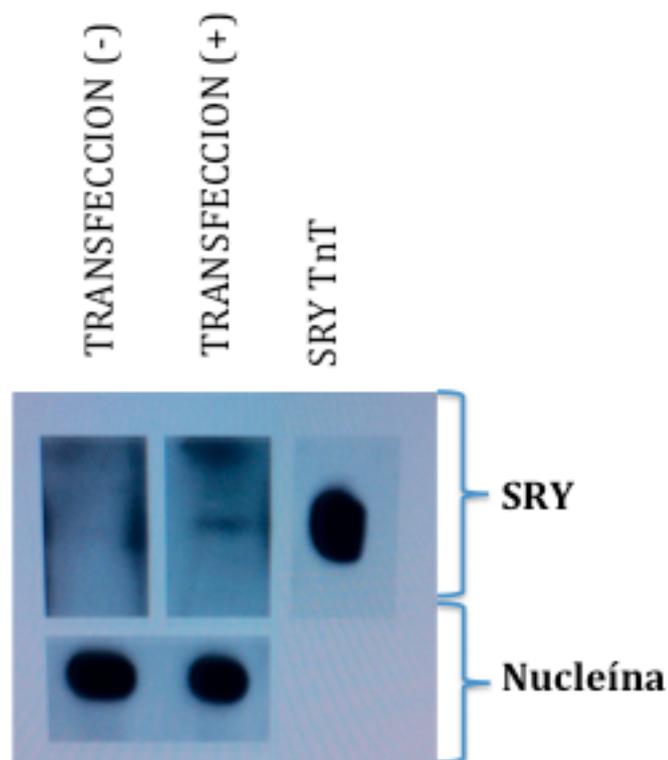


Figura 7. Western Blot de SRY a partir de extractos proteicos de células HEK293. En el primer carril se presenta el resultado de SRY en extractos proteicos de células HEK293 no transfectadas. En el segundo carril se presenta el resultado de SRY en extractos proteicos de células HEK293 transfectadas. En el tercer carril se presenta el resultado de SRY TnT como control positivo. En la parte inferior del primer y segundo carril se presentan los resultados de los controles (Nucleína).

TRANSFECCION, EXTRACCION DE RNA Y ANALISIS DE EXPRESION

Posterior a la clonación del factor de transcripción SRY, se realizó la transfección con la construcción pTARGET-SRY en el modelo celular HEK293. Se llevo a cabo la extracción de ácido ribonucleico (RNA) para evaluar los niveles del mensajero (mRNA), en diferentes tiempos (1 hora, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas), todos los experimentos se hicieron con los controles correspondientes (GAPDH y SRY). No observamos diferencias en la expresión de WNT4 en ninguno de los tiempos analizados tanto en los controles como en las células transfectadas (Figura 5).

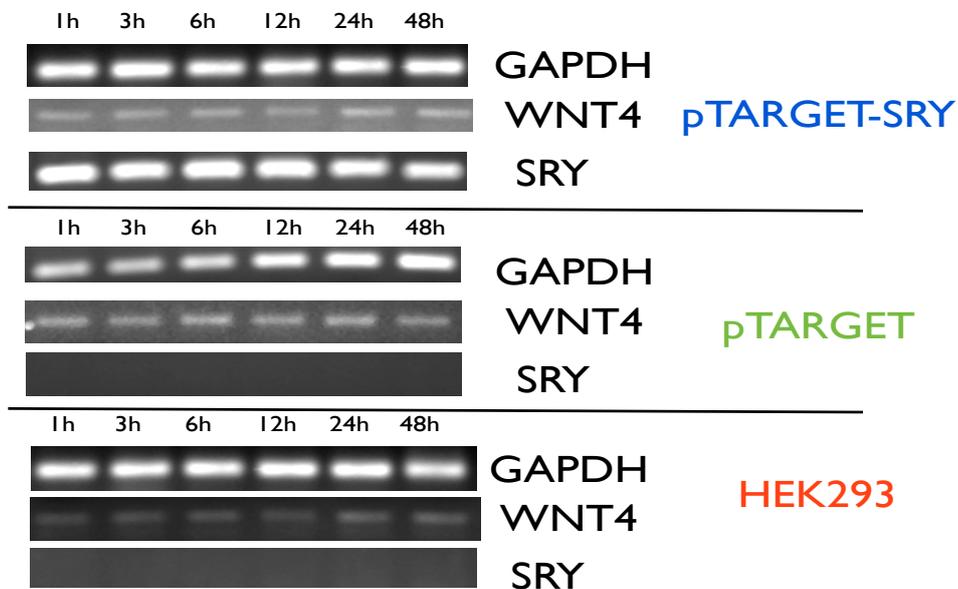
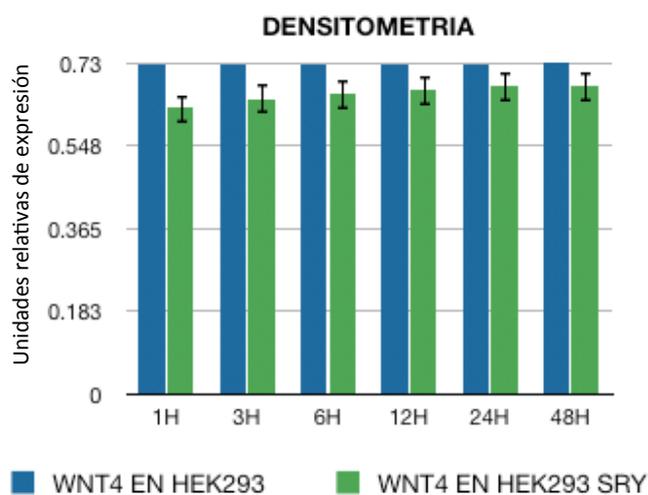


