



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DEL GEN *MAFB* Y SU POSIBLE
RELACIÓN COMO FACTOR DE DESORDEN DE
DESARROLLO SEXUAL EN PACIENTES 46,XY-
HIPOSPADIAS”**

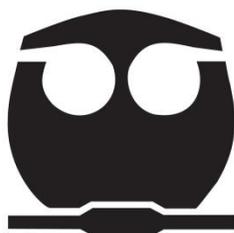
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

PRESENTA:

PÉREZ HERNÁNDEZ CARLOS JORDAN



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

VOCAL: JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

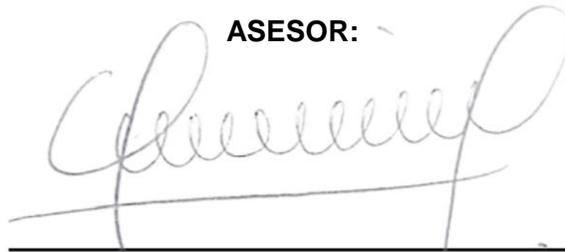
SECRETARIO: LUIS RAMOS TAVERA

PRIMER SUPLENTE: EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

SEGUNDO SUPLENTE: JAVIER AXOSCO MARÍN

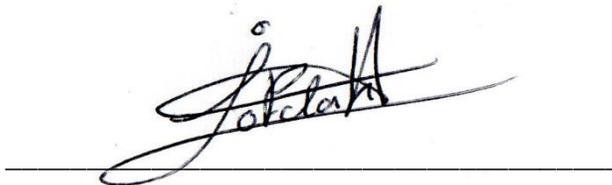
**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA
HORMONAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, INSTITUTO
NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN.**

ASESOR:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis Ramos Tavera', written over a horizontal line.

DR. LUIS RAMOS TAVERA

SUSTENTANTE:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Carlos Jordan Pérez Hernández', written over a horizontal line.

CARLOS JORDAN PÉREZ HERNÁNDEZ

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, a la facultad de química por brindarme un nivel académico excelente además de enriquecerme cultural, social y físicamente.

A todos mi compañeros y amigos de la facultad de química por sus enseñanzas, risas, vivencias, consejos, ánimos para seguir adelante y sobre todo por su sincera amistad.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por la oportunidad de poder realizar este proyecto. Así mismo a mis compañeros y amigos del laboratorio de bioquímica hormonal por su apoyo incondicional en el trabajo experimental, enseñanzas y consejos.

Al Dr. Luis Ramos Tavera, por todas las enseñanzas, comentarios y su infinita paciencia, muchas gracias por guiarme y motivarme para la realización y termino del proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Francisco Javier Plasencia De la Parra, Dr. José Pedraza Chaverri, Dr. Euclides Ávila Chávez, Dr. Javier Axosco Marín por todas las sugerencias y observaciones realizadas en este proyecto.

A mi papá y mamá, jamás tendré palabras suficientes para agradecerles por todo lo que me dan: cariño, atención, educación, paciencia, enseñanzas, consejos, etc. Un profundo agradecimiento por el amor incondicional y es por ustedes que puedo seguir adelante, los amo Vianey y Ricardo.

A mis hermanos: Vanessa, Valeria y Anuar, por ser mi apoyo más grande y motivación, por alegrarme mis días y su enorme amor incondicional, todo esto es dedicado a ustedes, los amo mucho.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
• 1.1. Determinación sexual.....	2
• 1.2. Diferenciación sexual.....	6
• 1.3. Factores de transcripción.....	11
• 1.4. MAFB.....	21
• 1.5. Desórdenes del desarrollo sexual.....	25
2. Justificación.....	28
3. Hipótesis.....	29
4. Objetivos.....	30
5. Metodología.....	31
• 5.1. Extracción de gDNA.....	31
• 5.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	33
• 5.3. Purificación de gDNA mediante electroelución.....	35
• 5.4. Secuenciación.....	37
6. Resultados.....	39
7. Discusión.....	45
8. Conclusiones.....	50
9. Perspectiva.....	51
10. Bibliografía.....	52
11. Anexo.....	61

Resumen

La masculinización de los genitales externos es un proceso esencial en la formación del sexo masculino. En ratones, se ha observado que la expresión del gen v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family protein b (*Mafb*) se lleva a cabo preferencialmente durante el desarrollo de los genitales externos masculinos, regulando la masculinización y formación de la uretra embrionaria de una manera dependiente de andrógenos; sin embargo su función en el humano aún se desconoce. La expresión del gen *Mafb* ha postulado la idea de su posible asociación con el desarrollo de hipospadias en humanos. Con el objetivo de identificar mutaciones en el gen *MAFB*, localizado dentro del cromosoma 20, bandas q11.2-q13.1 en humanos, en este estudio se realizó el análisis molecular del gen mediante extracción de DNA genómico, PCR y secuenciación Sanger en 24 individuos 46,XY fenotipificados clínica y exclusivamente con hipospadias aisladas. Los datos obtenidos a partir de la región codante del gen *MAFB* en estos pacientes indicaron la ausencia de mutaciones puntuales, inserciones, duplicaciones o deleciones de pares de bases. La presencia de una secuencia nucleotídica normal en los 24 pacientes analizados sugiere una baja probabilidad de que el gen *MAFB* de humanos pueda ser asociado con desórdenes del desarrollo sexual, específicamente con la diferenciación sexual de la uretra masculina.

Palabras clave: MAFB, masculinización, uretra, hipospadias, factor de transcripción.

1. Introducción

1.1. Determinación sexual

En humanos, el programa biológico de diferenciación sexual se puede dividir en tres etapas sucesivas: determinación del sexo genético (cromosómico), gonadal y fenotípico (Nef & Parada, 2000). La determinación del sexo (cromosómico) inicia en el momento de la fertilización (Jost, 1970; Arnold, 2017). Una vez que el espermatozoide, que posee un cromosoma X o un cromosoma Y, atraviesa la zona pelúcida y el espacio perivitelino se fusionan las membranas del espermatozoide y del ovocito (que aporta un cromosoma X). El contenido del espermatozoide es llevado al interior del ovocito dando lugar a un huevo o cigoto, a partir del cual se formará un nuevo organismo multicelular y distinto genéticamente a sus progenitores con carga cromosómica 46,XX o 46,XY (Cederroth et al., 2007; Inoue et al., 2011).

En el sexo femenino, la presencia de dos cromosomas X desencadena la expresión del RNA de transcripción específica de inactivación X (*XIST*, del inglés X Inactivation-Specific Transcript) a partir de uno de los dos cromosomas X, lo que hace que todas las células sean diferentes de las que tienen un único cromosoma X. De esta manera, *XIST* inicia el silenciamiento transcripcional del cromosoma seleccionado (Disteche, 2012). *XIST* es regulado por múltiples factores, incluido el factor de Inactivación específica de transcripción antisentido X (*TSIX*, del inglés X Inactivation-Specific Transcript-antisense) y otros RNA no codificantes ubicados cerca de *XIST* (Romito & Rougeulle, 2011). Finalmente, la X inactiva se vuelve tardía en replicarse, las islas CpG se metilan, de tal forma que las proteínas de la familia de histonas, miembro Y (H2AFY, del inglés H2A Histone Family, member Y) y (SMCHD1, del inglés Structural Maintenance of Chromosomes flexible Hinge Domain-containing protein 1) se reclutan para asegurar el silenciamiento y dejar

una sola X activa (Sugimoto & Abe, 2007; Heard & Turner, 2011; Gendrel et al., 2012).

A partir de la quinta semana del desarrollo embrionario, la anatomía de la cresta urogenital se encuentra unida a la cavidad peritoneal por el mesenterio y comprende dos tejidos yuxtapuestos: los conductos de Wolff y los conductos de Müller (Park & Jameson, 2005). Las estructuras aparecen por primera vez en el día 10 en el embrión de ratón y en el día 33 de gestación en el embrión humano (Hanley et al., 2000) y está compuesto por células somáticas y células germinales primordiales (PGC) que han migrado desde la base del alantoides a través del intestino posterior (McLaren, 2003). En esta etapa, la cresta genital es bipotencial ya que puede dar lugar a ovario o testículo (Viger et al., 2005).

La gónada bipotencial embrionaria no está diferenciada, hasta una etapa crítica alrededor de la sexta semana de gestación, en la que los cromosomas sexuales regulan su desarrollo como un testículo u ovario. La gónada bipotencial expresa genes como el tumor de Wilms 1 (*WT*, del inglés Wilms Tumor 1), factor esteroideogénico 1 (*SF1*, del inglés Steroidogenic Factor 1), proteína de unión a GATA 4 (*GATA4*, del inglés GATA-binding protein 4), (*EMX2*, del inglés Empty spiracles homeobox 2), LIM Homeobox 9 (*LHX9*) y doublesex and Mab3-related transcription factor 1 (*DMRT1*) y posteriormente, la expresión de la familia de receptores de insulina y el receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (*IGF1R*, del inglés Insulin-like Growth Factor 1 Receptor) (Birk et al., 2000; Nef et al., 2003; Park & Jameson, 2005). Los hallazgos recientes sugieren que la diferenciación gonadal está controlada por señales antagónicas entre las vías de señalización *Sry*-box 9 (*SOX9*), factor de crecimiento de fibroblastos 9 (*FGF9*, del inglés Fibroblast Growth Factor 9) y wingless-type mmtv integration site family, member 4 (*WNT4*) (Kim et al., 2006).

El establecimiento del sexo masculino comienza con la diferenciación de las células de Sertoli, mecanismo regulado por la acción del gen región determinante de sexo Y (*SRY*, del inglés Sex-determining Region Y) y mediante la señalización autocrina/paracrina del FGF9 y prostaglandina D2 (*PGD2*) (Sekido & Lovell-Badge, 2008). El *SRY* promueve a que el tejido gonadal relativamente diferenciado se comprometa hacia testículo (Koopman, 2010). En ausencia del gen *SRY*, los genes ligados al cromosoma X o autosómicos inician el desarrollo ovárico (Arnold, 2017).

En individuos XY, existe un solo alelo del gen *SRY* y un solo alelo del gen DSS-AHC región crítica en el cromosoma X, gen 1 (*DAX1*, del inglés DSS-AHC critical region on the X chromosome 1, gene 1). La presencia de esta única dosis génica induce la formación normal de los cordones testiculares. La expresión de *SRY* permite la diferenciación testicular con la consiguiente expresión de genes típicamente testiculares como *SOX9* y la hormona anti-mülleriana (*AMH*). *SRY* no es el único gen responsable del desarrollo testicular, existen otros genes autosómicos que también están involucrados en el desarrollo normal de la gónada masculina, aunque sus funciones deben aún ser reveladas (Rey, 2001). Además, factores adicionales como homeobox relacionado con Aristaless, ligado a X (*ARX*, del inglés Aristaless-Related homeobox, X-linked), desert HedgeHog signaling molecule (*DHH*), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas α (*PDGFR- α* , del inglés Platelet-Derived Growth Factor Receptor α), *FGF9* y el receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (*FGFR2*) pueden estar involucrados en la diferenciación de células de Leydig y Sertoli (Park & Jameson, 2005).

El gen *SRY* inicia la vía de determinación gonadal al regular *SOX9*, que a su vez regula la expresión de *FGF9* y aumenta la síntesis de *PGD2*. *FGF9* y *PGD2* ayudan a mantener la expresión de *SOX9*, formando un eje de retroalimentación positiva y por lo tanto ayudan a dirigir la diferenciación del linaje de apoyo en las

células de Sertoli (Malki et al., 2005). Además, las células de Sertoli se reclutan a través de un mecanismo no autónomo, las células de Sertoli que expresan *SRY* secretan *PGD2*, que actúa de forma paracrina para aumentar la expresión de *SOX9* en los precursores celulares de soporte. Esto compromete a las células de Sertoli adicionales para reforzar el destino de los testículos (Nef & Vassalli, 2009). La fase posterior a la determinación de las gónadas es la diferenciación sexual, que depende casi exclusivamente de hormonas sexuales (Hughes, 2001).

1.2. Diferenciación sexual

Las hormonas sexuales desempeñan un papel esencial en la regulación de la diferenciación sexual masculina durante la embriogénesis. En mamíferos, la diferenciación está regulada por tres hormonas clave: testosterona (T), Insulin-Like 3 (INSL3) y AMH (Viger, 2005).

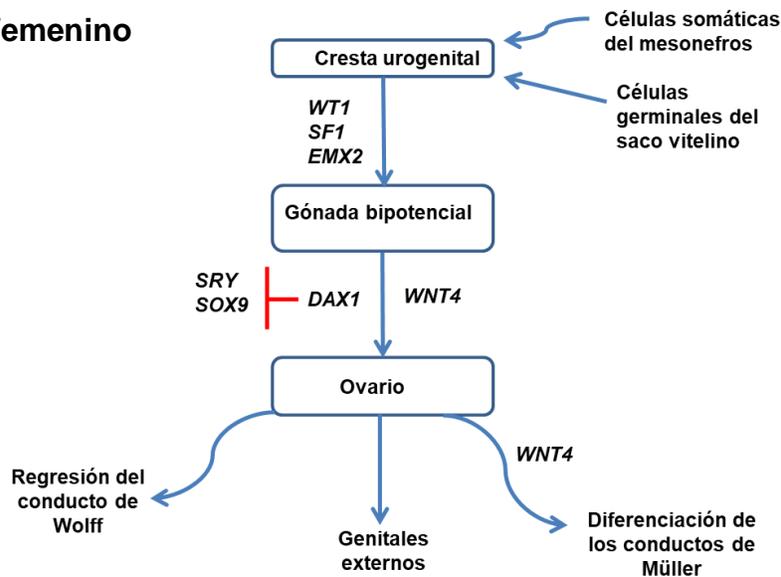
Inmediatamente después de formarse los cordones testiculares, las células de Sertoli fetales secretan AMH (Morel et al., 2014). La AMH es una glicoproteína que se une a un receptor transmembranal presente en las células mesenquimáticas que rodean al epitelio de los conductos de Müller (Josso et al., 1997), induciendo apoptosis, transformación del epitelio-mesenquimatoso y regresión de los conductos de Müller (Allard et al., 2000; Hughes, 2001). En el sexo femenino, ante la falta de AMH, los conductos de Müller dan origen a las trompas de Falopio, el útero y el tercio superior de la vagina. La secreción testicular de AMH comienza a finales de la séptima semana de gestación y los conductos de Müller desaparecen alrededor de la décima semana de la gestación (Wilhelm, 2013).

A partir de la octava semana, las células de Leydig producen andrógenos, principalmente T y dihidrotestosterona (DHT) (Rey, 2001). Estos esteroides sexuales son responsables de la estabilización de los conductos de Wolff y de su diferenciación en epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales, así como de la masculinización del seno urogenital de los genitales externos y descenso testicular (Griswold & Behringer, 2009). La diferenciación de las células de Leydig, su proliferación y su actividad esteroideogénica dependen del estímulo y regulación de gonadotropina coriónica humana (hCG) en los primeros seis meses de vida intrauterina y hormona luteinizante (LH) hipofisaria en el último trimestre (O'Shaughnessy & Fowler, 2011).

El descenso de los testículos constituye un paso esencial en el proceso de diferenciación sexual masculina, siguiendo dos etapas distintas y secuenciales, cada una regulada por diferentes factores: la etapa intraabdominal y la etapa inguinoescrotal (Klonisch et al., 2004). Las conexiones de la pared abdominal a los testículos son a través del ligamento craneal suspensorio (CSL) y caudalmente a través del gubernáculo. Este último tejido mesenquimatoso en el sexo masculino se contrae, engrosa y desarrolla un crecimiento bulbar que con la regresión de la CSL da como resultado el testículo ubicado en la parte inferior del abdomen por el anillo inguinal interno (Barteczko & Jacob, 2000). En el feto humano, el descenso testicular intraabdominal al anillo inguinal interno se inicia aproximadamente en las semanas 10 a la 14 de gestación y se mantiene aproximadamente hasta las semanas 20 a la 23 (Costa et al., 2002).

El factor que regula la primera etapa intraabdominal es *INSL3* (**Fig. 1**) y es expresado en las células de Leydig. Estudios recientes en pacientes con criptorquidia sugieren que las mutaciones genéticas en *INSL3* son raras (Tomboc et al., 2000), por lo que se ha propuesto que receptores específicos para *INSL3* y reguladores transcripcionales sean la causa de señalización disfuncional (Koskimies et al., 2002). La última etapa (inguinoescrotal) depende completamente de andrógenos, como lo ilustran las observaciones en pacientes con hipogonadismo y criptorquidia en los síndromes de insensibilidad a los andrógenos (Lim et al., 2001). En ausencia de producción de T o en ausencia de receptor de andrógenos (AR), el descenso testicular se detiene inmediatamente después de la etapa intraabdominal (Brinkmann, 2001; Sultan et al., 2001).

