

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Análisis de mutaciones en el gen *WT1* en sujetos 46, XY
con hipospadias”

T e s i s

Para obtener el título de
Lic. en Bioquímica Diagnóstica

Presenta

Andrea Suzett Sosa Carrasco

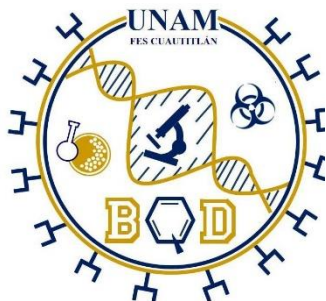
Director de tesis:

Dr. Luis Ramos Tavera

Asesora interna:

Dra. Maritere Domínguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 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.

RECONOCIMIENTOS



**INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

El trabajo experimental aquí presentado se realizó en el laboratorio de Bioquímica Hormonal del departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis quiero dedicarlo y ofrendarlo a la persona que más admiro, respeto y quiero en esta vida, a mi madre. Una mujer que simboliza fuerza, perseverancia, inteligencia, honestidad, entrega y amor puro. Eres ejemplo claro de sacrificio y constancia, no hay palabras que permitan plasmar cuánto agradezco, lo que has hecho por mí para sacarme adelante y poder darme las herramientas necesarias para construir un futuro con oportunidades. Gracias, madre querida, por tenerme siempre en tus oraciones y darme protección; gracias por guiarme y hacerme una persona de bien; gracias, por creer y apostar por mí en cada sueño, que se tornaba realidad, fruto de tu motivación y soporte. Esta transición llamada universidad fue difícil, pero nada de lo vivido tiene punto de comparación con lo que tú has pasado y dado para que yo pudiera llevar a cabo este logro. Cada éxito y meta efectuada llevarán tu huella y una dedicatoria con todo mi amor para ti, hoy y siempre. Mi corazón estará agradecido con Dios toda la vida por darme una madre tan maravillosa y ejemplar como tú. Te amo inmensamente, gracias por todo, mami.

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre

Por ser el motor de mi día a día. Gracias por estar conmigo en este largo camino del saber, por tu apoyo incondicional, tu esfuerzo y sacrificio inquebrantable para ayudarme a cumplir esta meta. Gracias por la eterna confianza que depositaste en mí en cada paso. Sin ti nada hubiera sido posible.

A Dios

Por sus bendiciones, protección y amor. Por ayudarme a concluir con éxito mi carrera, darme tranquilidad y paz en el proceso y por ser mi guía en todo momento.

A la Universidad

Por abrirme sus puertas para desarrollarme como profesional en sus aulas y permitirme forjar lazos de amistad, así como recuerdos y experiencias inolvidables dentro de ella.

A mis Profesores

Por instruirme con sus conocimientos y experiencias, atender mis inquietudes y darme su apoyo en este largo camino del saber.

Al Dr. Luis Ramos Tavera

Por brindarme su apoyo y confianza para realizar este trabajo de tesis. Por ser, además de un gran mentor, un gran amigo. Gracias por darme la oportunidad de aplicar y fortalecer mis habilidades dentro su laboratorio y de hacer de este proceso una experiencia grata e inolvidable.

A la Dra. Maritere Domínguez Rojas

Por su tiempo, ayuda y disponibilidad en este trabajo.

Al Ing. Elmar Antonio Faviel Solís

Gracias por siempre estar y brindarme tu ayuda cuando la necesitaba. Gracias por estar conmigo en aquellas noches de estudio y darme siempre ánimos para salir adelante. Gracias siempre por tu enorme cariño.

A mi Familia

Por darme su apoyo moral y tenerme en cada una de sus oraciones.

Al MVZ. Ernesto Carrasco Salinas

Por su apoyo y motivación hacia mi persona. Sus buenos deseos y su manera de creer en mí es algo que no olvidaré y siempre agradeceré.

A mis amigas Diana y Tania

Por hacer de la universidad, una de las etapas más bonitas y proporcionar a mi vida momentos que quedarán grabados en mi corazón por siempre. Gracias por cada momento que pasamos juntas, por ser mi equipo favorito en cada materia, por estar ahí, en las buenas y en las malas.