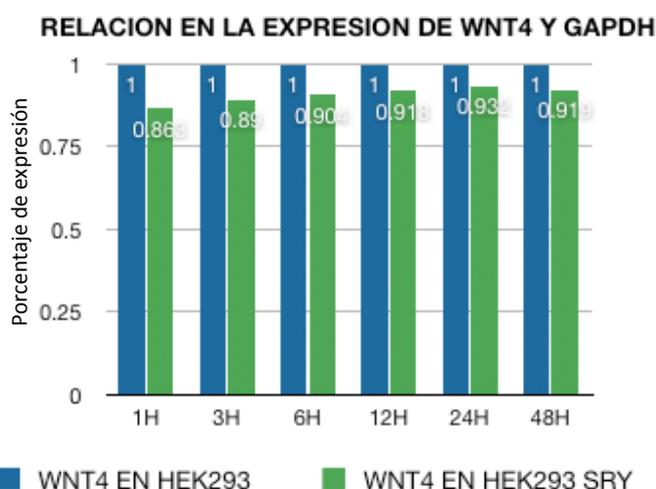
Figura 5: Análisis semicuantitativo de la expresión de los genes *WNT4*, *GAPDH* y *SRY* mediante RT-PCR, a partir de RNA obtenido de células HEK293 transfectadas.

DENSITOMETRIA

Una vez obtenidos los resultados, se procedió al análisis semicuantitativo por medio de análisis densitométrico utilizando el software ImageJ®. El valor obtenido correspondió a un área debajo de la curva, proporcional a la intensidad de la banda y por lo tanto a la concentración del mRNA en la muestra. Se muestran los niveles de expresión de WNT4/GAPDH en células HEK293(azul) y células HEK293 transfectadas con la construcción molecular pTARGET-SRY (verde). Las muestras se analizaron a 1h, 3h, 6, 12h, 24h y 48h. (Figura 6).



EXPRESION DE WNT4 EN HEK 293	EXPRESION DE WNT4 EN HEK 293 TRANSFECTADAS CON pTARGET SRY
0.73	0.63
0.73	0.65
0.73	0.66
0.73	0.67
0.73	0.68
0.74	0.68



EXPRESION DE WNT4 EN HEK 293	EXPRESION DE WNT4 EN HEK 293 TRANSFECTADAS CON pTARGET SRY
1	0.86
1	0.89
1	0.90
1	0.91
1	0.93
1	0.91

Figura 6. Análisis densitométrico de los niveles de expresión relativo a la señal de GAPDH usado como control endógeno.

DISCUSIÓN

El desarrollo de la gónada durante la embriogénesis es un evento único debido a la presencia de un precursor común, la gónada bipotencial. El sexo es determinado al momento de la fertilización por la presencia o ausencia del cromosoma Y (Goodfellow & Lovell-Badge, 1993) y del gen determinante del testículo presente en dicho cromosoma, el *SRY*, el cual inicia la cascada de eventos para el desarrollo testicular (Berta et al., 1990; Sinclair et al., 1990). En ausencia del *SRY*, la gónada bipotencial se diferencia en ovario. Después del inicio de la expresión del *SRY*, la gónada masculina produce hormonas que se encargan de la regresión de los conductos Mülllerianos (HIM) y del desarrollo de los conductos Wolffianos, estos últimos dan lugar a los genitales internos masculinos y también favorecen el descenso testicular. En el sexo femenino, la ausencia de hormonas testiculares provocara la regresión de conductos Wolffianos y el desarrollo de conductos Mülllerianos que dan lugar a los genitales internos femeninos (Brennan & Capel, 2004). Se han descrito mutaciones en genes “cascada arriba” o “cascada abajo” de la expresión del *SRY*, involucradas en la determinación del sexo y/o formación de genitales externos e internos. La mayoría de los genes descritos están involucrados en la gonadogénesis masculina, siendo algunos de ellos: *Wt1* (Pritchard-Jones et al., 1990), *Lhx9* (Birk et al., 2000), *Sf1* (Luo et al., 1994), *Gata4/Fog2* (Tevosian et al., 2002), *Sox9* (Foster et al., 1994), *SOX9* (Huang et al., 1999; Harley et al., 2003), *Dhh* (Clark et al., 2000), *DHH* (Canto et al., 2005), *Fgf9* (Colvin et al., 2001), *Dax 1* (Meeks, Weiss, & Jameson, 2003), *Pdgfra* (Brennan, Tilman, & Capel, 2003). Por otra parte existen genes que han sido relacionados con el desarrollo del ovario como: *Dax1* (Bardoni et al., 1994), *Stra8* (Koubiva et al., 2006) y *Rspo1* (Chassot et al., 2008).

Wnt4 desempeña un papel importante en la diferenciación sexual femenina (Vainio et al., 1999; Jeays-Ward et al., 2003; Kim et al., 2006; Ottolenghi et al., 2007); su expresión es dimórfica, es decir, se inhibe en la gónada masculina posterior al inicio del desarrollo testicular a los 11.5 días post coito (dpc), mientras que su expresión persiste en el desarrollo del ovario (Vainio et al., 1999).