Desarrollo femenino



Desarrollo masculino

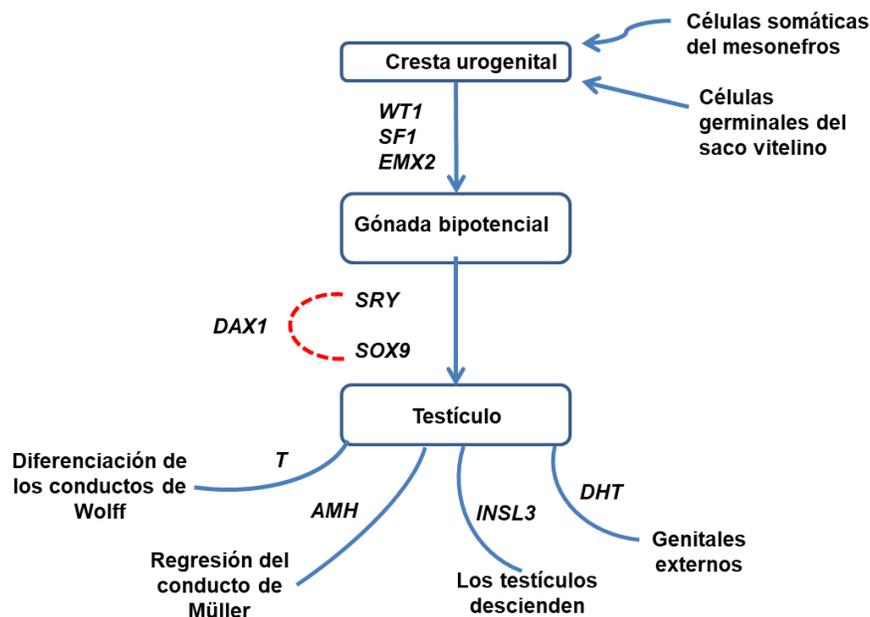


Fig. 1. Genes involucrados en la determinación y diferenciación sexual. La cresta urogenital expresa genes como: el gen región determinante de sexo Y (*SRY*), tumor de Wilms 1 (*WT1*) y (*EMX2*, del inglés empty spiracles homeobox 2). Se desarrolla un ovario en ausencia de la acción de *SRY* y *Sry*-box 9 (*SOX9*), por efecto anti-testicular del gen DSS-AHC región crítica en el cromosoma X, gen 1 (*DAX1*) y (*WNT4*, del inglés wntless-type mmtv integration site family, member 4). La gónada masculina se desarrolla como resultado de la acción *SRY* y *SOX9*, complementada por *DAX1*. La regresión de los conductos de Müller está mediada por la hormona anti-mülleriana (*AMH*), los conductos de Wolff y la diferenciación de los genitales externos están regulados por el receptor de andrógenos. El descenso de los testículos está regulado por insulín-like 3 (*INSL3*).

Al igual que los genitales internos, los genitales externos dependen de la acción androgénica. Los primordios indiferenciados evolucionan en sentido masculino bajo la acción de la DHT, andrógeno potente derivado de la acción de la enzima 5 α -reductasa tipo 2. El tubérculo genital (GT) origina el pene y la uretra, mientras que los pliegues labioescrotales se agrandan y se fusionan en sentido pósterio-anterior para formar las bolsas escrotales (Wilson, 1999). En el feto femenino, la falta de andrógenos permite que el GT origine el clítoris, que los pliegues urogenitales formen los labios menores y que los pliegues labioescrotales permanezcan separados formando los labios mayores (Rey, 2001).

Los mecanismos que regulan los procesos de masculinización dependientes de andrógenos son en gran parte desconocidos. Una deficiencia en la exposición a los andrógenos provoca la falta de masculinización de GT. Por lo tanto, el momento adecuado de la exposición embrionaria al andrógeno es esencial para inducir la masculinización de GT. Las acciones de los andrógenos están regulados por la unión al AR (Miyagawa et al., 2009), un receptor nuclear que se encuentra localizado en el cromosoma Xq11-12. El gen de receptor de andrógenos (*AR* o *NR3C4*, del inglés nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4) es miembro de una superfamilia de receptores nucleares que presentan regiones altamente homólogas, un dominio N-terminal implicado en la transactivación, un dominio central de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) altamente conservado dentro de la familia y un dominio C-terminal de unión a ligando. El AR contiene subdominios, denominados AF1 y AF2, que regula la interacción de los dominios N- y C- terminales (Hughes, 2001).

El efecto de los andrógenos empieza con el transporte de la testosterona al lugar de acción a través del torrente circulatorio. La T puede ser metabolizada a DHT en el citoplasma. Los monómeros inactivos del AR están unidos a proteínas de choque térmico que mantienen inactivo al AR. La unión de T o DHT al AR induce

un cambio conformacional, las proteínas chaperonas se disocian y el AR es fosforilado, solo así, el complejo hormona-receptor se transloca al núcleo. En el núcleo, el AR forma dímeros y se une al DNA, posteriormente se acoplan coactivadores o factores de transcripción que ayudan a modular la transcripción del gen. El AR puede nuevamente disociarse del DNA y exportarse al citoplasma, un proceso regulado por fosforilación, donde es nuevamente inactivado por el complejo de chaperonas. La estabilidad del AR es influenciada por la fosforilación a través de la ubiquitinación y degradación. Una vez unidos los dímeros del AR a elementos de respuesta a andrógenos o haber interactuado a través de interacciones proteína-proteína, se inicia el proceso de transcripción. El gen blanco es transcrito y el ácido ribonucleico mensajero (mRNA) es procesado para su maduración. El mRNA es transportado al citoplasma donde se lleva a cabo la traducción de la secuencia de sus nucleótidos, por los ribosomas, para la síntesis de diversas proteínas. Otras vías de transducción de señal participan aumentando la actividad del AR a través de la fosforilación del AR o de sus cofactores (Heinlein & Chang, 2004; Weigel & Moore, 2007; Rojas et al., 2011).

Recientemente, se han intentado identificar genes masculinizantes específicos de GT, que estén potencialmente involucrados en el desarrollo del GT mediante análisis de microarreglos en ratones, en estos estudios se buscaron genes con mayor nivel de expresión en GT masculino en comparación con GT femenino, tales genes reportados son el citocromo p450, subfamilia i, polipéptido 1 (*Cyp1b1*, del inglés Cytochrome p450, subfamily i, polypeptide 1), proteína 5 de unión a *FK506* (*Fkbp51*, del inglés FK506-Binding Protein 5) y proteína b de la familia oncogén del fibrosarcoma musculoaponeurótico v-maf (*Mafb*, del inglés v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein b), siendo este último un factor de transcripción de cierre de leucinas (Nishida et al., 2008).

1.3. Factores de transcripción

Los factores de transcripción (TF) son proteínas que se pueden unir al DNA al reconocer motivos o secuencias específicas ubicadas en elementos reguladores, promotores y potenciadores de genes transcritos y que pueden contribuir a la eficiencia con la que la RNA polimerasa II se une e inicia la transcripción (Berger et al., 1998). La unión de los TF controla procesos como la metilación del DNA, acetilación de histonas y glicosilación. El resultado es la activación o represión de la expresión génica. Por lo tanto, los TF tienen un papel crucial en la interpretación de la información genómica y son actores centrales en los mecanismos reguladores de genes específicos. Aunque los TF están presentes en todas las especies biológicas, los eucariotas tienen un conjunto único de clases de TF (Lambert et al., 2018; De Mendoza & Sebé-Pedrós, 2019).

Muchos TF no pueden unirse al DNA como una sola proteína monomérica. A menudo contienen dominios específicos de interacción proteína-proteína que se unen entre sí para formar un dímero, trímero o tetrámero funcional que puede ser de naturaleza homomérica o heteromérica (**Fig. 2**). La interacción a nivel de proteína permite la unión del complejo al DNA debido al aumento de la avidéz y/o interacciones cooperativas entre las subunidades (Morgunova & Taipale, 2017).

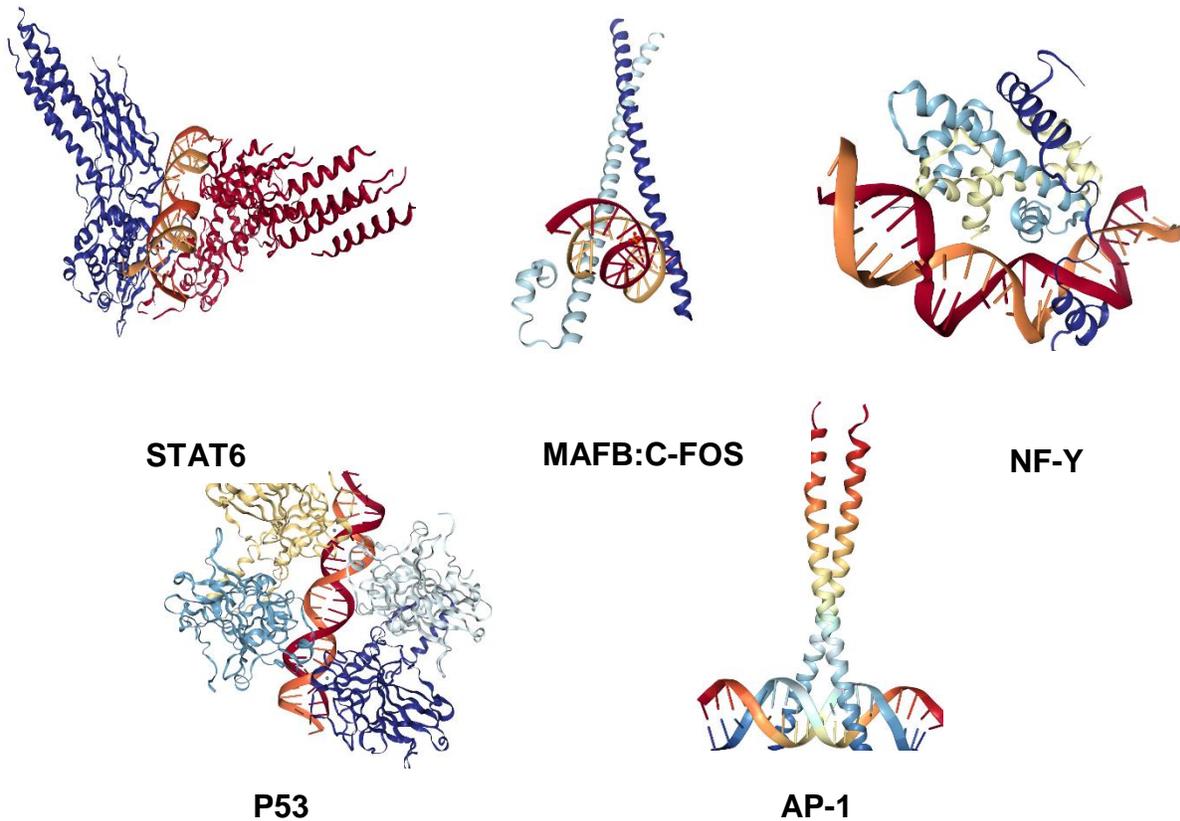


Fig. 2. Complejos TF-TF unidos a una secuencia específica de DNA. De izquierda a derecha en la parte superior: homodímero STAT6, heterodímeros MAFB:C-FOS, trímero NF-Y. De izquierda a derecha en la parte inferior: tetrámero P53 y homodímeros AP-1 (Morgunova & Taipale, 2017; Rose et al., 2018).

Se ha observado que múltiples factores desempeñan un papel importante entre la unión del TF con los elementos de respuesta al DNA (RE) como la concentración del TF en la célula y el grado de compactación de la cromatina, que hace grandes tramos de DNA inaccesibles, lo que reduce la región genómica que el TF pueda elegir. Además, la unión de un TF a un RE puede afectar la unión selectiva de otros RE. Esto puede ocurrir de diferentes maneras: la unión RE puede estabilizar o bloquear la unión de la RNA polimerasa al DNA; puede catalizar la acetilación de histonas para debilitar la asociación del DNA con las histonas, haciendo que ciertas regiones de DNA sean más accesibles para los TF y, por lo tanto, aumentar la transcripción; o puede catalizar la desacetilación para fortalecer la

asociación del DNA con las histonas, haciendo que esas regiones de DNA sean menos accesibles regulando negativamente la transcripción (Riley et al., 2008).

Los mecanismos de reconocimiento entre RE-TF son clasificados en tres grupos diferenciados por el orden de los eventos de iniciación de la transcripción: Tipo I, reclutamiento del cofactor seguido por la unión del RE; Tipo II, unión del RE seguida de reclutamiento de cofactor; y Tipo III, unión al RE mediada por el enhancersoma (Fig. 3) (Pan et al., 2010).

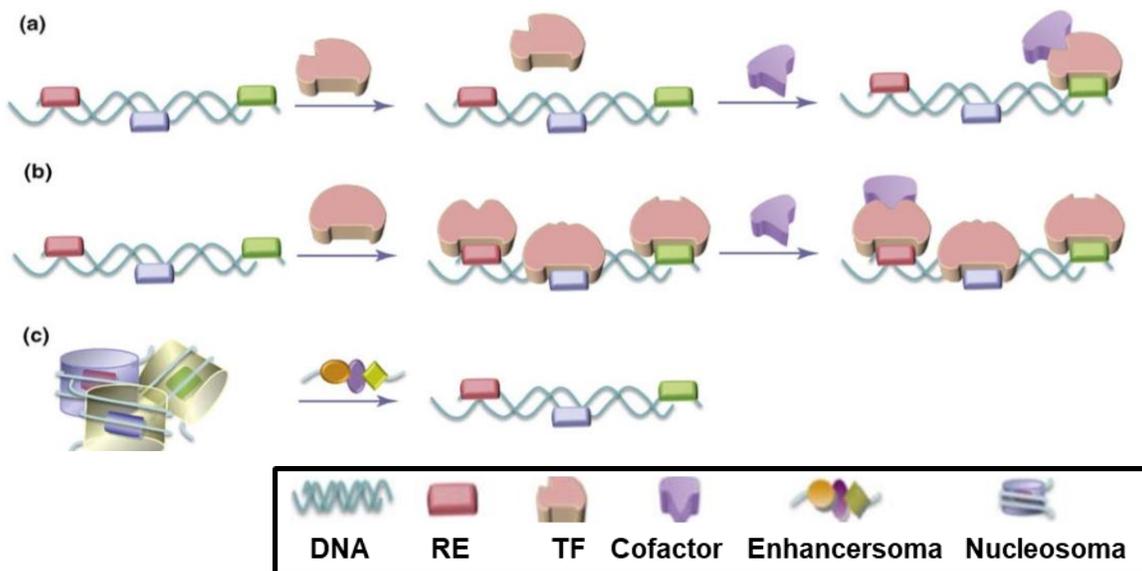


Fig. 3. Tres mecanismos propuestos de selectividad TF. (a) Los RE están disponibles para unirse a los TF. El TF se une selectivamente a un RE (verde). La conformación del sitio de unión del cofactor al TF está determinada alostéricamente. Una vez que el TF se une a un RE, se inicia la transcripción o se reprime. (b) Los RE disponibles se une a un TF. Los RE mejoran alostéricamente una población de TF para unirse a un cofactor específico. El cofactor se une a la conformación del sitio de unión, que es complementaria. Cuando el cofactor se une, se inicia la transcripción o se reprime. (c) Los RE no disponibles del nucleosoma quedan expuestos a través del enhancersoma por ejemplo, acetilación (Pan et al., 2010).

Los TF se clasifican según su dominio estructural denominado dominio de unión al DNA (DBD) y se organizan jerárquicamente. Los principales tipos incluyen TF de homeodominio, hélice-bucle-hélice (bHLH), cierre de leucinas (bZIP), cajas de alta movilidad (HMG), dedos de zinc (ZF) y receptores nucleares a hormonas (NHR) (Johnson & McKnight, 1989; Pabo & Sauer, 1992; Pan et al., 2010).

Los TF de homeodominio juegan un papel crítico en procesos celulares como la determinación del destino celular durante el desarrollo de metazoarios. Los miembros de esta familia se caracterizan por un motivo de unión al DNA hélice-giro-hélice conocido como homeodominio (Misra et al., 2012). Estudios cristalográficos de rayos X y espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN) muestran que este motivo se compone de tres hélices α que se pliegan en una estructura globular compacta con una extensión N-terminal. Las hélices I y II se encuentran paralelas entre sí y frente a la tercera hélice (Pabo & Sauer, 1992). Esta tercera hélice también se conoce como la 'hélice de reconocimiento', ya que confiere especificidad de unión al DNA (**Fig. 4**) en proteínas de homeodominio individuales (Wolberger, 1996). El motivo estructural del homeodominio está altamente conservado en todas las especies, desde levaduras hasta humanos (Banerjee-Basu et al., 2003).



Fig. 4. Estructura TF de homeodominio, las hélices I y II se encuentran paralelas entre sí, frente a la tercera hélice de reconocimiento al DNA (azul dominio C-terminal, de rojo dominio N-terminal) (Wolberger, 1996; Rose et al., 2018).

Los bHLH constituye una de las mayores familias de TF (Ledent & Vervoort, 2001). En animales, los bHLH participan en la detección de señales ambientales, en la regulación del ciclo celular y los ritmos circadianos, así como en la regulación de diversos procesos esenciales del desarrollo, que incluyen la determinación de la neurogénesis (Atchley & Fitch, 1997; Stevens et al., 2008). Estructuralmente se componen de dos hélices α anfipáticas que consisten principalmente en residuos hidrofóbicos unidos por una región bucle más divergente tanto en longitud como en secuencia primaria (**Fig. 5**). El dominio HLH promueve la interacción proteína-proteína que permite la formación de complejos homodiméricos o heterodiméricos (Carretero-Paulet et al., 2010).

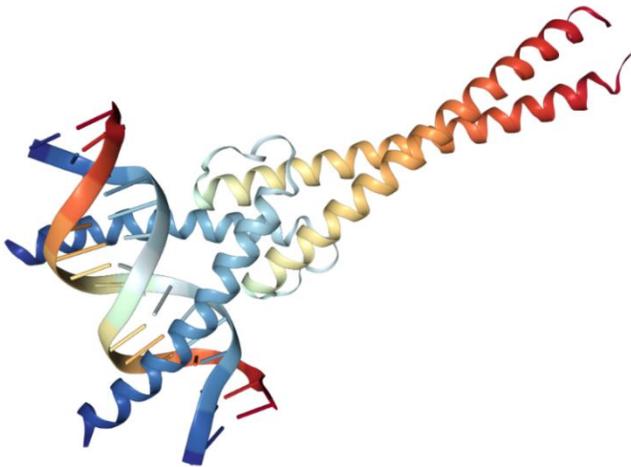


Fig. 5. Estructura del dominio bHLH en complejo con DNA (azul dominio N-terminal, de rojo dominio C-terminal) (Shimizu et al., 1997; Rose et al., 2018).