Al Q.F.B Alejandro Gutiérrez García

Por ser un excelente profesor y amigo. Gracias por toda su enseñanza, por el apoyo brindado, por su orientación y su paciencia. Gracias infinitas.

A mis compañeros de laboratorio en el INCMNSZ

Gracias por brindarme su amistad, por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera una experiencia inolvidable, por compartir sus conocimientos y sus habilidades desde el primer día haciendo que todo el proceso fuera más fácil y ameno.

A la M. en C. Lizette Mares Gómez

Por todo el conocimiento compartido, así como la paciencia y disponibilidad brindada. Pero, sobre todo, agradezco tu amistad, tu tiempo y todo tu apoyo. Eres un excelente profesionista y gran ser humano.

A la familia García Carrasco

Por brindarme su hospitalidad y abrirme las puertas de su casa. Por todo su apoyo y consejos. Gracias, ustedes fueron parte importante en la realización de este sueño.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AMH	Hormona antimülleriana
APS	Persulfato de amonio
AR	Receptor de andrógenos
DDS	Síndrome de Denys-Drash
DSD	Desórdenes del Desarrollo Sexual
DTH	Dihidrotestosterona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
KTS	Lisina-Treonina-Serina
MPM	Marcador de peso molecular
PCG	Células germinales primordiales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SF1	Factor esteroideogénico 1
SOX9	Factor de transcripción SRY-Box 9
SRD5A2	Esteroidoide 5 α -reductasa 2
SRY	Región determinante del sexo del cromosoma Y
SSCP	Polimorfismo conformacional de cadena sencilla
T	Testosterona
WT1	Proteína tumoral de Wilms

ÍNDICE

RESUMEN	10
1.-INTRODUCCIÓN	11
1.1. Mecanismos de la diferenciación sexual.....	11
1.2. Generalidades de <i>WT1</i>	20
1.3. Hipospadias	25
2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
2.1. Justificación	29
2.2. Objetivo general.....	30
2.3. Objetivos particulares	31
2.4. Hipótesis.....	32
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1. Extracción de DNA genómico (gDNA)	34
3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	35
3.3. Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP).....	37
3.4. Purificación directa a partir de amplificaciones de PCR.....	39
3.5. Secuenciación.....	40
4.- RESULTADOS	41
5.- DISCUSIÓN	49
6.- CONCLUSIONES	53
7.- REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para amplificar cada uno de los exones del gen WT1 de humanos	35
Tabla 2 Condiciones de reacción del PCR.	36
Tabla 3 Preparación de geles de poliacrilamida.	38
Tabla 4 Condiciones de reacción del PCR.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas de la diferenciación sexual	12
Figura 2 Estructura del gen.	21
Figura 3 Hipospadias leves a severas..	26
Figura 4 Imagen representativa del análisis en gel de agarosa al 1%	41
Figura 5 Imagen representativa del patrón de bandeo del exón 5 del gen WT1 obtenido mediante la técnica de SSCP en gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol..	42
Figura 6 Resultados del análisis del exón 1b mediante técnica de SCCP en un gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol.	43
Figura 7 Resultados del análisis del exón 3 mediante técnica de SCCP en un gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol.	43
Figura 8 Resultado del análisis del exón 7 mediante la técnica de SCCP en un gel de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol	44
Figura 9 Imagen representativa de las muestras purificadas del exón 3 y 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 volts.	45
Figura 10 Secuencia nucleotídica parcial del exón 1 del gen WT1 a partir de pacientes DSD-46, XY con hipospadias.	46
Figura 11 Secuencia nucleotídica parcial del exón 3 del gen WT1 a partir de pacientes DSD-46,XY con hipospadias.	47
Figura 12 Secuencia nucleotídica parcial del exón 7 del gen WT1 a partir de pacientes DSD-46,XY con hipospadias.	48