Se sabe que existen modelos murinos con mutaciones homocigotas en *Wnt4* que presentan alteraciones en el desarrollo de los ovarios y dichos ovarios deficientes se masculinizan y expresan marcadores de células de Leydig y de Sertoli así como la secreción de T y HIM (Heikkila et al., 2001, 2005). En el caso de los pacientes con pérdida de la función del *WNT4*, se presentan alteraciones en el desarrollo gonadal similar al fenotipo que presentan los ratones nulos; Son parcialmente masculinizados, con características clínicas de amenorrea primaria, aumento en los niveles de andrógenos, regresión de los conductos Mullerianos y localización anormal de los ovarios (Biason-Lauber et al., 2004, 2007).

Las gónadas, tanto masculinas como femeninas tienen su origen embriológico en las células del mesonefros, de tal forma que estas células serían el modelo ideal para el estudio de la función de *WNT4*; sin embargo, por razones bioéticas en nuestro medio no contamos con líneas celulares genitales. Con base en lo anterior elegimos el modelo celular HEK293, el cual tiene un origen embriológico relacionado con el riñón ya que se desarrollan a partir de células metanefricas. Asimismo, existen diversos estudios que utilizan dicha línea celular con el fin de evaluar diversas características de *WNT4*. De acuerdo a nuestros resultado pudimos determinar que el cultivo celular HEK293 es *WNT4(+)* como se había demostrado previamente (Hongshi et al., 2009) y *SRY(-)*, es decir expresa *WNT4* pero no expresa *SRY* (Figura 4).

Wnt4 originalmente fue estudiado durante la nefrogénesis en el riñón metanéfrico. Los modelos murinos para este gen, presentaban falla renal que provoca la muerte (Stark, et al. 1994). Asimismo se observó que *Wnt4* se expresaba en mesonefros y en los conductos Mülllerianos, lo que evidencio su importante participación en la formación del sistema reproductivo de la hembra (Vainio et al., 1999). El análisis de este modelo murino mostró que la pérdida de *Wnt4* conduce a la masculinización de embriones XX (Vainio et al., 1999); lo que sugirió que el desarrollo de la gónada femenina no es un proceso automático en ausencia de *Sry*. La descripción inicial del ratón $XX^{Wnt4-/-}$ logró promover las investigaciones referentes a la función de *Wnt4* en la formación de conductos Wolffianos, migración de células endoteliales, estereidogénesis, desarrollo de ovocitos y diferenciación testicular.

Debido a que *WNT4* se expresa en las primeras etapas del desarrollo gonadal del humano, existen pocos estudios relacionados con la participación de este gen en la diferenciación gonadal (Vainio et al., 1999; Barrionuevo et al., 2006; Bernard & Harley, 2007), así como su regulación espacio tiempo especifica (Neff et al., 2005), por tal motivo, se propuso llevar a cabo los estudios de expresión a nivel de mRNA del *WNT4* mediante transfección con el factor de transcripción SRY (Sinclair et al., 1990; López et al., 1995; Koopman et al., 1990; 1991; Hacker et al., 1995; Cameron & Sinclair, 1995; Assumpcao et al., 2002).

A pesar de su importancia en el desarrollo embrionario, la regulación de *WNT4* no se ha determinado con precisión; el principal mecanismo por medio del cual se inicia la transcripción depende de la estructura del promotor y los correspondientes sitios de unión a factores de transcripción. Sim et al., (2002) describieron 1.2 Kb de la secuencia que flanquea la región 5' no traducida del gen

WNT4, en la cual identificaron diversos sitios de unión a factores de transcripción que posiblemente regulan este gen. Asimismo, se identificó la secuencia consenso AACAAAG, la cual reconoce el SRY y posiblemente otras proteínas SOX (proteínas con caja HMG relacionadas con el SRY). De tal forma los autores proponen que en esta secuencia de 1.2 kb, se encuentra el promotor basal del gen *WNT4*.

Cabe mencionar que hasta la fecha, todos los estudios de expresión del gen *WNT4* se han realizado en un contexto diferente a la gonadogénesis. Se han analizado factores de transcripción únicamente relacionados con nefrogénesis (Torban et al., 2006) y en el desarrollo de queratinocitos (Devgan et al., 2005).

En el presente estudio analizamos la participación del factor de transcripción SRY sobre la expresión del promotor del gen *WNT4*, utilizando el modelo celular HEK293 y llevamos a cabo mediciones de los niveles de mRNA en diferentes tiempos. Sin embargo no encontramos una expresión diferente entre los controles y las células HEK293 transfectadas. Debido a las implicaciones éticas involucradas en el estudio de la diferenciación gonadal en el humano elegimos este modelo de células HEK293 (Human Embryonic Kidney de origen embriológico relacionado con el riñón) el cual tiene la característica de expresar *WNT4*, así mismo se han utilizado estas células para caracterizar la expresión de *WNT4* (Hongshi et al., 2009; Osada et al., 2006)

Se ha descrito que la expresión de *WNT4* pudiera estar regulada por metilación Hongshi et al., (2009), llevó a cabo el análisis comparativo entre el promotor del humano y del walabi (miembro de la familia de los canguros) utilizando cultivos primarios derivados de pulmón y riñón en el walabi y en el modelo celular HEK293 de humano, demostrando la presencia de un módulo transcripcional conservado de 89pb con una homología del 97% entre estos

promotores. Por otra parte no identificó caja TATA en el dominio 5' del sitio del inicio de la transcripción y tampoco la secuencia CCAAT en la región proximal de promotor. Sin embargo, si encontró que, el promotor presenta un alto contenido de regiones CG e islas CpG, lo cual sugiere que otros mecanismos de regulación como la metilación del DNA y la remodelación de cromatina son necesarios para iniciar la transcripción del *WNT4*. Debido a que el alto contenido de CG e islas CpG son característicos de promotores que no presentan caja TATA (Carey & Smale, 2000) podemos hipotetizar que uno de los mecanismo de regulación para *WNT4* puede estar mediada en parte por metilación de DNA.