Los TF con dedos de zinc (ZF) tiene funciones muy diversas entre las cuales incluyen reconocimiento de DNA, empaquetamiento de RNA, activación transcripcional, regulación de la apoptosis, unión de lípidos, plegamiento y ensamblaje de proteínas (Hall, 2005). Se ha definido que los ZF contienen un dominio funcional que requiere la coordinación de cisteínas a uno o más iones de zinc para estabilizar su estructura (Laity et al., 2001). Estos varían ampliamente en estructura (**Fig. 6**), así como en función; que va desde la unión de DNA o RNA a interacciones proteína-proteína y asociación de membrana. Recientemente se ha reconocido un distinto ZF con dos cisteínas y dos histidinas como el primer

miembro de una familia en rápida expansión de motivos de unión de zinc (Lu et al., 2003).

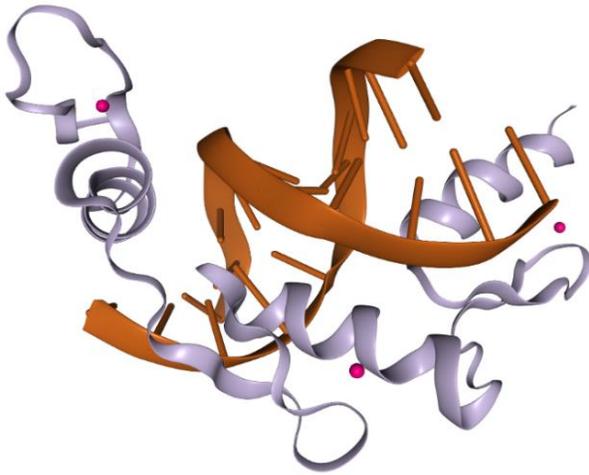


Fig. 6. Estructura del complejo TF-DNA. El TF presenta una estructura de tres dedos de zinc (gris) que rodea al DNA (naranja), los residuos N-terminales de las hélices α entran en contacto con las bases. En rosa se muestran los iones de zinc (Elrod-Erickson et al., 1996; Rose et al., 2018).

Los receptores de hormonas nucleares (NHR) que se encuentran en prácticamente todos los tejidos y comprenden la clase más grande de TF en animales. Los procesos que regulan los NHR son el desarrollo embrionario, el crecimiento, la diferenciación celular, la homeostasis metabólica y la reproducción (Gillies et al., 2008). Estructuralmente, los NHR pueden subdividirse en tres clases: La clase 1 incluye los receptores clásicos para las hormonas esteroides, como los receptores de glucocorticoides, andrógenos (**Fig. 7**), progesterona, estrógenos y mineralocorticoides (Keppler et al., 2011). Los receptores de clase 1 están unidos a proteínas de choque térmico y no interactúan con el DNA promotor independiente del ligando. Tras la unión del ligando, esta clase de receptores se une directamente y con alta afinidad al DNA como homodímeros (Claessens & Gewirth, 2004). La segunda clase se une a las hormonas no esteroides, que incluyen el receptor de ácido retinoico, receptor de la hormona tiroidea, receptor de vitamina D y los receptores que se unen a diversos productos lipofílicos como los ácidos grasos y las prostaglandinas. Estos receptores se unen a repeticiones directas como heterodímeros con otro receptor nuclear, el receptor retinoide X (RXR), esta clase de receptores está en el núcleo y se une al DNA en ausencia de ligando (Keppler et al., 2011). La tercera clase de NHR son los “receptores

huérfanos” siendo TFs que tienen una estructura similar a otros NHR, pero no se conocen sus ligandos asociados (Xie & Evans, 2001).

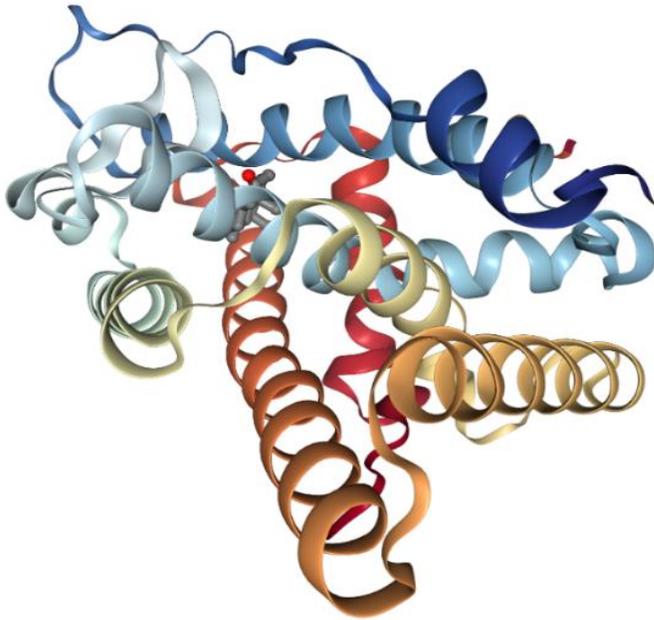


Fig. 7. Estructura cristalina del receptor de andrógenos (azul dominio N-terminal, de rojo dominio C-terminal) (Hur et al., 2004; Rose et al., 2018).

Los TF con cajas HMG codifican para proteínas del grupo de alta movilidad HMG-I, HMG-Y y HMG-C, participan en numerosos procesos biológicos entre ellos: transcripción, replicación, integración retroviral, recombinación genética esto debido a su capacidad para reconocer y alterar la estructura de sustratos de DNA y cromatina (Reeves, 2000). *In vitro* e *in vivo*, las proteínas HMG-Y se unen preferentemente al surco menor estrecho de regiones de DNA ricas en AT por medio de motivos peptídicos altamente conservados. *In vitro*, las proteínas HMG-Y tienen la capacidad de unirse selectivamente a estructuras de DNA distorsionadas y de doblar, desenrollar y sobreenrollar cadenas de DNA. La sobreexpresión transcripcional de los genes HMG-I, HMG-Y y HMG-C está altamente correlacionado con la proliferación celular y la transformación neoplásica en varios tipos de células y tumores humanos (Giese et al., 1991).

El dominio está bien conservado y consta de tres hélices α dispuestas en forma de L (**Fig. 8**). Este pliegue es mantenido por un núcleo hidrofóbico mayor y dos menores, el primero consiste en tres residuos aromáticos. La disposición relativa de estos tres residuos se mantiene en todas las estructuras con dominios HMG (Weir et al., 1993; Travers, 2000). La superficie cóncava del dominio HMG contacta con el surco menor del DNA. Además, tanto los dominios HMG específicos de secuencia como los no específicos de secuencia exhiben una fuerte preferencia por la unión a estructuras de DNA distorsionadas, DNA circular y DNA superenrollado (Travers, 2000).

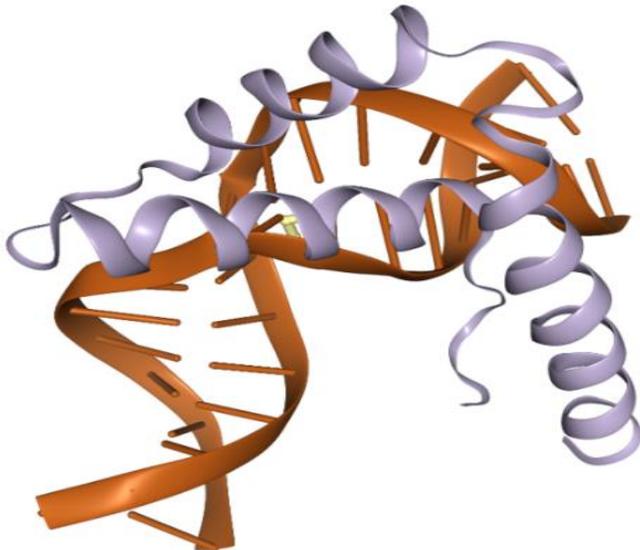


Fig. 8. Estructura cristalina del dominio HMG1 (gris) en complejo con DNA (naranja) (Ohndorf et al., 1999; Rose et al., 2018).

La familia bZIP se une a una gran variedad de elementos de respuesta (Seldeen et al., 2008) y comparten una arquitectura modular central compuesta por un conjunto de dos hélices α específicas dentro del segmento largo de cierre básico de leucinas (ZIP) flanqueado por un dominio de transactivación (TA) en el extremo N-terminal o C-terminal (Seldeen et al., 2010). El dominio ZIP está precedido por dos subdominios funcionales bien definidos denominados región básica (BR), que funciona como unión al DNA (Berger et al., 1998; Pogenberg et al., 2014) a través de interacciones entre los lados hidrofóbicos de sus hélices en las regiones promotoras (**Fig. 9**). El ZIP contiene una repetición heptada de leucina u otros

aminoácidos hidrofóbicos voluminosos como isoleucina, valina, fenilalanina o metionina (Jakoby et al., 2002; Seldeen et al., 2010) que se posiciona exactamente en nueve aminoácidos hacia el dominio C-terminal creando una hélice anfipática altamente conservada. La capacidad de formar homo y heterodímeros está influenciada por la atracción electrostática y la repulsión de residuos polares que flanquean la superficie de interacción hidrofóbica de las hélices (Jakoby et al., 2002).

La capacidad de formar heterodímeros para unirse a una hélice enrollada dimérica subyace en la base de su especificidad y diversidad para el reconocimiento de un amplio espectro de elementos promotores con alta selectividad. Por ejemplo, la familia humana bZIP se compone de 53 miembros distintos (Dröge-Laser et al., 2018), lo que implica que hay potencialmente más de 2000 dímeros bZIP distintos para el reconocimiento (Seldeen et al., 2010).

Una familia importante en los bZIP son los factores de transcripción v-maf fibrosarcoma musculoaponeurótico aviar oncogen homólogo protooncogen (MAF, del inglés v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog protooncogene) que se dividen en dos subgrupos: las proteínas MAF grandes y proteínas MAF pequeñas. Las proteínas MAF grandes, por ejemplo MAFB, contienen entre 236-370 aminoácidos y se caracterizan por la presencia de un dominio N-terminal que permite la activación transcripcional. Las pequeñas proteínas MAFK, MAFF y MAFG, contienen 149-162 aminoácidos y carecen de dominios de activación (Wang et al., 1999).

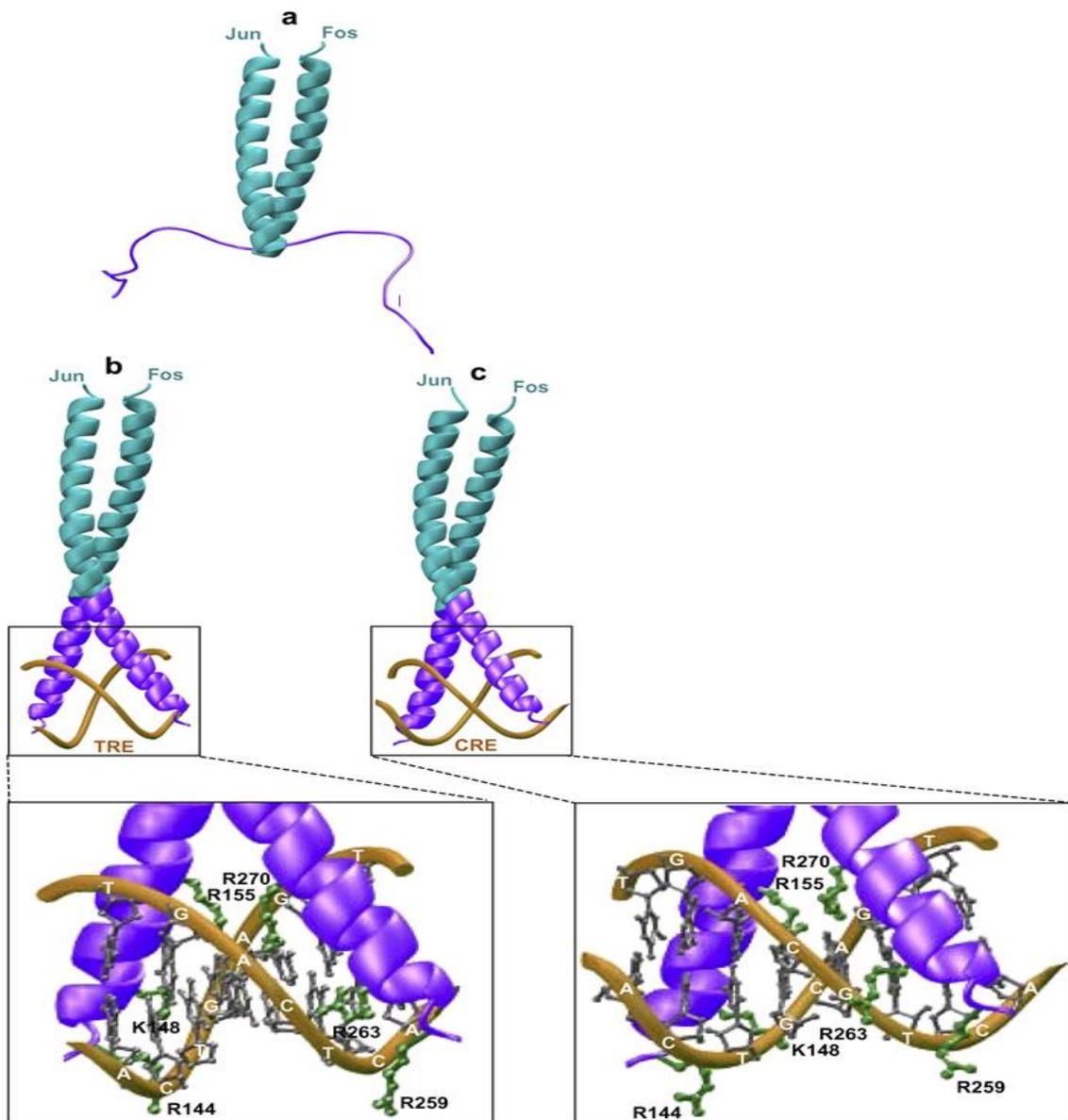


Fig. 9. Estructuras bZIP del heterodímero Jun-Fos. (a) El dominio ZIP se muestra en turquesa y BR en morado. (b) dominios bZIP de Jun-Fos en complejo con el sitio TRE (amarillo). (c) heterodímero Jun-Fos en complejo con el sitio CRE (amarillo). El recuadro muestra las interacciones intermoleculares entre los residuos básicos críticos (verde) y las bases de DNA (gris) más los fosfatos del esqueleto (amarillo) (Seldeen et al., 2008).

1.4. *MAFB*

El TF *MAFB* (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein b) es miembro de la familia MAF de tipo bZIP que se unen a elementos de reconocimiento de MAF (MARE) y que incluye una extensión de tres bases del motivo CRE/TRE (Kataoka et al., 1994). El gen *MAFB* se expresa en células pancreáticas α y β , podocitos del glomérulo renal, rombómero 5 del cerebro posterior embrionario, timo, glándula paratiroides y cutículas capilares (Eychéne et al., 2008; Sultana et al., 2009). También desempeña un papel fundamental en la regulación de la hematopoyesis (Tran et al., 2017).

El gen *MAFB* humano, se localiza dentro del cromosoma 20, bandas q11.2–q13.1. El marco de lectura abierto (ORF) del gen *MAFB* humano contiene un solo exón y no contiene intrones (intronless), el gen abarca aproximadamente 3 kilobases y codifica para una proteína con 323 aminoácidos (aa), la proteína tiene 84% de identidad y 92% de similitud con la proteína de roedores (Wang et al., 1999). En términos estructurales, la proteína contiene un dominio de activación transcripcional predominante de prolinas, serinas y treoninas en el N-terminal (aa 1–110); seguido de una región de homología extendida (EHR), que se pliega en un pequeño dominio de tres hélices o hélice-giro-hélice (aa 211–237) que contribuye a la especificidad de unión a DNA de la proteína (Kataoka et al., 1996). El siguiente dominio representa la BR que se une al surco principal de cada sitio por medio del enlace T-MARE (aa 238–261). El último segmento forma la región ZIP que establece el ensamblaje homodimérico (residuos 262–305) ubicado en el C-terminal (**Fig. 10**). El ZIP y el BR, constituyen la región básica estructural del bZIP, que se pliega en una hélice larga e ininterrumpida de 75 aa con más de 20 vueltas helicoidales (Wang et al., 1999; Pogenberg et al., 2014).