RESUMEN

Las hipospadias son una de las anomalías congénitas más comunes de los genitales externos masculinos. El pene hipospádico a menudo es anatómicamente similar al pene normal, al menos en lo que respecta al aspecto dorsal. Sin embargo, el aspecto ventral es patológico. Se han propuesto muchas hipótesis sobre la etiología de las hipospadias y parece posible que la etiología de éstas sea multifactorial. En el presente estudio se llevó a cabo el análisis de mutaciones en el gen *WT1* en 18 pacientes 46, XY con hipospadias aisladas, como posible etiología de esta anomalía. Se realizaron análisis mediante la técnica de PCR-SSCP y secuenciación. Los resultados de PCR indicaron la ausencia de inserciones, deleciones o duplicaciones de pares de bases en todos los exones analizados del gen *WT1*. Los ensayos de SSCP revelaron variantes de movilidad electroforética en los exones 1, 3 y 7. La secuenciación individual de cada exón mostró una transversión c.213G>T en el exón 1 que generó una variante sinónima p.P71P; una transición c.873G>A con una variante sinónima p.R291R y en el exón 7 se identificó una transición c.1122G>A que codifica para una variante p.R374R. Las variantes génicas reportadas en este estudio podrían ser polimorfismos; sin embargo, se requieren de estudios de genotipificación de alelos (n = 100) en la población mexicana para determinar su significancia como causa de alteración genética. Interesantemente, las variantes génicas encontradas en nuestro estudio son nuevas. Los resultados sugieren la importancia de estudiar si las mutaciones sinónimas alteran o no la función de la proteína.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1. MECANISMOS DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

En los mamíferos, la diferenciación sexual es un proceso biológico hormonal y genéticamente controlado, que tiene lugar en el tracto reproductivo del feto después de que la gónada ha empezado a diferenciarse en un testículo o en un ovario (Warne, G. L., & Kanumakala, S., 2002). La diferenciación sexual puede dividirse en tres etapas (Figura 1): 1) la etapa cromosómica que es controlada por la determinación del cariotipo presente en el embrión (Hiort, 2017), el sexo cromosómico se establece por la presencia de un genotipo XX (femenino) o XY (masculino) y es determinado en la fertilización, cuando ocurre la fecundación de un óvulo con un espermatozoide; 2) en la etapa gonadal el sexo cromosómico induce a la gónada bipotencial a diferenciarse en ovarios o testículos; y 3) el sexo fenotípico, definido por las características sexuales internas y externas, un proceso controlado y regulado por acción de hormonas esteroideogénicas específicas y múltiples factores transcripcionales (Sobel et al, 2004; Hiort, 2017).