Otra posible explicación para nuestros resultados es que la regulación de *WNT4* puede estar guiada por otros factores de transcripción o bien mediante un efecto sinérgico entre varios factores. Una vez que se inicia la expresión de *Sry* en la gónada XY, ocurren múltiples cambios en la expresión de genes gonadales. El primer gen corriente abajo de *Sry*, es *Sox9* el cual codifica para un factor de transcripción involucrado en la diferenciación testicular (Morais da Silva et al., 1996; Argentaro et al., 2003). De acuerdo a los resultados de la figura 6 en la que se observan los porcentajes de expresión de *WNT4* (86% a 91%) en las células transfectadas en comparación con el control, proponemos que el factor de transcripción *SRY* inhibe la expresión del mRNA de *WNT4*, probablemente es necesario la acción sinérgica de *SRY* con otros factores de transcripción de la familia *SOX*.

Se ha propuesto que *Sry* estimula a *Sox9* y que a partir de este momento *Sox9* es el factor encargado de regular otros genes para continuar con la diferenciación gonadal masculina, existen múltiples evidencias de la participación de *SOX9* en la diferenciación testicular, algunas de ellas son las siguientes: se colocaliza con *Sry* en el núcleo de los precursores de las células de Sertoli a los 11.5 dpc,

consistente con la hipótesis de que Sox9 es regulado por Sry (Sekido et al., 2004). La inactivación de SOX9 en humanos y ratones da lugar a reversión sexual masculino-femenino (macho-hembra) (Barrionuevo et al., 2006; Charboissier et al., 2004; Foster et al., 1994). Por otra parte la duplicación de SOX9 (Huang, Wang, Ning, Lamb & Bartley, 1999) y la sobreexpresión de Sox9 lleva a cabo reversión sexual femenino-masculino (hembra– macho)(Qin & Bishop, 2005; Qin et al., 2004). Además de estas evidencias, el análisis de las gónadas XY^{Sox9^{-/-}} indica la expresión de *Wnt4* en los 12.5 dpc y 15.5 dpc a pesar de la presencia de Sry, demostrando que la inhibición de *Wnt4* en la gónada normal XY puede depender principalmente de Sox9 (Barrionuevo et al., 2006). La ausencia de expresión de Sox9 ha sido observada en otros modelos murinos nulos, como en *Fgfr9* (Colvin et al., 2001; Nef et al., 2003) y en el modelo *Ir/Igf1r/Irr* (Triple insuline receptor) sin embargo, en estos modelos no se analizó la expresión de *Wnt4*, lo que habría permitido evaluar si *Wnt4* es regulado de manera directa por Sox9. Por otra parte la ausencia de expresión de Sox9 en gónadas XY^{Fgf9^{-/-}} ocurre en 12.5 dpc pero no en 11.5 dpc,(el cual es un tiempo clave en la diferenciación de la gónada) lo que representa que Fgf9 es necesario para el mantenimiento de Sox9 pero no para su expresión inicial (Colvin et al., 2001; Dinapoli et al., 2006), esto resultados también demuestran que Fgf9 actúa corriente abajo de Sox9 y puede reprimir la expresión de *Wnt4*. En gónadas XY^{Fgf9^{-/-}} *Fst* se expresa de manera ectópica, lo que indica que estas gónadas están llevando a cabo la diferenciación a ovario, la expresión de *Fst* depende de la expresión de *Wnt4* (Yao et al., 2004) por lo que es probable que *Wnt4* también se encuentre expresado, sin embargo como se menciona previamente, estas evaluaciones aun no han sido realizadas.

Con base en estas evidencias, proponemos que SOX9 puede participar en la regulación de *WNT4*, nuestro grupo de investigación realizó análisis *in silico* de la secuencia del promotor de *WNT4*, encontrando una secuencia consenso que puede ser reconocida por SOX9 en la posición -1214 corriente arriba del ATG de inicio de la transcripción, además se ha demostrado que los sitios consenso para el factor de transcripción SRY puede ser reconocidos por los factores de la familia SOX (Mertin et al., 1999) y de que SRY y SOX9 presentan una homología del 70% en el dominio HMG (Marshall et al., 2000), el cual es el dominio que actúa como sitio de unión a secuencias específicas de DNA, probablemente SOX9 pudiera reconocer el sitio consenso localizado en el promotor de *WNT4* e intervenir en la expresión del mismo.

Posterior a la expresión de *Sox9* y *Fgf9*, existen varios genes candidatos para llevar a cabo la inhibición de *Wnt4* en la gónada masculina después de 11 dpc. Recientemente, se demostró que la proteína inhibidora de ciclina p21 en asociación con el factor de transcripción E2f1, se unen con elementos localizados en el promotor *Wnt4*, lo que reprime la expresión de *Wnt4* en queratinocitos (Devgan et al., 2005). E2f1 es un potente activador de la expresión de *Fgfr2*, que a su vez, es un receptor con gran afinidad por Fgf9 (Ornitz et al., 1996). Además Fgfr2 colocaliza con Sox9 en el núcleo de las células precursoras de células de Sertoli a los 11.5 dpc (Schmahl et al., 2004). Otros elementos propuestos en la regulación de *Wnt4* pueden ser los integrantes de la familia supresor de tumor p53, dos de estos miembros p63 y p73 son capaces de unirse y activar el promotor de *Wnt4* en células HEK293 (Osada et al., 2006).