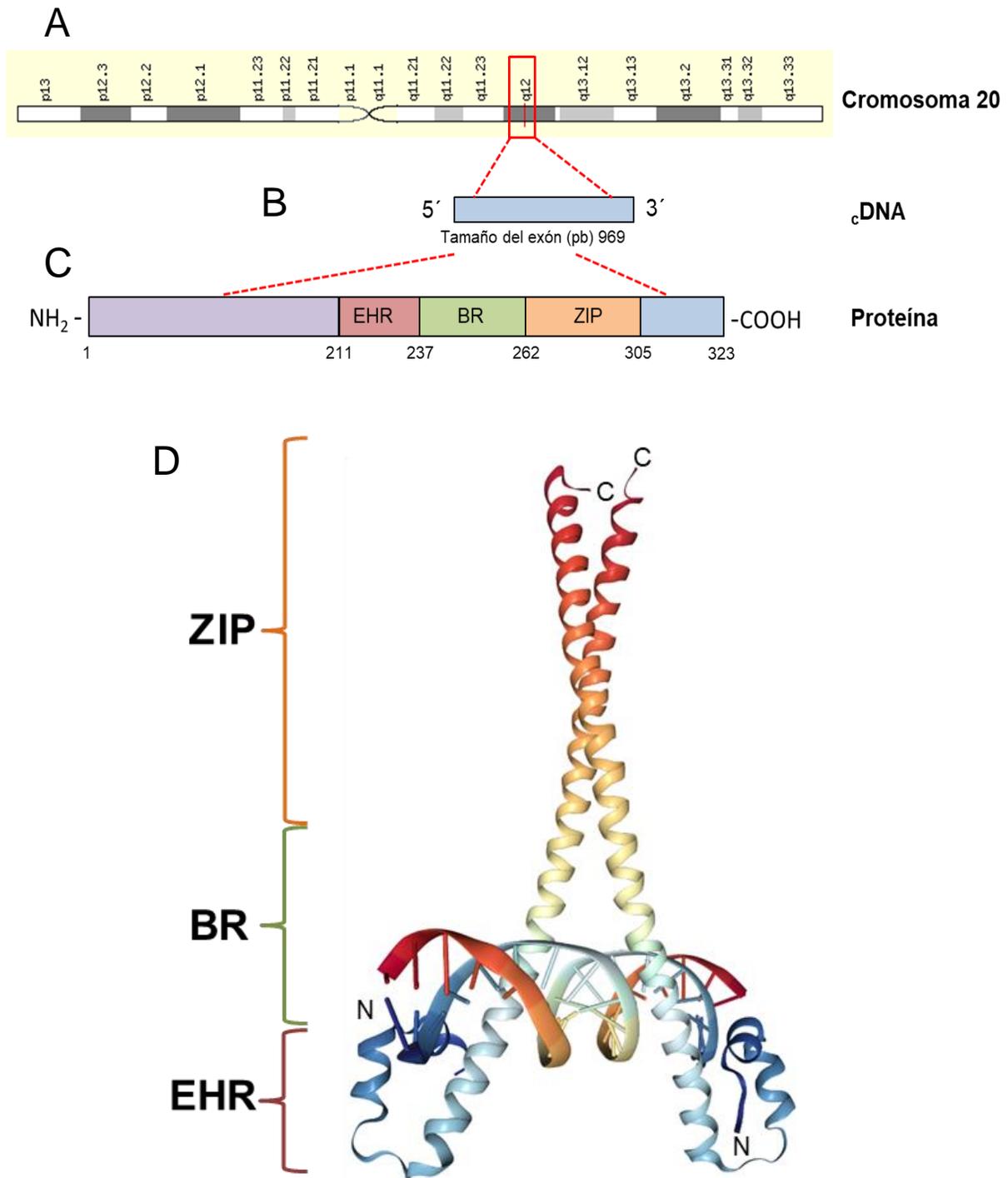


Fig. 10. Organización estructural y funcional de *MAFB*. A) se muestra la región q11.2-13.1 del cromosoma 20 en la cual se localiza el gen *MAFB*. B) cDNA de un solo exón. C) la proteína contiene los dominios EHR, BR y ZIP. D) se indican los segmentos estructurales ZIP, BR y EHR en unión con el DNA (azul dominio N-terminal, de rojo dominio C-terminal) (Pogenberg et al., 2014; Rose et al., 2018).

El gen *MAFB* es altamente expresado en el mesénquima del GT masculino durante la formación uretral (Nishida et al., 2008). Estudios recientes sugieren que *Mafb* se requiere para la masculinización uretral embrionaria dependiente de andrógenos (**Fig. 11 A**). Los embriones de ratones Knockout (KO) de *Mafb* masculinos exhiben fenotipos similares a los de hipospadias humanas, en los que el prepucio no se fusiona a lo largo de la línea media ventral (**Fig.11 B**, flecha roja). Además, el análisis histológico reveló que los GT masculinos *mafb* KO exhibían formación uretral defectuosa (**Fig. 11 C-H**). Es de destacar que el tamaño del GT masculino en KO fue similar al de los machos de tipo silvestre, a pesar de la presencia de defectos uretrales graves (**Fig. 11 A y B**). Estos resultados indican que los procesos de masculinización embrionaria que regulan el tamaño de los órganos son independientes de las funciones de *MAFB*. Además, la exposición al andrógeno en ausencia de *MAFB* no logra masculinizar la uretra. Todo en conjunto, los resultados indican que *MAFB* es un gen de masculinización esencial para la formación embrionaria de la uretra controlado mediante andrógenos.

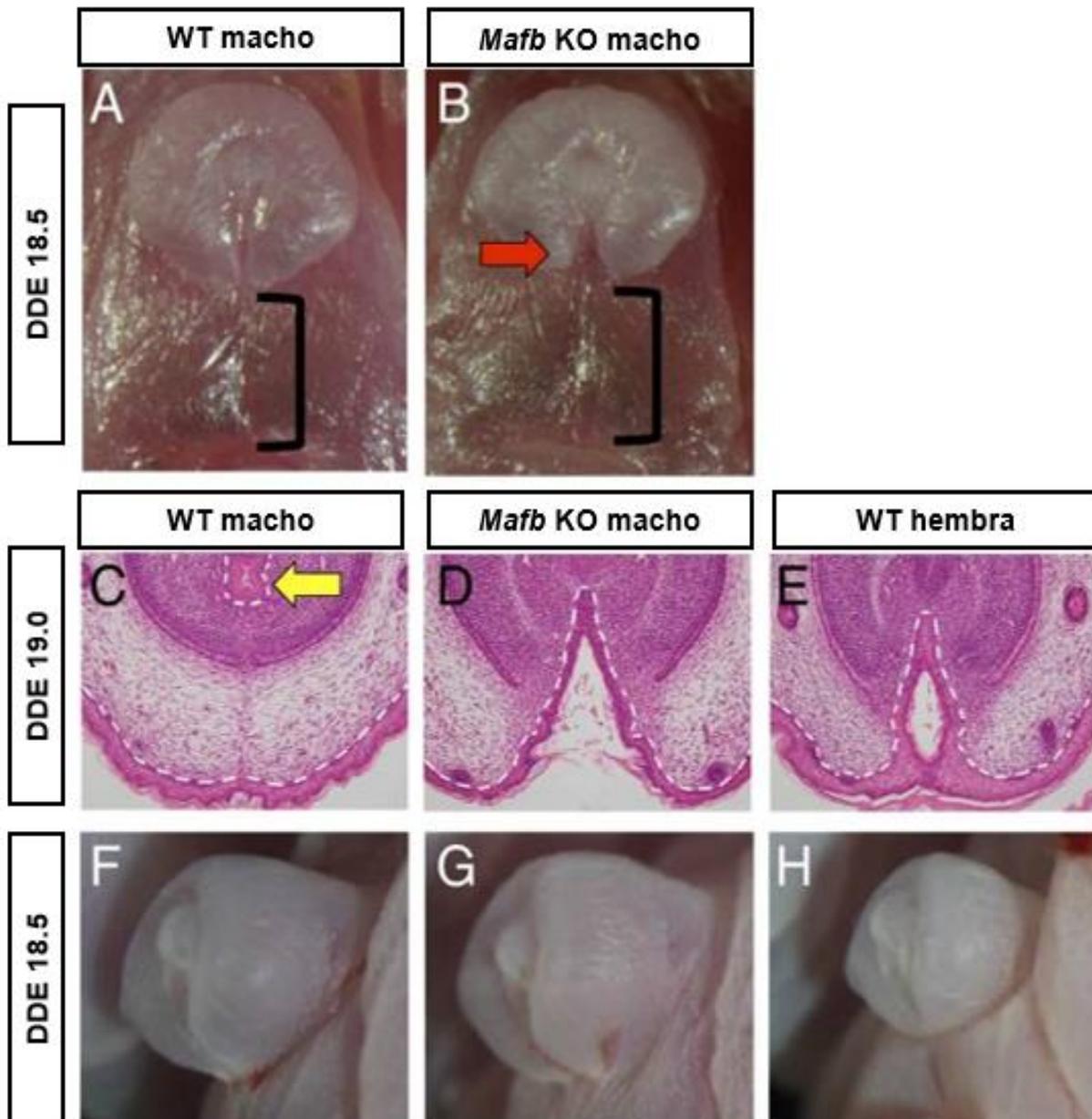


Fig. 11. *MAFB* es esencial para la masculinización de la uretra, pero no para la masculinización del tamaño del GT (A y B). Tinción H&E (C – E) de machos de tipo silvestre (WT), machos *Mafb* KO y hembras WT en 19.0 días de desarrollo embrionario (DDE). F–H apariencia de machos WT, *mafb* KO machos y hembras WT en DDE 18.5. Región perineal A y B, flecha roja en B indica la formación uretral defectuosa en GT masculinos *Mafb* KO. Flecha amarilla en C, uretra tubular. Líneas discontinuas en C – E, borde epitelial-mesenquimal (Suzuki et al., 2014).

1.5. *Desórdenes del desarrollo sexual*

Los desórdenes del desarrollo sexual (DSD) son definidos como condiciones congénitas en las que el desarrollo del sexo cromosómico, gonadal o anatómico es atípico (Hughes et al., 2006). El diagnóstico molecular establece la causa genotípica (hereditaria) de DSD en pacientes con cariotipo 46,XY o 46,XX (**Fig 12, A y B**).

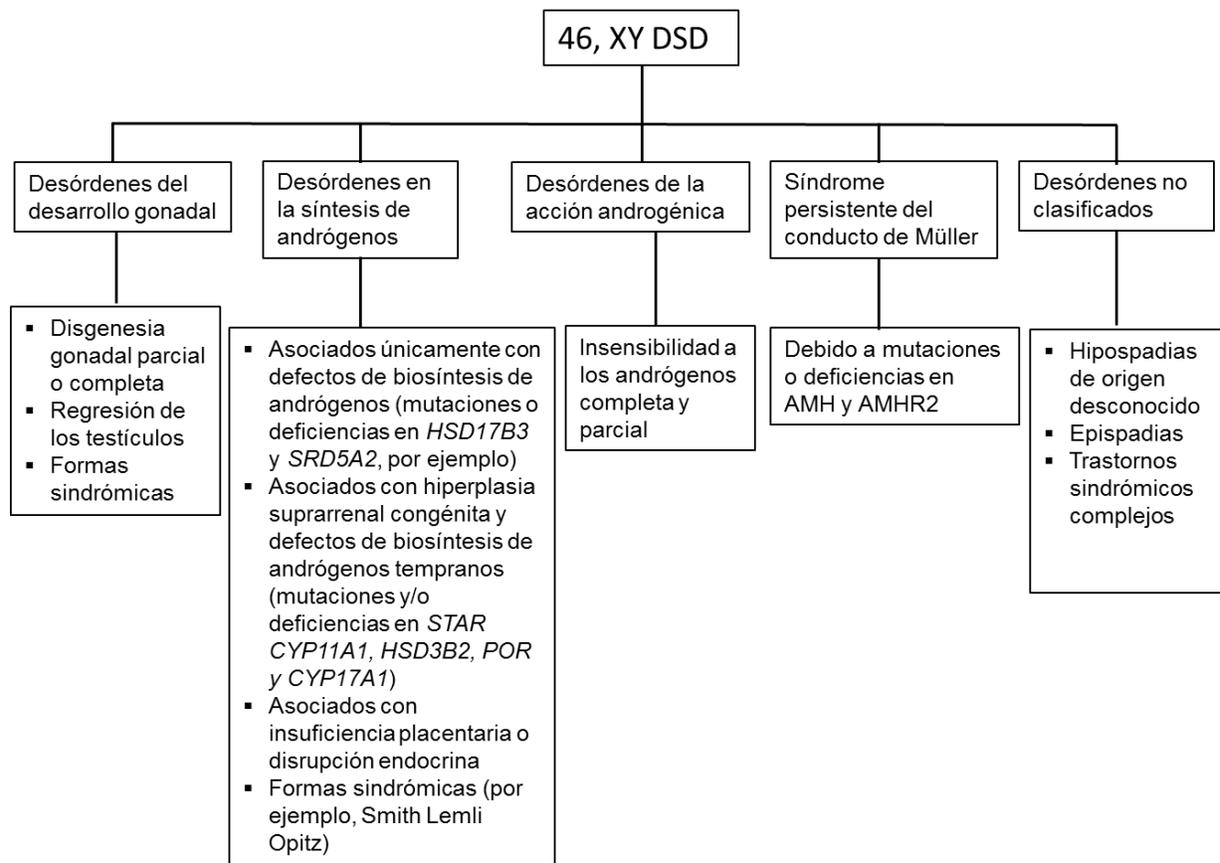
Los DSD asociados a cromosomas sexuales son ejemplificados por (**Fig 12, C**); síndrome de Turner (45,X0) caracterizado con la pérdida completa o parcial de un cromosoma X y el síndrome de Klinefelter (47,XXY) con la adición de un cromosoma X (Heard & Turner, 2011). El síndrome XYY, asociado con la adición de un cromosoma Y (comúnmente 47,XYY, nacimientos masculinos vivos 1:1000) y el síndrome XXX, asociado con la adición de un cromosoma X (comúnmente 47,XXX, 1:1000 nacimientos vivos de mujeres) (Green et al., 2019).

Los DSD 46,XY se caracterizan clínicamente por presentar genitales externos ambiguos o femeninos, causados por una masculinización intrauterina incompleta e hipospadias aisladas (Mendonca, 2009). Por lo tanto, estos se clasifican como defectos de la determinación testicular, defectos en la síntesis de andrógenos o su acción (Vilela et al., 2007), defectos en la AMH o su receptor (AMHR) (Ogata et al., 2009). Los DSD 46,XX son desordenes del desarrollo gonadal ovárico como DSD ovotesticular, exceso de andrógenos fetales, deficiencia de aromatasa y P450 oxidoreductasa (Lee et al., 2006).

Las hipospadias son definidas como una alteración en la abertura uretral del pene y son clasificadas en tipo anterior, medio y posterior. La ambigüedad genital afecta

aproximadamente al 0.5% de los recién nacidos masculinos (Baskin & Ebbers, 2006). Las hipospadias son causadas principalmente por defectos androgénicos y aparece como una anomalía aislada o en asociación con otras anomalías genitales como micropene y criptorquidia. A la fecha, aunque se han realizado análisis de mutaciones para múltiples genes implicados en los efectos de andrógenos, como *SRD5A2* y *NR3C4*, las mutaciones patológicas se han identificado solo en una porción muy pequeña de pacientes (Ferraz-de-Souza & Achermann, 2008). Estos reportes son consistentes y dejan en claro que las hipospadias son una condición altamente heterogénea sujeta a múltiples factores genéticos. Al respecto, se han identificado varios genes candidatos como *ATF3*, *FKBP52*, *FGFR2*, *FGF8*, *FGF10*, *BMP7*, *ESR1* y *ESR2* (Ogata et al., 2009).

A)



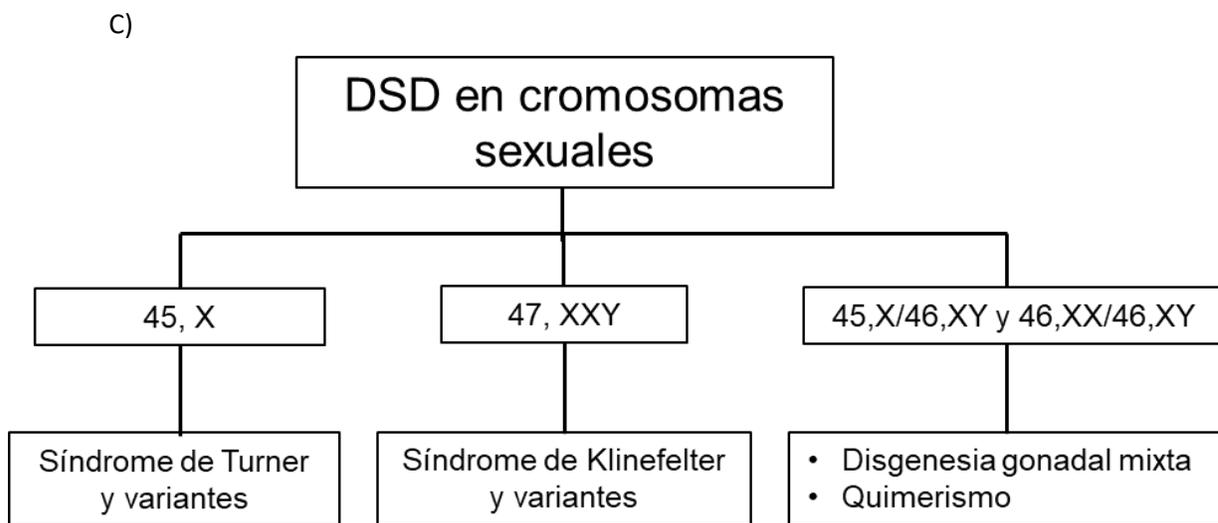
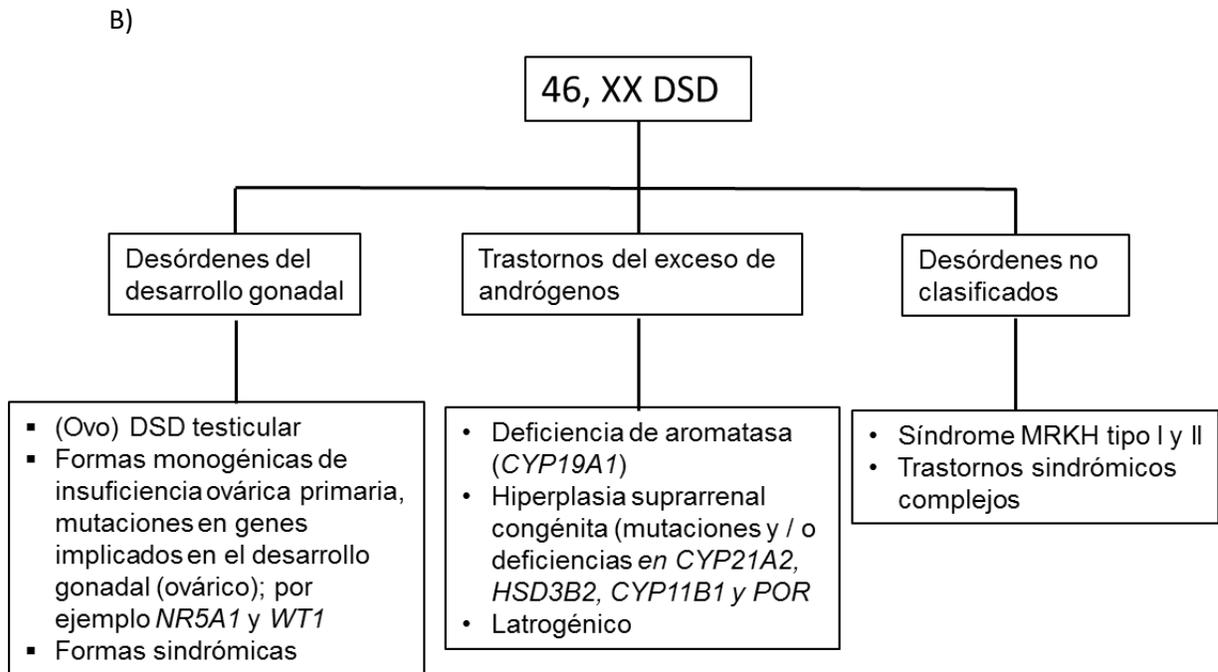


Fig. 12. Clasificación de los DSD en pacientes con cariotipo 46,XY (A). DSD en pacientes con cariotipo 46,XX (B). DSD en cromosomas sexuales, Síndrome de Turner, Klinefelter y disgenesia gonadal mixta (C).