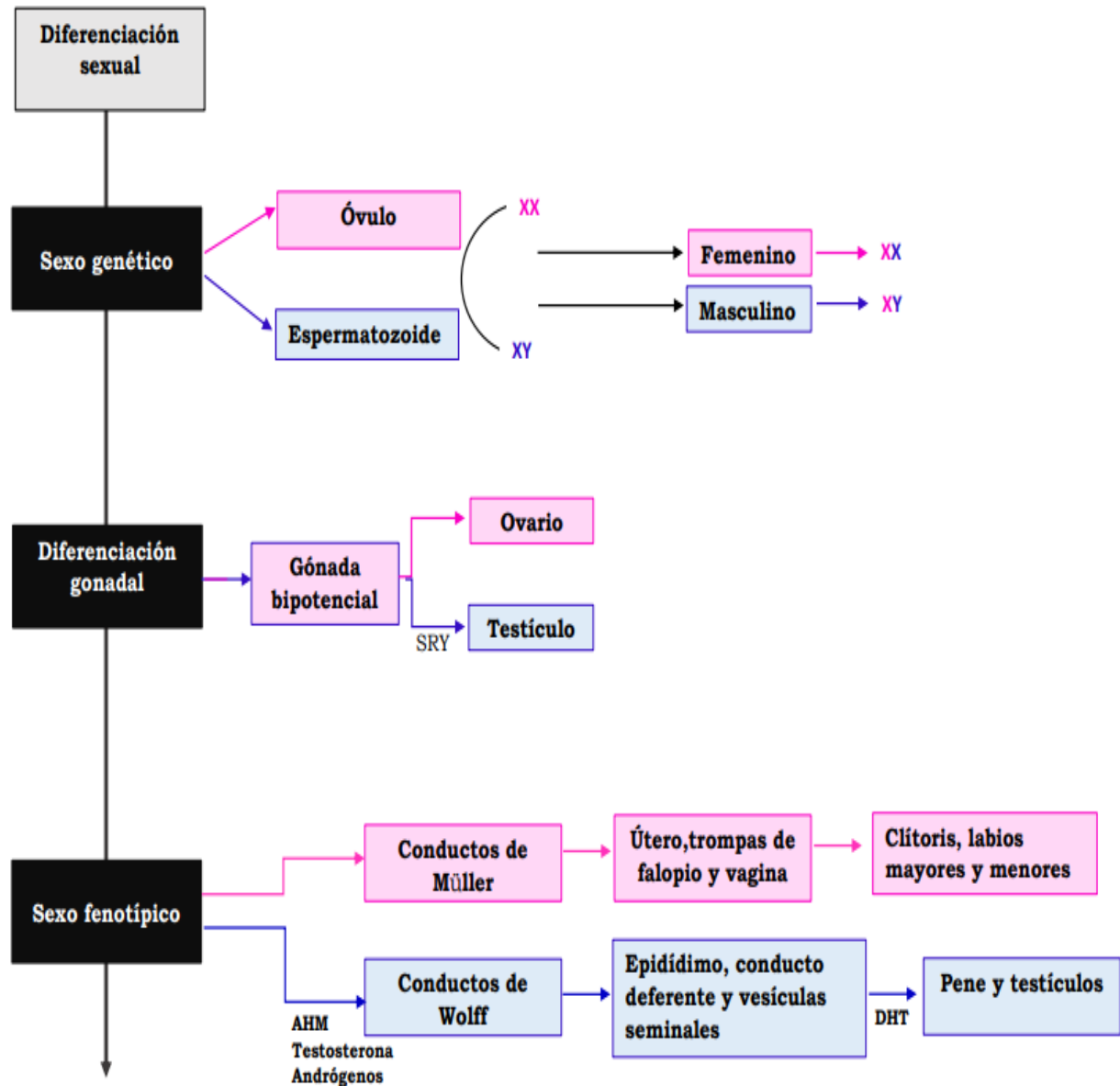


Figura 1 Etapas de la diferenciación sexual: 1) Establecimiento del sexo cromosómico determinado por la dosis cromosómica del óvulo (X) y el espermatozoide (X o Y) durante la fecundación. 2) Diferenciación de la gónada bipotencial hacia testículo (SRY) u ovario. 3) Diferenciación del sexo fenotípico. (Elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ por Andrea Suzett Sosa Carrasco)

Durante la etapa cromosómica, el óvulo tiene un complemento cromosómico con 22 autosomas y un cromosoma sexual X, mientras que el espermatozoide tiene 22 autosomas y un cromosoma sexual X o Y (Migeon, C. J., & Wisniewski, A. B., 1998). Cuando la fecundación se produce entre un ovocito (cromosoma X) y un espermatozoide (cromosoma X o Y) puede generarse un cariotipo 46, XX (Krishnan, S., & Wisniewski, A. B., 2014) o un cariotipo 46, XY. Una vez que se produce la fusión de los gametos parentales, se establece el sexo cromosómico de un individuo (Migeon, C. J., & Wisniewski, A. B., 1998).

El desarrollo sexual morfológico puede dividirse en cuatro etapas; 1) la etapa pregonadal en la cual las células germinales primordiales se diferencian; 2) la etapa de indiferenciación, en donde la gónada indiferenciada comienza como una etapa de rápida proliferación y engrosamiento de la cresta genital y su epitelio celómico; 3) la etapa de diferenciación sexual primaria, en la cual se da el desarrollo del testículo u ovario; y 4) la etapa de diferenciación sexual secundaria, generada por los efectos endocrinos y paracrinos de las hormonas testiculares [testosterona (T) de las células de Leydig y la hormona anti-Mülleriana (AMH) de las células de Sertoli] para la estabilización de los conductos de Wolff o Müller (Voutilainen, 1992).

Durante las primeras 6 semanas del desarrollo embrionario la cresta gonadal, las células germinales, los conductos internos y los genitales externos son bipotenciales en ambos sexos; 1) la cresta gonadal se diferencia hacia ovario o testículo, 2) las células germinales se desarrollan en ovocitos o espermatoцитos, 3) uno de los dos conductos (conductos de Wolff o conductos de Müller) se desarrolla y el otro sufre

una regresión y 4) los genitales externos bipotenciales se masculinizan o son feminizados (Migeon, C. J., & Wisniewski, A. B. 1998).