Recientemente se ha descrito la asociación de SOX3 asociado a la reversión sexual en humanos y en modelos murinos. (Sutton et al., 2011), SOX3 al igual que SOX9 pertenece a la familia de las proteína SOX. SOX3 corresponde al

grupo SOXB1 y SOX9 corresponde al grupo SOXE (Bernard & Harley, 2010) y ambos presentan el dominio HMG. De acuerdo a los análisis realizados, el grado de similitud entre el dominio HMG que presenta SRY y la caja HMG que presenta SOX3 es mayor a la similitud entre SRY y SOX9 (Bergstrom et al., 2000; Sessa & Bianchi, 2007). Con base en estos antecedentes es necesario considerar la posible participación de SOX3 en la regulación de *WNT4*. (Figura 8)

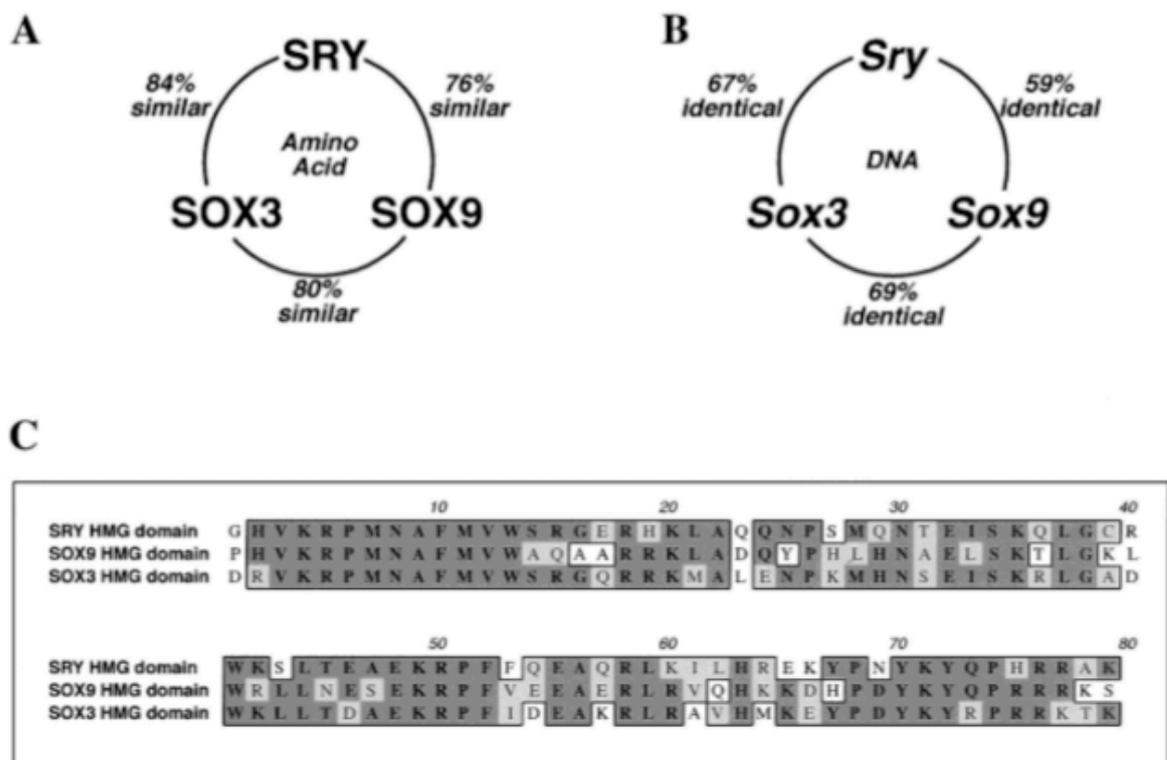


Figura 8. Dominio HMG de unión al DNA en ratón Sry, Sox3 y Sox9. La relación del dominio HMG definido por la similitud de aminoácidos (A), ácidos nucleicos (B). Alineamiento de aminoácidos del dominio HMG presente en SRY, SOX9 y SOX3. (Bergstrom et al.,2000)

Conforme a los estudios efectuados por Hongshi et al.,(2009) en los que realizaron construcciones moleculares las cuales incluían diversas regiones del promotor *WNT4* de diferentes tamaños correspondientes a: 1596pb (1494/+102), 1046pb (-1852/-807) y 883pb (-781/+102), en el caso de las dos primeras se presenta una actividad transcripcional disminuida, mientras que en la tercera, la que solo incluye la parte proximal del promotor, se encuentra aumentada, lo que sugiera la presencia de elementos represores de la actividad transcripcional en el

promotor *WNT4* entre -781 y -1852, estas conclusiones coinciden con el reporte de Sim et al.,(2002) en el que se encuentra el sitio consenso para SRY en -1034 y con el resultado del análisis *in silico* realizado por nuestro grupo de investigación para SOX9 en -1214 (Figura 9).