2. Justificación

Estudios recientes en ratones han identificado al gen *Mafb* como un factor de transcripción esencial para masculinización y formación de la uretra embrionaria. Los ensayos demostraron que los genitales externos de los machos Knockout para *Mafb* exhiben defectos en la formación de la uretra. En humanos, la etiología molecular para explicar las malformaciones uretrales definidas como hipospadias es poco conocida; por lo tanto sugerimos que el gen *MAFB* puede ser un posible candidato para investigar estas anomalías embrionarias. Por tales motivos en esta investigación se realizarán ensayos moleculares para identificar mutaciones en el gen *MAFB* en pacientes de origen mexicano con cariotipo 46,XY y fenotipificados clínicamente y únicamente con hipospadias aisladas.

3. Hipótesis

Si el gen *Mafb* de ratones es importante para la masculinización de la uretra, por consiguiente el gen *MAFB* en humanos podría ser un factor responsable de la masculinización uretral embrionaria y estar relacionado a hipospadias.

4. Objetivo general

Identificar y determinar la contribución del gen *MAFB* como causa molecular de desórdenes de desarrollo sexual 46,XY asociados a hipospadias aisladas.

Objetivos particulares

- Identificar mutaciones en el gen *MAFB* de 24 pacientes 46,XY fenotipados clínica y exclusivamente con hipospadias aisladas.
- Analizar mediante secuenciación la región codante del gen *MAFB* en individuos con desorden de desarrollo sexual 46,XY asociados a hipospadias aisladas.
- Se utilizarán bases de datos para diferenciar la presencia entre posibles polimorfismos y mutaciones del gen *MAFB*.

5. Metodología

Pacientes

Se utilizó DNA genómico (gDNA) de 24 pacientes (niños de 3 meses a 9 años de edad) 46,XY de diferentes regiones de México diagnosticados al nacimiento única y exclusivamente con hipospadias aisladas. El diagnóstico de las hipospadias se basó en el examen físico. Clínicamente los pacientes no presentaron otras enfermedades o alteraciones endocrinas. Nosotros obtuvimos el consentimiento informado para estudiar las muestras biológicas a partir de DNA genómico (gDNA), por lo tanto cualquier determinación hormonal fue excluida. El Comité de Ética Institucional para la Investigación en Humanos aprobó el protocolo para esta investigación (BRE-556-13/16-1). Como estudios iniciales se incluyeron los genes *NR3C4*, *SRD5A2*, *AKR1C2*, *AKR1C3*, *AKR1C4*, *HSD17B6* y *HSD17B3*.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este proyecto de investigación son grado biología molecular y son descritos en el anexo. Todo el material se esterilizó por autoclave o por filtración.

5.1. Extracción de gDNA

Se extrajeron 10 mL de sangre periférica de pacientes y controles, la muestra se colocó en tubos cónicos de 50 mL con 200 µL de EDTA 0.5 M pH 8 y se mezcló

por inversión. Los tubos se colocaron en hielo y se llevaron a 35 mL con solución fría de sacarosa-tritón 2X. Se llevó a un volumen final de 50 mL con agua estéril, desionizada y destilada (ddH₂O), se mezcló por inversión. Las muestras se dejaron sobre hielo durante 10 minutos (mezclando en repetidas ocasiones por inversión). Para obtener el precipitado celular las muestras se centrifugaron a 1000 xg por 15 minutos a 4°C. De manera cuidadosa se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 5 mL de solución de sacarosa-tritón 1X con posterior centrifugación a 1000 xg por 15 minutos a 4°C. El precipitado se resuspendió en 3 mL de solución de lisis nuclear, con 108 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% y 100 µL de proteinasa K, se mezcló y se colocó en una incubadora con agitación a 50°C aproximadamente 2 horas. El contenido se transfirió a tubos cónicos estériles de 15 mL y se agregó 1 mL de NaCl saturado, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugaron a 1000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos de 15 mL estériles a los cuales se agregaron 2 volúmenes de etanol frío y se mezcló por inversión hasta que el gDNA se precipitó. Se extrajo el gDNA precipitado con una pipeta Pasteur sellada y se lavó con etanol al 70% durante 30 segundos. El gDNA se extrajo y se dejó secar por 30 segundos a temperatura ambiente. El gDNA adherido a la pipeta Pasteur se resuspendió en 400 µL de solución TE. Se agitó suavemente hasta que se desprendiera de la misma. Se dejó disolver el gDNA a temperatura ambiente. La pureza y concentración de la muestra se cuantificó espectrofotométricamente (260/280 nm) en un espectrofotómetro (DU® 650, Beckman, Fullerton, CA, USA).

5.2. Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se realizó un PCR para amplificar el gen *MAFB* (NM_005461.4), para ello se utilizaron 4 oligonucleótidos específicos para la amplificación. La región 5' (748 pares de bases) se amplificó con los oligonucleótidos HSFB1 y HSFB2, para la región 3' (563 pares de bases) se utilizó HSFB3 y HSFB4, de tal manera que comparten una región de traslape de 40 pares de bases entre estos amplicones. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el programa IDT con las condiciones establecidas en la **Tabla 1** (<https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>):

Tabla 1. Secuencia y características de los cuatro oligonucleótidos utilizados para amplificar por PCR la región 5' (HSFB1 y HSFB2) y 3' (HSFB3 y HSFB4) el gen *MAFB* de humano.

Oligonucleótido	Secuencia de Oligonucleótidos	GC %	Tamaño del amplicón
HSFB1	5'CCAGCTCTTCTCCGCTCTT 3'	57.9	748 pares de bases
HSFB2	3'GAGCTGGTCGTCGGAGAA 5'	61.1	
HSFB3	5'GCAACAGCTGCCCACTA 3'	58.8	563 pares de bases
HSFB4	3'CCTCTCGCTCAAGTCAAACA 5'	50	

Determinación de parámetros de amplificación por PCR

Para determinar los parámetros ideales en la amplificación del gen *MAFB in vitro*, se hicieron ensayos con diversas temperaturas en el alineamiento o unión de los oligonucleótidos, las temperaturas fueron: 58°C; 60°C; 62°C y 64°C. Así como también se realizaron ensayos modificando la concentración de MgCl₂ a 2.5 mM y 2.0 mM.

Establecidas las condiciones óptimas de temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos y concentración de $MgCl_2$ se procedió a realizar el PCR en un termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA). La **Tabla 2** muestra los reactivos utilizados para cada reacción de PCR, así como concentraciones y sus respectivos volúmenes, mientras que la **Tabla 3** presenta las condiciones de la reacción de PCR.

Tabla 2. Reactivos empleados para amplificar por PCR la región 5' (HSFB1 y HSFB2) y 3' (HSFB3 y HSFB4) del gen *MAFB*. Desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP's, del inglés deoxyribonucleotide triphosphate), Cloruro de magnesio ($MgCl_2$), dimetilsulfóxido (DMSO).

Reactivo para PCR punto final	Volumen (μ L) para 1 reacción	[] final
H ₂ O	9.8	-
Solución amortiguadora 5X	4.0	1X
dNTP's (10 mM)	0.5	0.25 mM
HSFB1/HSFB3 (20 μ M)	0.5/0.5	0.5 μ M
HSFB2/HSFB4 (20 μ M)	0.5/0.5	0.5 μ M
GoTaq [5 U/ μ L]	0.2	0.05 U/ μ L
$MgCl_2$ [25 mM]	2.0	2.5 mM
DMSO 20%	1.0	1 %
gDNA	1.5	-
Volumen total	20	-

Tabla 3. Condiciones de amplificación de los fragmentos del gen *MAFB* de humano.

No. de Ciclos	Temperatura 1	Temperatura 2	Temperatura 3
1	94°C / 3 min		
30	94°C / 30 s	62°C /30 s	72°C /30 s
1			72°C /3 min

5.3. Purificación de gDNA mediante electroelución

Terminada la reacción, los productos de PCR se sometieron a electroforesis para lograr la separación de los fragmentos amplificados, para esto se tomaron los 20 μ L de reacción y se le añadió 12 μ L de solución de carga (Flexi buffer 5X Green GoTaq® de PROMEGA, Madison, WI, EUA), se mezclaron y se colocaron en un gel de agarosa al 1% teñido con 0.7 μ L de bromuro de etidio. Las reacciones se compararon y se analizaron con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (DNA Molecular Weight Marker XIV de ROCHE®, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA). Se dejó correr la electroforesis en una solución TBE 0.5X a 100 Volts durante 50 minutos. Transcurrido el tiempo, se visualizó en un transiluminador con UV identificando las bandas de interés de acuerdo a su tamaño esperado (aproximadamente de 750 pares de bases de la región 5' y 560 pares de bases de la región 3').

Las membranas de diálisis 7 kD Spectra/Por® de Spectrum Laboratories, Inc, Broadwick Street, CA, EUA) se lavaron mediante ddH₂O y equilibradas en TBE 0.5X. Se colocaron las muestras en las membranas y se les adicionaron TBE 0.5X hasta cubrir la muestra. La separación de los amplicones del fragmento de

agarosa se realizó dentro de una cámara de electroforesis y se dejó correr a 100 volts durante 15 minutos. El amplicón se recuperó de la solución de TBE 0.5X.

La purificación de las muestras se llevó a cabo en columnas Ultra-4 centrifuga (filter unit, 10kDa de Amicon®, Merck Millipore Ltd, Darmstadt, Alemania). Se adicionaron 4 mL de ddH₂O. Se centrifugó a 4000 xg durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se procedió a eliminar el centrifugado y se recuperó el sobrenadante almacenándolo en tubos Eppendorf de 0.5 mL a 4°C para su posterior análisis de concentración y pureza por método espectrofotométrico.

Se realizó una electroforesis con la finalidad de evaluar que tan eficiente fue el proceso de purificación, para ello se preparó un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se requirieron de 5 µL de la muestra y 3 µL de la solución de carga (Flexi buffer 5X Green GoTaq® de PROMEGA, Madison, WI, USA). Las muestras se compararon con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (DNA Molecular Weight Marker XIV de ROCHE®, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), se dejó correr el gel en amortiguador TBE 0.5X a 100 volts durante 60 minutos.

Transcurrido los 60 minutos, se procedió a la visualización del gel en un transiluminador con UV (*BIO-RAD, Molecular imager® ChemiDoc™ XRS+ Imaging System*) y se analizó con el software *Image Lab™ versión 4.1*.

5.4. Secuenciación

Una vez obtenidas las muestras purificadas, se procedió a utilizar el estuche de secuenciación BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), a cada una de las muestras se les realizó un PCR, la **Tabla 4** presenta los reactivos y volúmenes empleados por cada reacción.

Tabla 4. Reactivos empleados en secuenciación.

Reactivo para PCR punto final	Volumen (μL) para 1 reacción
Big Dye Terminator reaction Mix	2.0
Big Dye Solution 5X	1.0
ddH ₂ O	5.0
Primer 1.6 pmol	1.0
DNA (100 ng/ μl)	1.0
Volumen final	10

Las muestras se colocaron en un termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), las condiciones que presentó el programa para esta reacción fueron: 1 ciclo a 95°C por 1 min, 35 ciclos a 96°C durante 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos, finalmente 1 ciclo a 4°C.

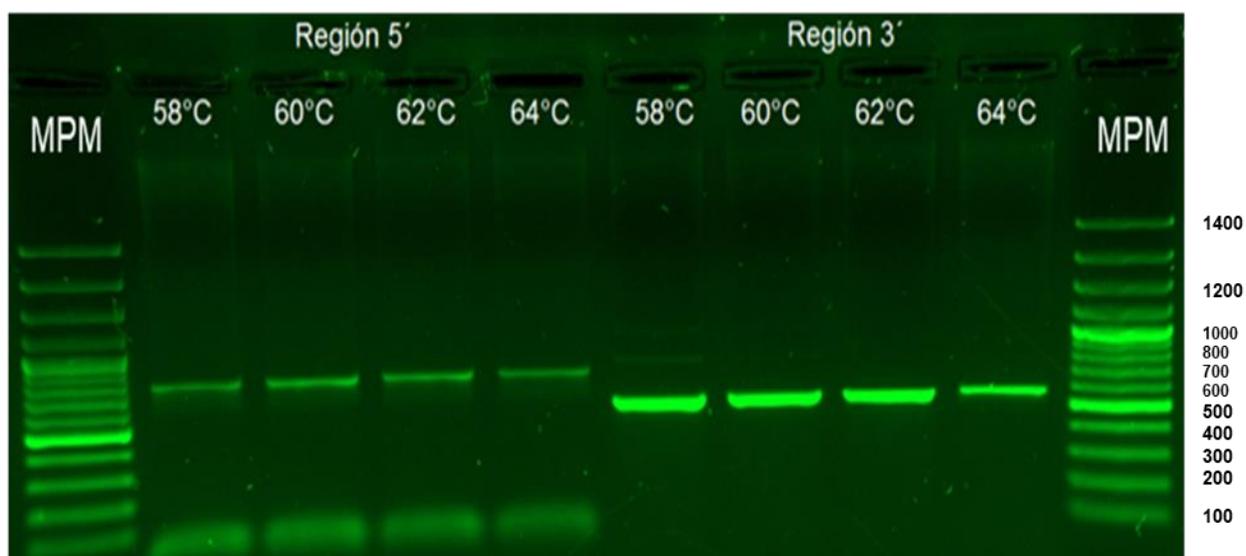
El producto de PCR se purificó utilizando 45 μL de solución SAM y 10 μL de solución BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Posteriormente se agitaron las muestras durante 30 minutos y se centrifugaron por 2 minutos a 1000 xg en una microcentrifuga modelo 5415 C de Eppendorf, se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf estériles.

Los productos amplificados y purificados se analizaron en un secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Finalmente, los resultados se analizaron por medio del software Chromas Lite 2.6. Los productos de secuenciación se leyeron en ambos sentidos por triplicado.

6. Resultados

La secuencia del gen *MAFB* está conformado por 969 nucleótidos con un único exón que comprende todo el marco de lectura abierto que codifica para la proteína. Por tal motivo el gen se dividió en dos regiones de 750 (región 5') y 560 pares de bases (región 3'). Cada oligonucleótido estuvo caracterizado por una longitud de 18-24 pares de bases y un contenido de GC del 50-60% que proporcionó una temperatura de alineamiento del oligonucleótido óptima de 55-65°C. La temperatura óptima de alineamiento del oligonucleótido se determinó mediante un gradiente de temperatura a 58°C; 60°C; 62°C y 64°C (**Fig. 13**). En el amplicón correspondiente al extremo 3' se observa un decremento de intensidad de la banda conforme aumenta la temperatura, en el extremo 5' se observa que la mayor amplificación de la región 5' fue a una temperatura de 62°C por lo que se determinó esta temperatura para la amplificación del gen *MAFB*, se realizó un ensayo variando la concentración de $MgCl_2$ a 2.5 mM y 2.0 mM observando un mejor desempeño de la Taq polimerasa a una concentración de 2.0 mM de $MgCl_2$.

(a) $MgCl_2$ a 2.5 mM



(b) MgCl_2 a 2.0 mM

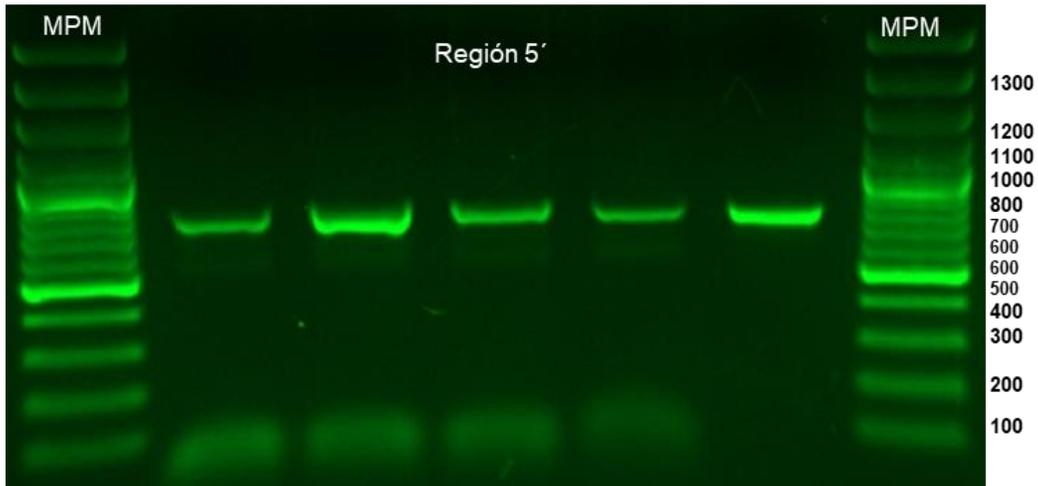


Fig. 13. Determinación experimental de los parámetros de amplificación para las regiones 5' y 3': Temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos mediante gradiente de temperaturas a 58°C; 60°C; 62°C y 64°C. Se realizaron ensayos modificando la concentración de MgCl_2 a 2.5 mM (a) y 2.0 mM (b). MPM= marcador de peso molecular de 100 pares de bases. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1 %.

Determinados los parámetros de amplificación se realizó la reacción de PCR con las condiciones de la **Tabla 2** se amplificó la región 3' y 5' de cada uno de los 24 pacientes. Los productos de PCR resultaron ser del tamaño esperado de 750 y 560 pares de base (**Fig. 14**). Esto se pudo comprobar al comparar los productos con un MPM de 100 pares de bases.

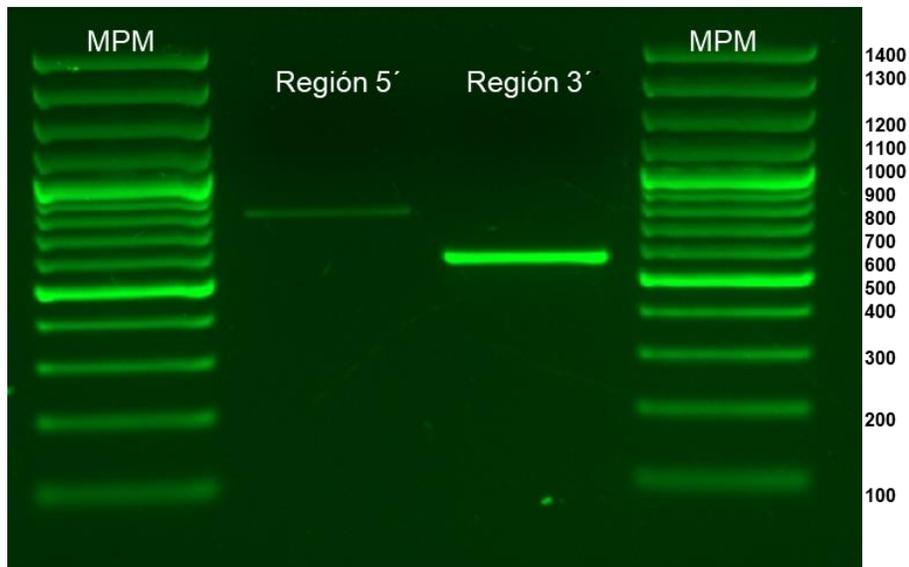


Fig. 14. Productos de PCR comparado con un MPM de 100 pares de bases, con electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Se realizó una electroforesis para corroborar que los resultados de la purificación para cada fragmento 5' y 3' (**Fig. 15**) sean correctos con los tamaños esperados de los amplicones del gen *MAFB* en los 24 pacientes y sin presentar productos inespecíficos.

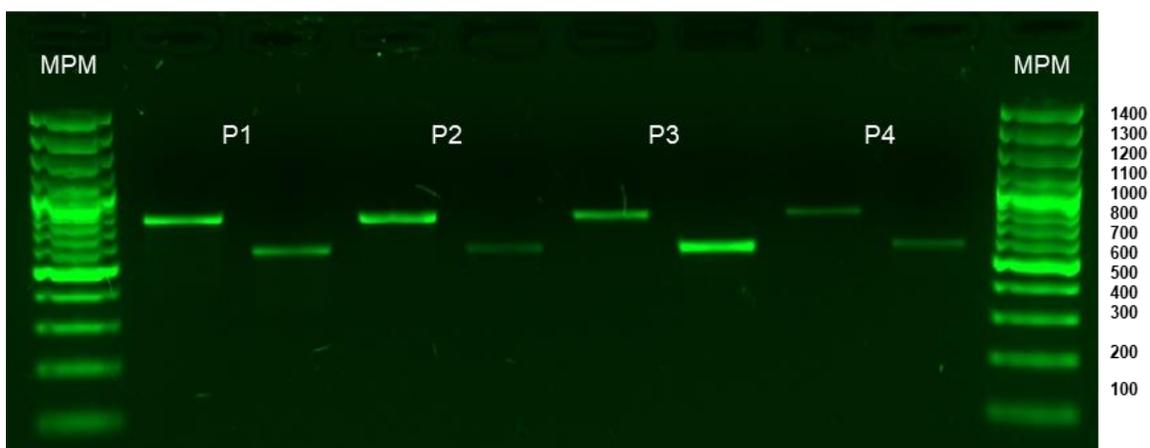
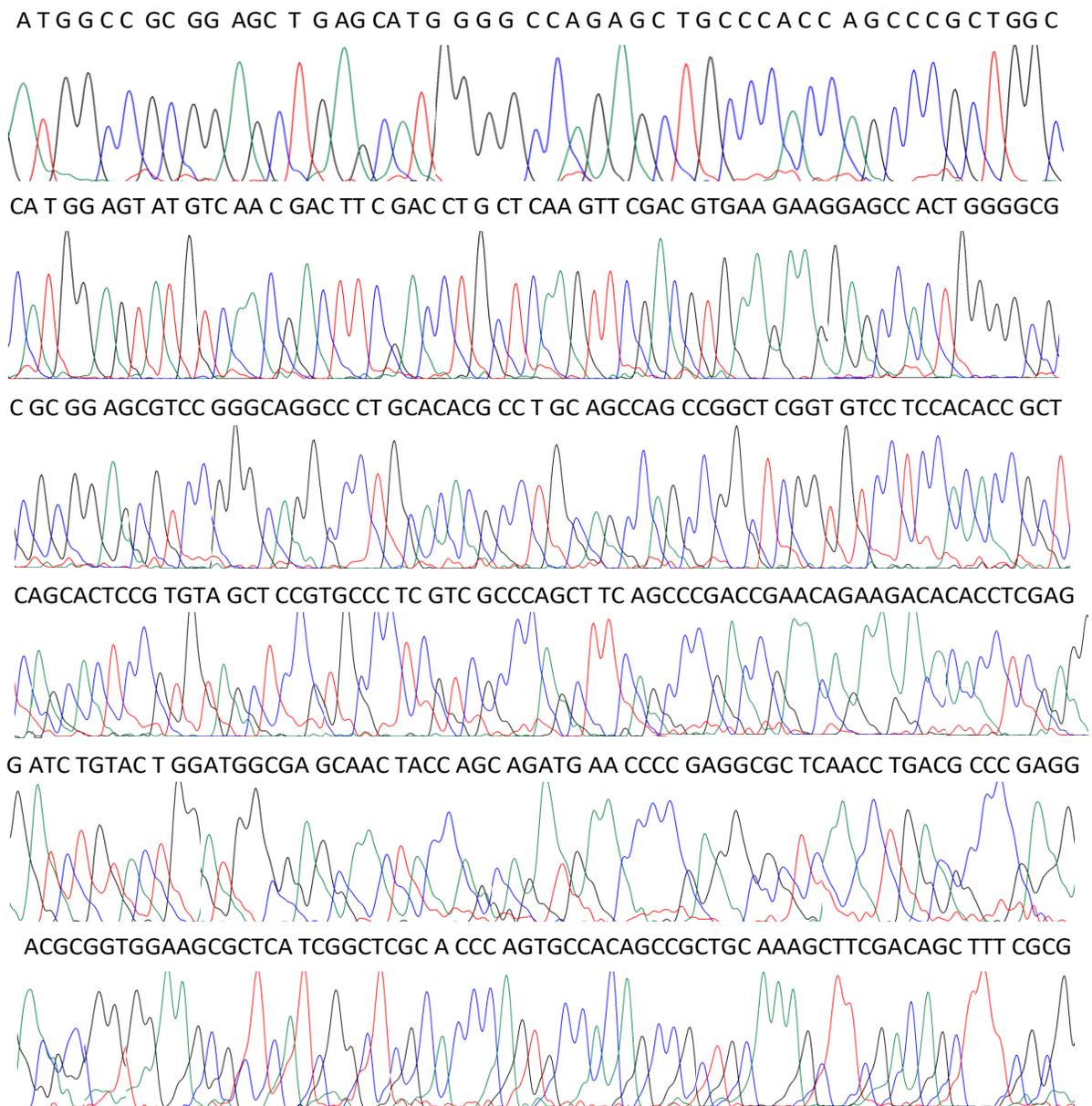
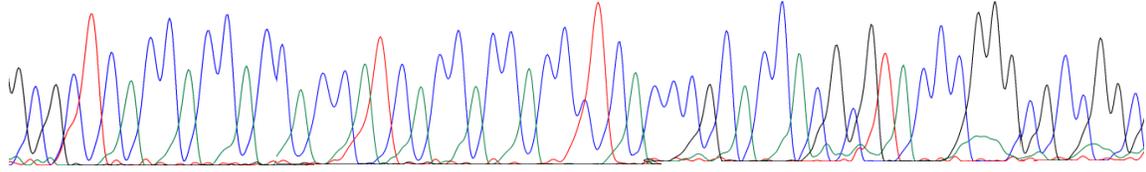


Fig. 15. Purificación de los fragmentos 5' y 3' de 4 pacientes 46,XY-hipospadias mediante electroelución y columnas Amicon Ultra 4K. Electroforesis en geles de agarosa al 1 %. MPM= marcador de peso molecular de 100 pares de bases.

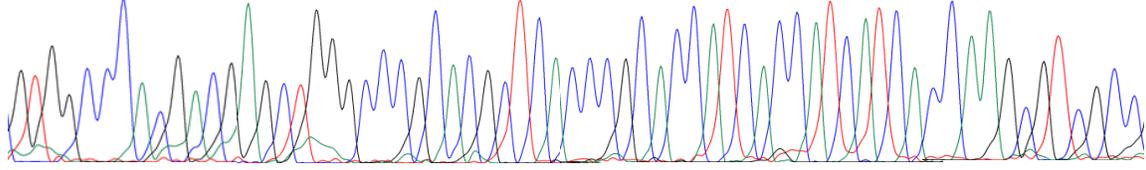
Terminada la purificación de los 2 fragmentos 5' y 3' (**Fig. 16**). De cada uno de los 24 pacientes, se procedió a la secuenciación, cada fragmento fue secuenciado en dirección 5' a 3', cada par de secuencia coincide en una región de aproximadamente de 40 pares de bases obteniendo así el exón completo de cada paciente. Para realizar una corroboración del orden de los nucleótidos, las regiones también fueron secuenciadas de dirección 3' a 5', dando el total de 96 secuencias analizadas.



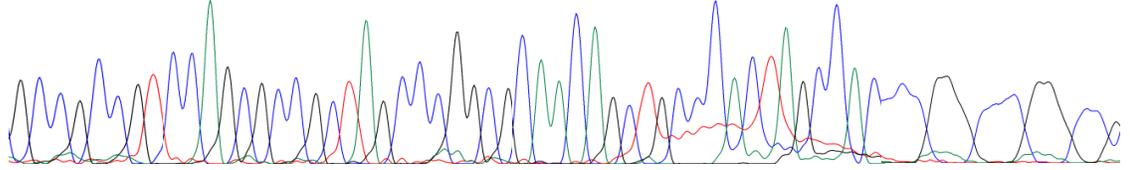
GCG C TCA CC A CC A CCA CC AT C ACC A CCAC CC T C ACCC GCA CCAC GCGTA CCC GGGCG CC GG C



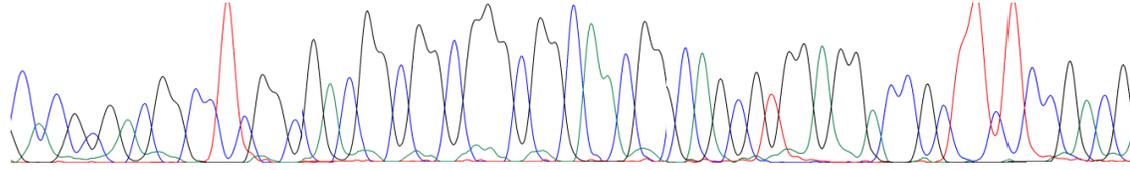
GT GG CCC ACGAC G AGCTGGGCCC GCAC GCT CACCC GC ACC ATC ACC ATC ATC A CC AA GCGTCGCC



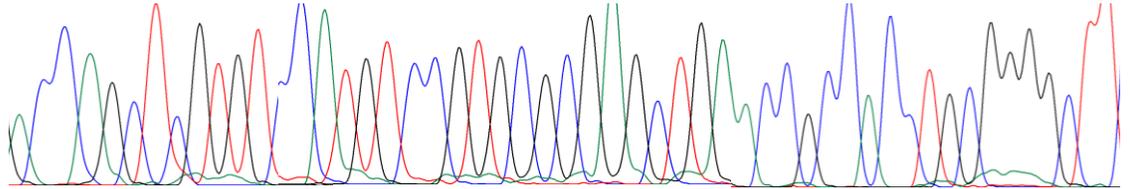
G CC G CCG T CC AGCG CCGC TAG CCCGGCGC AAC AGC TGCCC ACT AGCC ACCCCGGGCCCGGGCCG



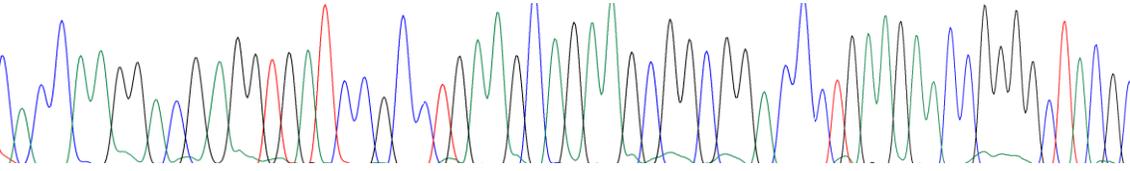
C ACGC GACGG CCTCGGCGA CGGCGG CGGGCGGCAACGG C AG CGTGGAGGACCGC TTC T CC GACG



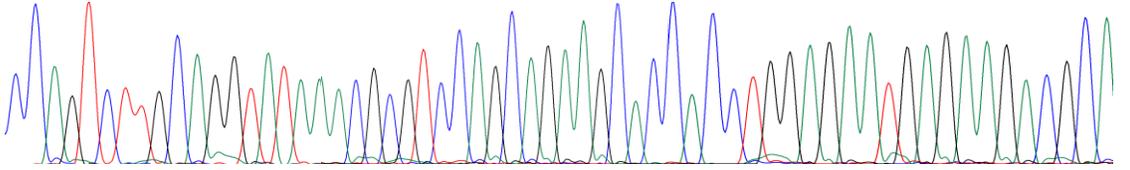
A CC A G C T C G T G T C C A T G T C C G T G C G C G A G C T G A A C C G C C A C C T G C G G G G C T T



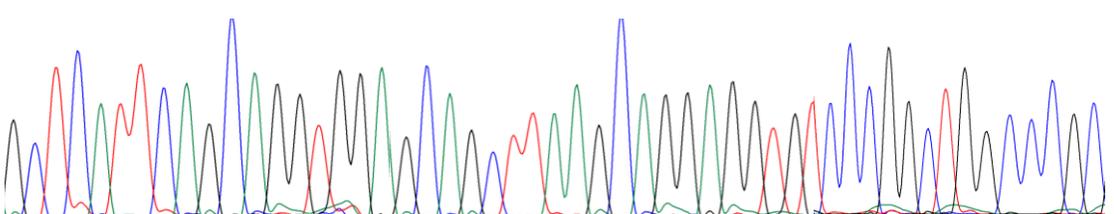
CA CC AA GGAC GA GGTGA T C CGC CTGA A GC AGA A GCG GC GGAC CCTGAAGAACCGGGGCTACGC



C C AGT CTT G CAGG TAT AAA CGCGTCC AGC AGAAGCA CC A CC TGG AG AA TGA G AA G ACG C A



GCT CATT C A G C A G G T G G A G C A G C T T A A G C A G G A G G T G T C C C G G C T G G C C C G C



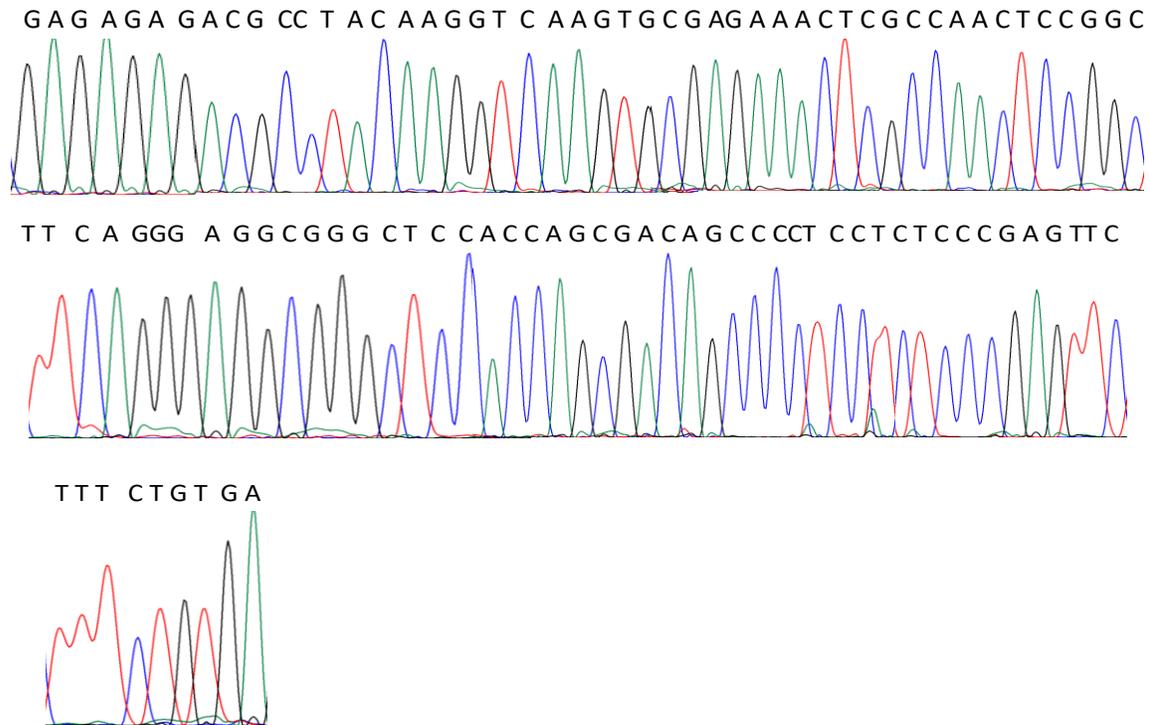


Fig. 16. Electroferograma representativo del gen *MAFB* de un paciente 46,XY con hipospadias. La figura muestra la secuencia nucleotídica completa de tipo silvestre para los pacientes y controles.