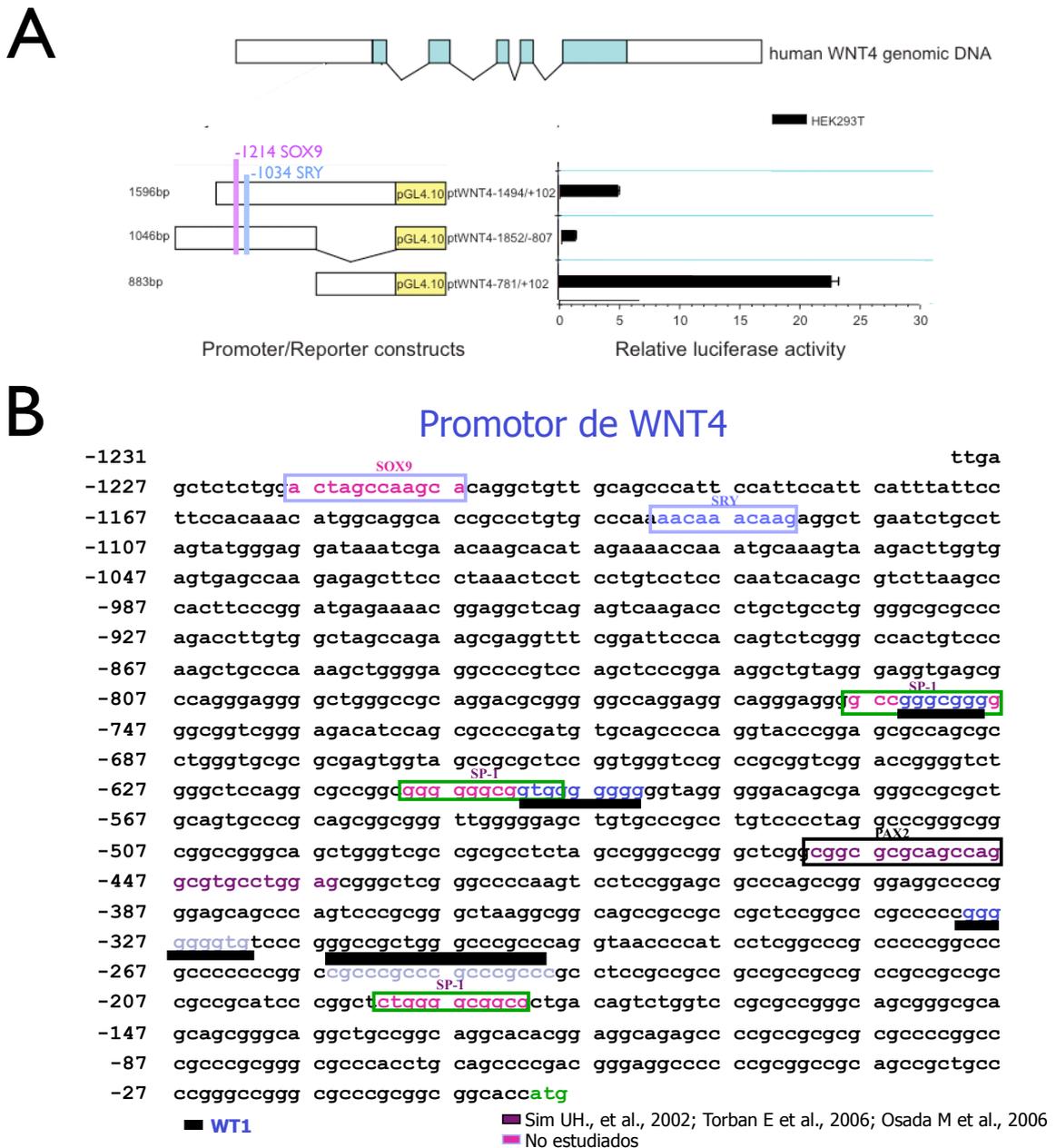


Figura 9. Análisis del promotor WNT4. (A) Actividad de luciferasa en modelo celular HEK293 transfectadas con las construcciones moleculares del promotor WNT4 correspondientes a 1596, 1046 y 883pb (Modificado de Hongshi et al., 2009). (B) Analisis *in silico* del promotor WNT4 en la que se muestran sitios de unión a factores de transcripción (Modificado de Sim et al., 2002).

CONCLUSIONES

En el análisis de expresión de mRNA realizado en el modelo celular HEK293, no se observó modificación en la expresión de los niveles de mRNA posterior a la transfección con el factor de transcripción SRY.

Proponemos un modelo basado en la regulación de uno o varios factores de transcripción que presentan el dominio HMG (Figura 10).