Con el diseño de los oligonucleótidos se obtuvo un total de 1150 pares de bases en cada uno de los 24 pacientes (niños de 3 meses a 9 años de edad) 46,XY de diferentes regiones de México diagnosticados al nacimiento única y exclusivamente con hipospadias aisladas. La secuenciación completa del exón de los 24 pacientes presentó una similitud del 100% de identidad con la secuencia de *MAFB* reportada en el banco de datos de NCBI con el número de registro NM_005461.4.

7. Discusión

La diferenciación sexual, como la masculinización embrionaria de los genitales externos, es uno de los procesos esenciales en la formación de las estructuras reproductoras masculinos. Los andrógenos regulan la masculinización de los genitales internos y externos, asimismo el crecimiento y desarrollo de la uretra masculina en mamíferos. Sin embargo, a pesar de los múltiples estudios para comprender los mecanismos génicos que controlan los procesos de masculinización, múltiples factores aún son desconocidos (Suzuki et al., 2014).

Se ha reportado que la escasa exposición a andrógenos provoca la falta de masculinización de GT. Por lo tanto, el momento adecuado de la exposición embrionaria al andrógeno es esencial para inducir la masculinización de GT (Miyagawa et al., 2009; Welsh et al., 2008). En el feto masculino humano, se ha descrito un aumento significativo de la concentración de T a la semanas 8 a la 14. Asimismo el cierre uretral a lo largo de la línea media del GT para la formación de la uretra se ha observado alrededor de la semana 9.5 a la semana 16.5 de gestación (Kim et al., 2002; Li et al., 2015). Las acciones generadas por los andrógenos están reguladas a través del AR. En este sentido, los estudios recientes sugieren que las acciones de andrógenos son esenciales para la masculinización de GT (Miyagawa et al., 2009).

Un estudio reciente en ratones indicó que el factor de transcripción *Mafb* es una proteína esencial para la masculinización uretral embrionaria. La expresión de *Mafb* fue reportada como predominante en el desarrollo de los genitales externos masculinos, impulsando la masculinización de la formación de uretra embrionaria de una manera dependiente de andrógenos. Los genitales externos de los machos KO para *Mafb* exhibieron defectos uretrales. Los datos en conjunto sugirieron que

el factor *Mafb* podría estar asociado a hipospadias en humanos (Suzuki et al., 2014).

Actualmente no existen estudios específicos sobre el gen *MAFB* en humanos, por lo tanto en este estudio nos enfocamos en realizar ensayos de análisis molecular y secuenciación en el gen *MAFB* que codifica para un factor de transcripción de cierre de leucinas, esto con la finalidad de establecer si las alteraciones génicas son las causantes de DSD en pacientes 46,XY con DSD asociados a hipospadias.

La amplificación de los dos segmentos del gen *MAFB* mediante PCR mostró el tamaño esperado de aproximadamente 750 y 560 pares de bases, descartando la presencia de duplicaciones, inserciones o deleciones por un amplio número de pares de bases. Adicionalmente, se observaron bandas únicas sin fragmentos inespecíficos.

Este estudio fue enfocado hacia la búsqueda de mutaciones del gen *MAFB* de humanos, que a su vez causarían una modificación estructural en la proteína. La secuenciación completa del exón dio como resultado los 969 nucleótidos, descartando así la presencia de una posible mutación por inserción o deleción de nucleótidos. En cada paciente se verificó la lectura de la secuenciación y se determinó la similitud del 100% con la secuencia de los controles sanos, por lo tanto se excluyó la presencia de mutaciones polimorfismos. Además, el exón de los 24 pacientes fue comparado con la secuencia de *MAFB* reportada en el banco de datos de NCBI con el número de registro NM_005461.4 y se determinó la ausencia de mutaciones (Wang et al., 1999).

En el supuesto caso de presentarse una mutación que provoque un cambio de aa en los dominios EHR o BR del MAFB humano, se afectaría el reconocimiento al RE y la especificidad de unión del TF-DNA (Kataoka et al., 1996), disminuyendo de manera considerable la eficiencia con la que la RNA polimerasa II se une e inicie la transcripción (Berger et al., 1998). Alteraciones en la región ZIP cambiaría las interacciones electrostáticas afectando el ensamblaje y la formación del homodímero bZIP descrito por Pogenberg en 2014. Al no encontrar alteraciones o variaciones génicas en la región de codante del gen *MAFB* de los 24 pacientes analizados en este estudio, deja en claro que el gen presenta una escasa relación como factor de desorden de desarrollo sexual en pacientes 46,XY- hipospadias.

En la región codante de diferentes genes (*NR3C4/AR*, *SRD5A2* y *SOX9*), múltiples mutaciones han sido asociadas a pacientes con hipospadias. Además, también se han informado sitios de mutación fuera de la región codante, incluidas las regiones no traducidas (UTR). Como el reportado en el factor de transcripción activado 3 (ATF3), afectando principalmente en la regulación de la transcripción con el promotor. Sin embargo, la mayoría de estos mecanismos de regulación génica siguen sin estar claros (Beleza-Meireles et al., 2008). Varios de estos cambios en la región intrónica no afectan al fenotipo ya que el RNA producto de la transcripción necesita modificaciones, conocidas como procesamiento del RNA, uno de ellos es la unión de los exones y la eliminación de los intrones conocido como corte y empalme (en inglés splicing) realizado por el espliceosoma para formar el mRNA maduro. Otros dos procesamientos en el mRNA, tienen lugar en el núcleo antes del corte y empalme. El primer, la adición del cap-5' necesario para la traducción y promueve la formación del complejo de iniciación entre el mRNA y el ribosoma. La segunda, consiste en recortar el extremo 3' del mRNA precursor y añadirle entre 100-200 residuos de adenilato en forma de cola poli (A), la cual indica que se trata de mRNA y que está listo para su traducción. Solo cuando se ha realizado los tres procesos, se transporta el mRNA maduro al citoplasma para su traducción. (Beleza-Meireles et al., 2008; Matsushita et al., 2016).

Retomando el estudio de Suzuki en 2014, se indica que la señalización de AR es necesaria para la expresión del *MAFB*. El AR unido al ligando actúa como un regulador transcripcional para controlar la expresión de genes. El AR se une a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) ubicados en las regiones potenciadoras o promotoras de sus genes diana (Heemers & Tindall, 2007).

Recientemente, se identificaron dos ARE en el 3'UTR del gen *Mafb* de roedores, lo cual sugiere que es una región esencial para su regulación por andrógenos. El AR se une a la secuencia ARE en el extremo 3'UTR durante la masculinización uretral regulando la expresión de *Mafb*. Además del 3'UTR dependiente de andrógenos, la región 5'UTR también mostró capacidad de respuesta a los andrógenos aunque no de manera significativa en comparación con el grupo control, aun así el extremo 5'UTR parece ser regulado de manera indirecta, los ARE en 3'UTR promueven cooperativamente su actividad transcripcional con otras regiones, como su región promotora, incluyendo 5'UTR (Zheng et al., 2006). Los resultados sugieren que se necesitan análisis adicionales para investigar si dicha regulación cooperativa entre 3'UTR y 5'UTR puede ser necesaria para la expresión de *Mafb* por andrógenos (Matsushita et al., 2016).

En el mismo estudio se informa que *Mafb* ARE2 en 3'UTR está altamente conservado entre especies que van desde mamíferos hasta aves, mientras que el sitio *Mafb* ARE1 en 3'UTR solo está conservado entre mamíferos, con ello se abre la posibilidad de que la región 3'UTR de *MAFB* en humanos, este relacionado con DSD en pacientes 46,XY-hipospadias.

Además de la señalización mediante el AR, diferentes vías de señalización del *Mafb* pueden regular la masculinización del GT (Miyagawa et al., 2009). La vía de señalización Wnt/ β -catenina es un mecanismo que actúa como regulador de la

masculinización genital externa a través de *Mafb* (Miyagawa et al., 2009). Se ha observado que los ratones mutantes para β -catenina y para *Mafb* mostraron defectos uretrales. En base a los resultados, se sugiere que la señalización mediante Wnt/ β -catenina induce positivamente la expresión de *MAFB* a través de regiones reguladoras, como la región 5' y 3'UTR. También se propone que AR y β -catenina podrían regular el gen *MAFB* de forma independiente. La posibilidad de una interacción directa entre AR y β -catenina en GT todavía permanece sin estudiarse. Los análisis adicionales de la regulación del gen *MAFB* por β -catenina aclararán los mecanismos moleculares que subyacen al establecimiento del dimorfismo sexual durante la masculinización uretral (Matsushita et al., 2016).

8. Conclusiones

Los datos obtenidos aquí excluyeron la presencia de mutaciones en la región codante del gen *MAFB* en los 24 pacientes 46,XY fenotipados clínica y exclusivamente con hipospadias aisladas. Los datos obtenidos en este estudio nos indican que es baja o nula la probabilidad de determinar o identificar un daño estructural en el gen *MAFB* y asociarlo con DSD-hipospadias. A pesar de no encontrar mutaciones en la región codante de *MAFB*, la posibilidad de que haya una contribución con este padecimiento en humanos sigue vigente, al reportarse en la literatura dos ARE en 3'UTR en *Mafb* de ratones, se sugiere que esta región no traducida es esencial para su regulación por andrógenos, con ello se abre la posibilidad de que la región 3'UTR de *MAFB* en humanos, esté relacionado con DSD en pacientes 46,XY-hipospadias.

9. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo descartan la participación de mutaciones o polimorfismos en la región codante del gen *MAFB* asociado a DSD hipospadias en 24 pacientes 46,XY-hipospadias. Sin embargo, estudios recientes reportan que la región 3'UTR de *Mafb* es esencial para su regulación mediante andrógenos durante el desarrollo y masculinización uretral embrionaria en ratones. Lo cual se sugiere realizar estudios de la región 3'UTR y su posible relación como factor de DSD hipospadias en humanos.

Adicionalmente, se ha demostrado que la señalización por Wnt/ β -catenina induce positivamente la expresión de *Mafb* a través de regiones reguladoras, como la región 5' y 3'UTR, de esta manera Wnt/ β -catenina puede ser un regulador adicional de la expresión de *Mafb* durante la masculinización uretral. Análisis adicionales de la regulación del gen *MAFB* por wnt/ β -catenina aclararía los mecanismos moleculares que subyacen al establecimiento del dimorfismo sexual durante la masculinización uretral.

En múltiples estudios, se han identificado genes masculinos específicos de GT, que estén potencialmente involucrados en su desarrollo en ratones, en estos estudios se buscaron genes con mayor nivel de expresión en GT masculino en comparación con GT femenino, tales genes reportados son *Cyp1b1* y *Fkbp51*, siendo genes candidatos con posible asociación con este padecimiento.

10. Bibliografía

Allard, S., Adin, P., Gouedard, L., di Clemente, N., Josso, N., Orgebin-Crist, M. C., . . . Xavier, F. (2000). Molecular mechanisms of hormone-mediated Mullerian duct regression: involvement of beta-catenin. *Development*, 127(15), 3349-3360.

Arnold, A. P. (2017). A general theory of sexual differentiation. *J Neurosci Res*, 95(1-2), 291-300. doi:10.1002/jnr.23884

Atchley, W. R., & Fitch, W. M. (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5172-5176. doi:10.1073/pnas.94.10.5172

Banerjee-Basu, S., Moreland, T., Hsu, B. J., Trout, K. L., & Baxevanis, A. D. (2003). The Homeodomain Resource: 2003 update. *Nucleic Acids Res*, 31(1), 304-306. doi:10.1093/nar/gkg118

Barteczko, K. J., & Jacob, M. I. (2000). The testicular descent in human. Origin, development and fate of the gubernaculum Hunteri, processus vaginalis peritonei, and gonadal ligaments. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 156, III-X, 1-98.

Baskin, L. S., & Ebberts, M. B. (2006). Hypospadias: anatomy, etiology, and technique. *J Pediatr Surg*, 41(3), 463-472. doi:10.1016/j.jpedsurg.2005.11.059

Beleza-Meireles, A., Tohonen, V., Soderhall, C., Schwentner, C., Radmayr, C., Kockum, I., & Nordenskjold, A. (2008). Activating transcription factor 3: a hormone responsive gene in the etiology of hypospadias. *Eur J Endocrinol*, 158(5), 729-739. doi:10.1530/EJE-07-0793

Berger, C., Piubelli, L., Haditsch, U., & Bosshard, H. R. (1998). Diffusion-controlled DNA recognition by an unfolded, monomeric bZIP transcription factor. *FEBS Lett*, 425(1), 14-18. doi:10.1016/s0014-5793(98)00156-2

Birk, O. S., Casiano, D. E., Wassif, C. A., Cogliati, T., Zhao, L., Zhao, Y., . . . Westphal, H. (2000). The LIM homeobox gene Lhx9 is essential for mouse gonad formation. *Nature*, 403(6772), 909-913. doi:10.1038/35002622

Brinkmann, A. O. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. *Mol Cell Endocrinol*, 179(1-2), 105-109. doi:10.1016/s0303-7207(01)00466-x

Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martinez-Garcia, J. F., Bilbao-Castro, J. R., & Robertson, D. L. (2010). Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol*, 153(3), 1398-1412. doi:10.1104/pp.110.153593

- Cederroth, C. R., Pitetti, J. L., Papaioannou, M. D., & Nef, S. (2007). Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266, 3-9. doi:10.1016/j.mce.2006.12.029
- Claessens, F., & Gewirth, D. T. (2004). DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem*, 40, 59-72. doi:10.1042/bse0400059
- Costa, W. S., Sampaio, F. J., Favorito, L. A., & Cardoso, L. E. (2002). Testicular migration: remodeling of connective tissue and muscle cells in human gubernaculum testis. *J Urol*, 167(5), 2171-2176.
- De Mendoza, A., & Sebe-Pedros, A. (2019). Origin and evolution of eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Genet Dev*, 58-59, 25-32. doi:10.1016/j.gde.2019.07.010
- Disteche, C. M. (2012). Dosage compensation of the sex chromosomes. *Annu Rev Genet*, 46, 537-560. doi:10.1146/annurev-genet-110711-155454
- Dröge-Laser, W., Snoek, B. L., Snel, B., & Weiste, C. (2018). The Arabidopsis bZIP transcription factor family-an update. *Curr Opin Plant Biol*, 45(Pt A), 36-49. doi:10.1016/j.pbi.2018.05.001
- Elrod-Erickson, M., Rould, M. A., Nekludova, L., & Pabo, C. O. (1996). Zif268 protein-DNA complex refined at 1.6 Å: a model system for understanding zinc finger-DNA interactions. *Structure*, 4(10), 1171-1180. doi:10.1016/s0969-2126(96)00125-6
- Eychene, A., Rocques, N., & Pouponnot, C. (2008). A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer*, 8(9), 683-693. doi:10.1038/nrc2460
- Ferraz-de-Souza, B., & Achermann, J. C. (2008). Disorders of adrenal development. *Endocr Dev*, 13, 19-32. doi:10.1159/000134753
- Gendrel, A. V., Apedaile, A., Coker, H., Termanis, A., Zvetkova, I., Godwin, J., Brockdorff, N. (2012). Smchd1-dependent and -independent pathways determine developmental dynamics of CpG island methylation on the inactive X chromosome. *Dev Cell*, 23(2), 265-279. doi:10.1016/j.devcel.2012.06.011
- Giese, K., Amsterdam, A., & Grosschedl, R. (1991). DNA-binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev*, 5(12B), 2567-2578. doi:10.1101/gad.5.12b.2567
- Gillies, A. R., Skretas, G., & Wood, D. W. (2008). Engineered systems for detection and discovery of nuclear hormone-like compounds. *Biotechnol Prog*, 24(1), 8-16. doi:10.1021/bp070144i
- Green, T., Flash, S., & Reiss, A. L. (2019). Sex differences in psychiatric disorders: what we can learn from sex chromosome aneuploidies. *Neuropsychopharmacology*, 44(1), 9-21. doi:10.1038/s41386-018-0153-2

- Griswold, S. L., & Behringer, R. R. (2009). Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev*, 3(1), 1-15. doi:10.1159/000200077
- Hall, T. M. (2005). Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 15(3), 367-373. doi:10.1016/j.sbi.2005.04.004
- Hanley, N. A., Hagan, D. M., Clement-Jones, M., Ball, S. G., Strachan, T., Salas-Cortes, L., Wilson, D. I. (2000). SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev*, 91(1-2), 403-407.
- Heard, E., & Turner, J. (2011). Function of the sex chromosomes in mammalian fertility. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(10), a002675. doi:10.1101/cshperspect.a002675
- Heemers, H. V., & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*, 28(7), 778-808. doi:10.1210/er.2007-0019
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*, 25(2), 276-308. doi:10.1210/er.2002-0032
- Hughes, I. A. (2001). Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*, 142(8), 3281-3287. doi:10.1210/endo.142.8.8406
- Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., Lee, P. A., & Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology Consensus, G. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol*, 2(3), 148-162. doi:10.1016/j.jpuro.2006.03.004
- Hur, E., Pfaff, S. J., Payne, E. S., Gron, H., Buehrer, B. M., & Fletterick, R. J. (2004). Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *PLoS Biol*, 2(9), E274. doi:10.1371/journal.pbio.0020274
- Inoue, N., Ikawa, M., & Okabe, M. (2011). The mechanism of sperm-egg interaction and the involvement of IZUMO1 in fusion. *Asian J Androl*, 13(1), 81-87. doi:10.1038/aja.2010.70
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., . . . b, Z. I. P. R. G. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 7(3), 106-111.
- Johnson, P. F., & McKnight, S. L. (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem*, 58, 799-839. doi:10.1146/annurev.bi.58.070189.004055
- Josso, N., Picard, J. Y., Imbeaud, S., di Clemente, N., & Rey, R. (1997). Clinical aspects and molecular genetics of the persistent mullerian duct syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 47(2), 137-144. doi:10.1046/j.1365-2265.1997.2411044.x

- Jost, A. (1970). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 259(828), 119-130. doi:10.1098/rstb.1970.0052
- Kataoka, K., Fujiwara, K. T., Noda, M., & Nishizawa, M. (1994). MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol Cell Biol*, 14(11), 7581-7591. doi:10.1128/mcb.14.11.7581
- Kataoka, K., Noda, M., & Nishizawa, M. (1996). Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene*, 12(1), 53-62.
- Keppler, B. R., Archer, T. K., & Kinyamu, H. K. (2011). Emerging roles of the 26S proteasome in nuclear hormone receptor-regulated transcription. *Biochim Biophys Acta*, 1809(2), 109-118. doi:10.1016/j.bbagr.2010.08.005
- Klonisch, T., Fowler, P. A., & Hombach-Klonisch, S. (2004). Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev Biol*, 270(1), 1-18. doi:10.1016/j.ydbio.2004.02.018
- Koskimies, P., Levallet, J., Sipila, P., Huhtaniemi, I., & Poutanen, M. (2002). Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1. *Endocrinology*, 143(3), 909-919. doi:10.1210/endo.143.3.8683
- Kim, K. S., Liu, W., Cunha, G. R., Russell, D. W., Huang, H., Shapiro, E., & Baskin, L. S. (2002). Expression of the androgen receptor and 5 alpha-reductase type 2 in the developing human fetal penis and urethra. *Cell Tissue Res*, 307(2), 145-153. doi:10.1007/s004410100464
- Kim, Y., Kobayashi, A., Sekido, R., DiNapoli, L., Brennan, J., Chaboissier, M. C., Capel, B. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*, 4(6), e187. doi:10.1371/journal.pbio.0040187
- Koopman, P. (2010). The delicate balance between male and female sex determining pathways: potential for disruption of early steps in sexual development. *Int J Androl*, 33(2), 252-258. doi:10.1111/j.1365-2605.2009.01001.x
- Laity, J. H., Lee, B. M., & Wright, P. E. (2001). Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 11(1), 39-46. doi:10.1016/s0959-440x(00)00167-6
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., . . . Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, 175(2), 598-599. doi:10.1016/j.cell.2018.09.045
- Ledent, V., & Vervoort, M. (2001). The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis. *Genome Res*, 11(5), 754-770. doi:10.1101/gr.177001

Lee, P. A., Houk, C. P., Ahmed, S. F., Hughes, I. A., International Consensus Conference on Intersex organized by the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine, S., & the European Society for Paediatric, E. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *International Consensus Conference on Intersex. Pediatrics*, 118(2), e488-500. doi:10.1542/peds.2006-0738

Li, Y., Sinclair, A., Cao, M., Shen, J., Choudhry, S., Botta, S., . . . Baskin, L. (2015). Canalization of the urethral plate precedes fusion of the urethral folds during male penile urethral development: the double zipper hypothesis. *J Urol*, 193(4), 1353-1359. doi:10.1016/j.juro.2014.09.108

Lim, H. N., Hughes, I. A., & Hawkins, J. R. (2001). Clinical and molecular evidence for the role of androgens and WT1 in testis descent. *Mol Cell Endocrinol*, 185(1-2), 43-50. doi:10.1016/s0303-7207(01)00631-1

Lu, D., Searles, M. A., & Klug, A. (2003). Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature*, 426(6962), 96-100. doi:10.1038/nature02088

Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Mejean, C., . . . Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J*, 24(10), 1798-1809. doi:10.1038/sj.emboj.7600660

Matsushita, S., Suzuki, K., Ogino, Y., Hino, S., Sato, T., Suyama, M., . . . Yamada, G. (2016). Androgen Regulates Mafb Expression Through its 3'UTR During Mouse Urethral Masculinization. *Endocrinology*, 157(2), 844-857. doi:10.1210/en.2015-1586

McLaren, A. (2003). Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*, 262(1), 1-15. doi:10.1016/s0012-1606(03)00214-8

Mendonca, B. B., Domenice, S., Arnhold, I. J., & Costa, E. M. (2009). 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 70(2), 173-187. doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03392.x

Misra, M., Sours, E., & Lance-Jones, C. (2012). Hox transcription factors influence motoneuron identity through the integrated actions of both homeodomain and non-homeodomain regions. *Dev Dyn*, 241(4), 718-731. doi:10.1002/dvdy.23763

Miyagawa, S., Satoh, Y., Haraguchi, R., Suzuki, K., Iguchi, T., Taketo, M. M., . . . Yamada, G. (2009). Genetic interactions of the androgen and Wnt/beta-catenin pathways for the masculinization of external genitalia. *Mol Endocrinol*, 23(6), 871-880. doi:10.1210/me.2008-0478

Morel, Y., Roucher, F., Mallet, D., & Plotton, I. (2014). Genetic of gonadal determination. *Ann Endocrinol (Paris)*, 75(2), 32-39. doi:10.1016/j.ando.2014.04.005

- Morgunova, E., & Taipale, J. (2017). Structural perspective of cooperative transcription factor binding. *Curr Opin Struct Biol*, 47, 1-8. doi:10.1016/j.sbi.2017.03.006
- Nef, S., & Parada, L. F. (2000). Hormones in male sexual development. *Genes Dev*, 14(24), 3075-3086. doi: 10.1101/gad.843800
- Nef, S., & Vassalli, J. D. (2009). Complementary pathways in mammalian female sex determination. *J Biol*, 8(8), 74. doi:10.1186/jbiol173
- Nef, S., Verma-Kurvari, S., Merenmies, J., Vassalli, J. D., Efstratiadis, A., Accili, D., & Parada, L. F. (2003). Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*, 426(6964), 291-295. doi:10.1038/nature02059
- Nishida, H., Miyagawa, S., Matsumaru, D., Wada, Y., Satoh, Y., Ogino, Y., . . . Yamada, G. (2008). Gene expression analyses on embryonic external genitalia: identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes. *Congenit Anom (Kyoto)*, 48(2), 63-67. doi:10.1111/j.1741-4520.2008.00180.x
- Ogata, T., Laporte, J., & Fukami, M. (2009). MAMLD1 (CXorf6): a new gene involved in hypospadias. *Horm Res*, 71(5), 245-252. doi:10.1159/000208797
- Ohndorf, U. M., Rould, M. A., He, Q., Pabo, C. O., & Lippard, S. J. (1999). Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. *Nature*, 399(6737), 708-712. doi:10.1038/21460
- O'Shaughnessy, P. J., & Fowler, P. A. (2011). Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction*, 141(1), 37-46. doi:10.1530/REP-10-0365
- Pabo, C. O., & Sauer, R. T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 61, 1053-1095. doi:10.1146/annurev.bi.61.070192.005201
- Pan, Y., Tsai, C. J., Ma, B., & Nussinov, R. (2010). Mechanisms of transcription factor selectivity. *Trends Genet*, 26(2), 75-83. doi:10.1016/j.tig.2009.12.003
- Park, S. Y., & Jameson, J. L. (2005). Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology*, 146(3), 1035-1042. doi:10.1210/en.2004-1454
- Pogenberg, V., Consani Textor, L., Vanhille, L., Holton, S. J., Sieweke, M. H., & Wilmanns, M. (2014). Design of a bZip transcription factor with homo/heterodimer-induced DNA-binding preference. *Structure*, 22(3), 466-477. doi:10.1016/j.str.2013.12.017
- Reeves, R. (2000). Structure and function of the HMGI(Y) family of architectural transcription factors. *Environ Health Perspect*, 108 Suppl 5, 803-809. doi:10.1289/ehp.00108s5803

Rey, R. (2001). Diferenciación sexual embrio-fetal: de las moléculas a la anatomía. *Revista chilena de anatomía*, 19(1), 75-82. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682001000100012>

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., & Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(5), 402-412. doi:10.1038/nrm2395

Rojas, D. F.; Manzo, D. J.; Soto-Cid, A. H.; Aranda-Abreu, G. E.; Juárez, A. E.; Coria-Ávila, G. A.; Toledo, C. R.; Locia, E. J. y Hernández, A. M. E. (2011). El receptor de andrógenos en la fisiología prostática. *Revista eNeurobiología* 2: 230511.

Romito, A., & Rougeulle, C. (2011). Origin and evolution of the long non-coding genes in the X-inactivation center. *Biochimie*, 93(11), 1935-1942. doi:10.1016/j.biochi.2011.07.009

Rose, A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlc, A., & Rose, P. W. (2018). NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, 34(21), 3755-3758. doi:10.1093/bioinformatics/bty419

Sekido, R., & Lovell-Badge, R. (2008). Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature*, 453(7197), 930-934. doi:10.1038/nature06944

Seldeen, K. L., McDonald, C. B., Deegan, B. J., & Farooq, A. (2008). Coupling of folding and DNA-binding in the bZIP domains of Jun-Fos heterodimeric transcription factor. *Arch Biochem Biophys*, 473(1), 48-60. doi:10.1016/j.abb.2008.02.024

Seldeen, K. L., McDonald, C. B., Deegan, B. J., Bhat, V., & Farooq, A. (2010). Dissecting the role of leucine zippers in the binding of bZIP domains of Jun transcription factor to DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 394(4), 1030-1035. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.116

Shimizu, T., Toumoto, A., Ihara, K., Shimizu, M., Kyogoku, Y., Ogawa, N., . . . Hakoshima, T. (1997). Crystal structure of PHO4 bHLH domain-DNA complex: flanking base recognition. *EMBO J*, 16(15), 4689-4697. doi:10.1093/emboj/16.15.4689

Stevens, J. D., Roalson, E. H., & Skinner, M. K. (2008). Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation*, 76(9), 1006-1022. doi:10.1111/j.1432-0436.2008.00285.x

Sugimoto, M., & Abe, K. (2007). X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS Genet*, 3(7), e116. doi:10.1371/journal.pgen.0030116

Sultan, C., Paris, F., Terouanne, B., Balaguer, P., Georget, V., Poujol, N., . . . Nicolas, J. C. (2001). Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update*, 7(3), 314-322. doi:10.1093/humupd/7.3.314

Sultana, D. A., Tomita, S., Hamada, M., Iwanaga, Y., Kitahama, Y., Khang, N. V., . . . Takahama, Y. (2009). Gene expression profile of the third pharyngeal pouch reveals role

of mesenchymal MafB in embryonic thymus development. *Blood*, 113(13), 2976-2987. doi:10.1182/blood-2008-06-164921

Suzuki, K., Numata, T., Suzuki, H., Raga, D. D., Ipulan, L. A., Yokoyama, C., . . . Yamada, G. (2014). Sexually dimorphic expression of Mafb regulates masculinization of the embryonic urethral formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(46), 16407-16412. doi:10.1073/pnas.1413273111

Tomboc, M., Lee, P. A., Mitwally, M. F., Schneck, F. X., Bellinger, M., & Witchel, S. F. (2000). Insulin-like 3/relaxin-like factor gene mutations are associated with cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 85(11), 4013-4018. doi:10.1210/jcem.85.11.6935

Tran, M. T. N., Hamada, M., Jeon, H., Shiraishi, R., Asano, K., Hattori, M., . . . Takahashi, S. (2017). MafB is a critical regulator of complement component C1q. *Nat Commun*, 8(1), 1700. doi:10.1038/s41467-017-01711-0

Travers, A. (2000). Recognition of distorted DNA structures by HMG domains. *Curr Opin Struct Biol*, 10(1), 102-109. doi:10.1016/s0959-440x(99)00056-1

Viger, R. S., Silversides, D. W., & Tremblay, J. J. (2005). New insights into the regulation of mammalian sex determination and male sex differentiation. *Vitam Horm*, 70, 387-413. doi: 10.1016/S0083-6729(05)70013-3

Vilela, M. L., Willingham, E., Buckley, J., Liu, B. C., Agras, K., Shiroyanagi, Y., & Baskin, L. S. (2007). Endocrine disruptors and hypospadias: role of genistein and the fungicide vinclozolin. *Urology*, 70(3), 618-621. doi:10.1016/j.urology.2007.05.004

Wang, P. W., Eisenbart, J. D., Cordes, S. P., Barsh, G. S., Stoffel, M., & Le Beau, M. M. (1999). Human KRML (MAFB): cDNA cloning, genomic structure, and evaluation as a candidate tumor suppressor gene in myeloid leukemias. *Genomics*, 59(3), 275-281. doi:10.1006/geno.1999.5884

Weigel, N. L., & Moore, N. L. (2007). Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol*, 21(10), 2311-2319. doi:10.1210/me.2007-0101

Weir, H. M., Kraulis, P. J., Hill, C. S., Raine, A. R., Laue, E. D., & Thomas, J. O. (1993). Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J*, 12(4), 1311-1319.

Welsh, M., Saunders, P. T., Fiskens, M., Scott, H. M., Hutchison, G. R., Smith, L. B., & Sharpe, R. M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*, 118(4), 1479-1490. doi:10.1172/JCI34241

Wilhelm, D., Yang, J. X., & Thomas, P. (2013). Mammalian sex determination and gonad development. *Curr Top Dev Biol*, 106, 89-121. doi:10.1016/B978-0-12-416021-7.00003-1

Wilson, J. D. (1999). The role of androgens in male gender role behavior. *Endocr Rev*, 20(5), 726-737. doi:10.1210/edrv.20.5.0377

Wolberger, C. (1996). Homeodomain interactions. *Curr Opin Struct Biol*, 6(1), 62-68.

Xie, W., & Evans, R. M. (2001). Orphan nuclear receptors: the exotics of xenobiotics. *J Biol Chem*, 276(41), 37739-37742. doi:10.1074/jbc.R100033200

Zheng, R., Shen, R., Goodman, O. B., Jr., & Nanus, D. M. (2006). Multiple androgen response elements cooperate in androgen regulated activity of the type 1 neutral endopeptidase promoter. *Mol Cell Endocrinol*, 259(1-2), 10-21. doi:10.1016/j.mce.2006.07.004

11. Anexo

- *Preparación de reactivos*

Sacarosa-Tritón 2X [Sacarosa 0.64 M, Tris-Base 0.02 M, $MgCl_2$ 0.01 M, Tritón 100X al 2% pH 7.6].

Solución de lisis nuclear [Tris-Base 10 mM, NaCl 400 Mm, Na_2EDTA 2 mM pH 8.2].

Proteínasa K [5 mg/mL].

NaCl saturado

Tris-EDTA [Tris-Base 1.0 mM, Na_2EDTA 0.1 mM].

TBE 5X [Tris-Base 54 g, ácido bórico 27.5 g y 20 mL de Na_2EDTA 0.5 M].

- *Preparación de geles de agarosa*

Pesar 1 g de agarosa y disolver en 100 ml de TBE 0.5X por calentamiento aproximadamente a una temperatura de 45°C, adicionar 3 μ L de bromuro de etidio, colocar agarosa en un molde para cámara de electroforesis previamente nivelada. Dejar solidificar y colocar solución TBE 0.5X hasta cubrir el gel. Correr a 100 volts durante 60 minutos.

- *Preparación y lavado de membranas*

Se cortaron membranas de 5 a 6 cm de largo, las cuales se sumergieron en 500 mL de ddH₂O con 10 g de bicarbonato de sodio y 1 mL de EDTA 0.5 M, se calentó por 10 minutos a temperatura de ebullición. Posteriormente se hicieron 3 lavados con ddH₂O eliminando los residuos de bicarbonato, se volvieron a agregar 500 mL de ddH₂O con 1 mL de EDTA y se calentó durante 10 min a temperatura de ebullición, terminado el tiempo se lavaron con agua eliminando los residuos de EDTA y se almacenaron en solución de etanol 50% a 4°C.

Reactivos

Ácido bórico (BIO BASIC INC, Toronto, Canadá).

Na₂EDTA (AMRESCO INC, Solon, Ohio, EUA).

Tris-Base (AMRESCO INC, Solon, Ohio, EUA).

Tritón X100 (AMRESCO INC, Solon, Ohio, EUA).

Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (LIFE TECHNOLOGIES INC, Gaithersburg, MD, EUA).

LE Agarose (Nara Biotec, CIENTIFICA SENNA, CDMX, México).

Sucrose, RNase & DNase Free (AMRESCO INC, Solon, Ohio, EUA).

Bicarbonato de Sodio (J. T. Baker, Xalostoc, México).

MgCl₂ (SIGMA®, SIGMA CHEMICAL CO, St Louis, EUA).

NaCl (MERCK, Edo. De Méx, México).

Proteinasa K (Thermo Scientific, Vilnius, Lituania).