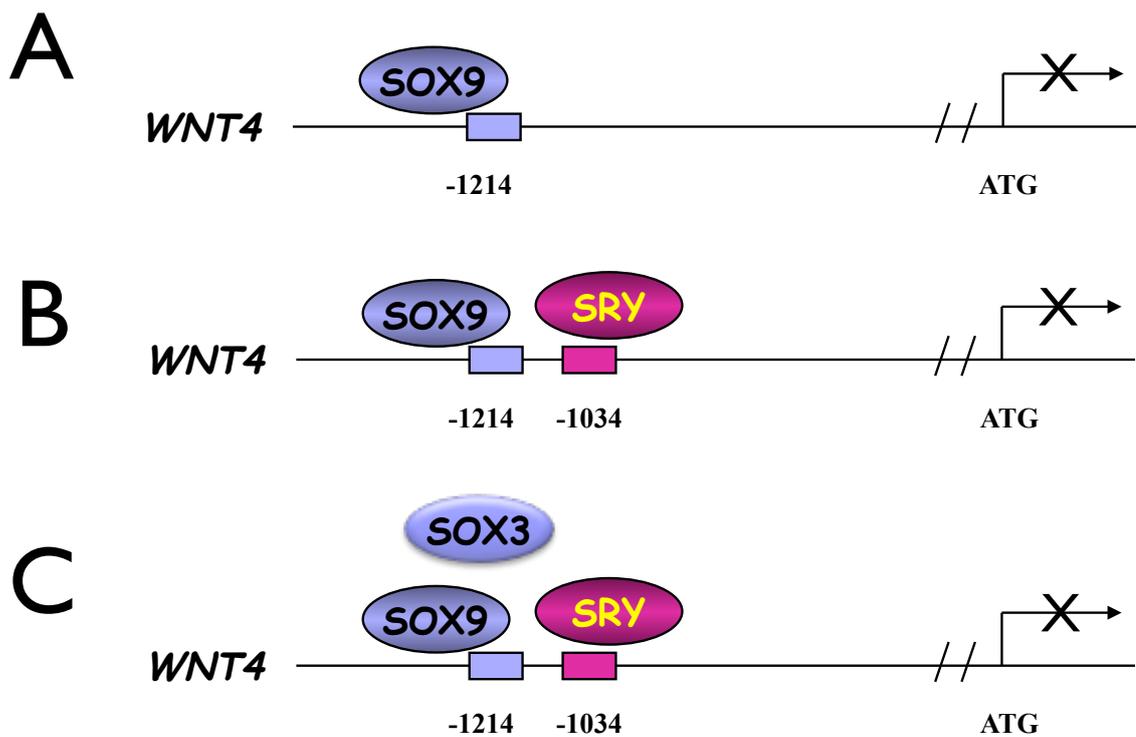


Figura 10. Modelo propuesto para la regulación transcripcional del promotor WNT4. (A) Regulación mediada por SOX9. (B) Regulación mediadas por SRY y SOX9. (C) Regulación mediada por SRY-SOX9, SRY-SOX3 o SOX9-SOX3.

PERSPECTIVAS

Con base en los resultados del análisis *in silico*, podemos inferir que *WNT4* se encuentra regulado por otros factores de transcripción, los cuales pueden ser de la familia SOX, (como el factor SOX9 y SOX3), o bien, por una efecto sinérgico entre SRY - SOX9 y/o SRY – SOX3. Por lo que proponemos el análisis de expresión de *WNT4* mediante transfección de SOX9 y cotransfección SOX9/SRY, así como considerar el uso del factor de transcripción SOX3.

Asimismo es importante evidenciar la unión entre SRY y el promotor de *WNT4*, para lo cual proponemos el uso de ensayos de retardo y superretardo o realizar estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Además sería importante conocer el estado de metilación del promotor de *WNT4* en diversos tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Assumpcao JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra JrG, Baptista MT, Scolfaro MR, De Mello MP. Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: the HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med.* 2002;80:782-790.

Bardoni, B., Zanaria, E., Guioli, S., Florida, G., Worley, K. C., Tonini, G., et al. (1994). A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat. Genet.*, 7(4), 497–501.

Bernard P, & Harley V. 2006. Wnt4 action in gonadal development and sex determination. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39:31-43

Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet.* 2000;26:490-494.

Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., et al. (2000). The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403(6772), 909–913

Brennan J, Karl J, Capel B. Divergent vascular mechanisms downstream of *Sry* establish the arterial system in the XY gonad. *Dev Biol.* 2002;244:418-428.

Cadigan K, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997;11:3286-3305.

Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in *SRY* and *SOX9*: Testis-determining genes. *Hum Mutat.* 1997;9:388-395.

Chassot A.A., Gregoire E.P., Magliano. M., Lavery. R., Chaboissier . M.C. (2008). Genetics of ovarian differentiation: *Rspo1*, a major player. *Sex dev.* 2:219-227

Clark, A. M., Garland, K. K., & Russell, L. D. (2000). Desert hedgehog (*Dhh*) gene is required in the mouse testis for formation of adult- type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol. Reprod.*, 63(6), 1825–1838.

Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., & Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, 104(6), 875–889.

Desclozeaux M, Poulat F, Santa Barbara P, Soullier S, Jay P, Berta P, Boizet-Bonhoure B. Characterization of two Sp1 binding sites of the human sex determining *SRY* promoter. *Biochem Biophys Acta.* 1998;1397:247-252.

Dubin R, Ostrer H. *Sry* is a transcriptional activator. *Mol Endoc.* 1994;8:1182-1192.

Ferrari S, Harley V, Pontiggia A, Goodfellow P, Lovel-Badge R, Bianchi M. *SRY*, like

HMG1, recognizes sharp angles in DNA. EMBO J. 1992;11:4497-4506.

Foster J, Brennan F, Hampikian G, Goodfellow P, Sinclair A, Lovell-Bage R, Selwood L, Renfrec M, Cooper D, Graves JAM. Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY related sequences in marsupials. Nature. 1992;359:531-533.

Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok Ch, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, Brook J, Schafer A. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. Nature 1994;372:525-530.

Goodfellow P, Darling S. Genetics of sex determination in man and mouse. Development 1988;102:251-258.

Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. In: Wilson J, Foster D, editors. Williams Textbook of Endocrinology. Philadelphia: Saunders; 1998. p.1303-1425.

Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry the mouse sex determining gene. Development. 1995;121:1603-1614.

Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Sálas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. SRY, SOX9 and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. Mech Dev. 2000;91:403-407.

Harley V, Jackson D, Hextall P, Hawkins J, Berkovitz G, Sockanathan S, Lovell Badge R, Goodfellow PN. DNA binding activity of recombinant SRY from normal males and XY females. Science. 1992;255:453-456.

Harley VR, Layfield S, Mitchell CL, Forwood JK, John AP, Briggs LJ, McDowall SG, Jans DA . Defective importin β recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:7045-7050.

Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. Endocr Rev. 2003;24:466-487.

Hebbar PB, Archer TK. Nuclear factor 1 is required for both hormone-dependent chromatin remodeling and transcriptional activation of the mouse mammary tumor virus promoter. Mol Cell Biol. 2003;23:887-898.

Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1 J Biol Chem. 2001;276:16817-16823.

Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. Am J Med Genet. 1999;87:349-353

Hung-Chang Yao H, Whoriskey W, Capel B. Desert hedgehog/Patched 1 signaling

- specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 2002;16:1433-1440.
- Jacobs P, Ross A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 1966;210:352.
- Jeays-Ward K, Hoyle Ch, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endotelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*. 2003;130:3663-3670.
- Jeays-Ward K, Dandonneau M, Swain A. *Wnt-4* is required for proper male as well as female sexual development. *Dev Biol*. 2004;276:431-440.
- Jirásek J. Development of the genital system and male pseudohermaphroditism. In: Cohen M, editor. Baltimore: John Hopkins University Press; 1971.
- Jordan B, Mohammed M, Ching S, Délot E, Chen X-N, Dewing P, Swain A, Rao N, Elejalde R, Vilain E. Up-regulated of Wnt-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001;68:1102-1109.
- Jordan BJ, Shen JH-C, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ β -catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10866-10871.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. A male specific role of SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*. 1996;122:2813-2822.
- Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin* 1982;34:349.
- Koopman P, Münsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Bagde R. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*. 1990;348:450-452.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Bagde R. Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature*. 1991;351:117-121.
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., & Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(8), 2474–2479.
- López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet* 1995;55:356-358.
- Luo, X., Ikeda, Y., & Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell*, 77(4), 481–490.
- Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue J-I, Semba K. Transcriptional activity of testis-

determining factor SRY is modulated by the Wilm's tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene*. 2003;22:5956-5960.

McKay D. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev* 1953;117:201-206.

Meeks, J. J., Weiss, J., & Jameson, J. L. (2003). Dax1 is required for testis determination. *Nat. Genet.*, 34(1), 32–33.

Merchant-Larios H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. In: Van Blerkom J, Motta P, editors. *Ultrastructure of Reproduction*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1984. p. 19.

Mertin S, McDowall SG, Harley VR. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:1359-1364.

Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet*. 1996;14:62-68.

Müller MM, Schreiber E, Schaffner W, Mathias P. Rapid test for *in vitro* stability and DNA binding of mutated octamer binding proteins with “mini-extracts” prepared from transfected cells. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:6420.

Nasrin N, Buggs C, Kong XF, Carnazz J, Goebel M, Alexander-Bridges M. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature*. 1991;354:317-320.

Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P (1997). SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 183:108

Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. In: Labhart A, editor. *Monographs on Endocrinology*. Berlin: Springer Verlag; 1967. p. 5.

Poulat F, Girard F, Chevron MP, Gozé C, Rebillard X, Calas B, Lamb N, Berta P. Nuclear localization of the testis determining gene product SRY. *J Cell Biol*. 1995;128:737-748.

Pritchard-Jones, K., Fleming, S., Davidson, D., Bickmore, W., Porteous, D., Gosden, C., et al. (1990). The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature*, 346(6280), 194–197.

Sambrook J, Russell D. In vitro amplification of DNA by the Polymerase chain reaction. En: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3^a. ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press; 2001. p.8.1-8.96.

Schäffler A, Barth N, Winkler K, Zietz B, Rümmele P, Knüchel R, Schölmerich J, Palitzsch K-D. Identification of a new missense mutation (Gly95Glu) in a highly conserved codon within the high-mobility group box of the sex-determining region Y

- gene: report on a 46,XY female with gonadal dysgenesis and Yolk-sac tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2287-2292.
- Sessa, Lucca & Marco E. Bianchi . (2007) The evolution of High Mobility Group Box (HMGB) chromatin proteins in multicellular animals. *Gene* 387:133 – 140
- Sim E U-H, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH, Little M H. *Wnt-4* regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, *WT1*. *Oncogene.* 2002;21:2948-2960.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990;346:240-244.
- Su H, Lau Y. Identification of the transcriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet.* 1993;52:24-38.
- Südbeck P, Lienhard Schmitz M, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet.* 1996;13:230-232.
- Sutton E., Hughes J., White S., Sekido R., Tan J., Arboleda V., Rogers N., Knowler K., Rowley L., Eyre H., Rizzoti K., McAninch D., Goncalves J., Slee J., Turbitt E., Bruno D., Bergtsson H., Harley V., Vilain E., Sinclair A., Lovell-Badge R., Thomas P. (2011). Identification of SOX3 as an XX male sex reversal gene in mice and humans. *J Clin Invest.* 121(1): 328-341
- Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev.* 1999;13:755-767.
- Tang Y, Nilsson L. Interaction of human SRY protein with DNA: a molecular dynamic study. *Proteins.* 1998;31:417-433
- Tao BY, Patrick Lee KC. Mutagenesis by PCR. En: *PCR technology. Current Innovations.* Eds. Griffin HG, Griffin AM. Boca Raton: CRC Press, Inc; 1994. p.69-83.
- Tevosian, S. G., Albrecht, K. H., Crispino, J. D., Fujiwara, Y., Eicher, E. M., & Orkin, S. H. (2002). Gonadal differentiation, sex determination and normal Sry expression in mice require direct interaction between transcription partners GATA4 and FOG2. *Development*, 129(19), 4627–4634.
- Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet.* 1996;63:348-355.
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon A. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999;397:405-409.
- Veitia RA, Sálas-Cortés L, Ottolenghi Ch, Pailhoux E, Cotinot C, Fellous M. Testis

determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179: 3-16.

Vidal VPI, Chaboissier M-C, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet.* 2001;28:216-217.

Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell* 1994;49:1111-1120.

Werner M, Huth J, Gronenborn A, Clore M. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY DNA complex. *Cell.* 1995;81:705-714.

Werner M, Gronenborn A, Clore G. Interaction, DNA kinking, and the control of transcription. *Science.* 1996;271:778-784.