Las células germinales primordiales que eventualmente se localizan en la gónada, aparecen primero en el epiblasto proximal (la capa ectodérmica externa del embrión) de donde migran a través de la línea primitiva y luego a la base del alantoides. Las células germinales luego migran a lo largo de la pared del intestino posterior a la cresta urogenital, sitio en donde se establece la gónada (MacLaughlin, D. T., & Donahoe, P. K., 2004). Las gónadas son el depósito de células germinales y controlan la maduración de estas células en ovocitos y espermatocitos. Una función adicional e importante de la gónada es sintetizar hormonas que controlan el desarrollo de los genitales internos y externos (Ostrer, 2000). Las células germinales femeninas (XX) sufren mitosis durante la migración hacia la cresta genital. Después de que las células ingresan al ovario, pasan por las etapas iniciales de la primera división meiótica hasta que se detienen en la profase I en el nacimiento. Las células germinales masculinas (XY), por otra parte, se detienen en la mitosis al entrar en las gónadas. Se ha propuesto que el destino ovárico depende de la presencia de células germinales meióticas (es decir, la entrada autónoma de células germinales en la meiosis dicta la diferenciación ovárica). En la novena semana, las células germinales primordiales comienzan a diferenciarse en ovogonias. Inicialmente, las células germinales primordiales son difíciles de distinguir de las ovogonias; estas últimas tienen mayor actividad mitótica y una tendencia a formar grupos de células en división que se unen mediante puentes intercelulares. A su llegada a la gónada, las células germinales comienzan a interactuar con las células somáticas circundantes. Los componentes del epitelio ovárico forman grupos de células que envuelven las células primitivas de la

granulosa y la ovogonia. Durante la semana doce y trece de gestación, la ovogonia proliferante comienza a diferenciarse en ovocitos.

En esta etapa, la meiosis comienza a través de la primera profase meiótica. Tras el paro meiótico, las células germinales femeninas quedan rodeadas por una sola capa de células de la granulosa somática que forman los folículos primordiales (Warne, G. L., & Kanumakala, S., 2002).

En la etapa gonadal, la cresta urogenital (precursor del sistema urinario y genital) se desarrolla (alrededor de la semana cuatro de gestación en el embrión humano) como un engrosamiento de los mesonefros (que dará origen al uréter y pelvis renal, al epidídimo y al conducto deferente en el sexo masculino) y mesodermo intermedio (que dará origen al sistema reproductor) cubiertos por el epitelio celómico (Rey, R. A., & Grinspon, R. P., 2011). La cresta gonadal se considera bipotencial hasta la migración de las células germinales a dicha estructura. La diferenciación de la cresta gonadal del mesodermo intermedio requiere la expresión de los genes *WT1* (proteína tumoral de Wilms) y *SFI* (factor esteroideogénico 1) (Migeon, C. J., & Wisniewski, A. B. 1998).

Durante el desarrollo gonadal, el linaje celular de soporte [Sertoli (gónadas XY) o células de granulosa (gónadas XX)] es el primero en adoptar un destino específico para el sexo. Esto desencadena la diferenciación de las células esteroideogénicas, como las células de Leydig (gónadas XY) o las células de la Teca (gónadas XX) que producirán hormonas específicas del sexo. El mecanismo de determinación del sexo masculino depende de la presencia y expresión adecuada del gen *SRY* (región

determinante del sexo en el cromosoma Y) (Lucas-Herald, A. K., & Bashamboo, A, 2014).

Durante la diferenciación gonadal la presencia del gen *SRY* induce el desarrollo de la gónada indiferente en testículo. En ausencia de la expresión del gen *SRY*, la gónada se diferencia en un ovario. Cuando la gónada bipotencial se diferencia hacia testículos, los precursores de las células de Sertoli deben estar preparados para recibir las señales genéticas (tal es el caso del gen *SOX9*) para la diferenciación testicular adecuada, de lo contrario, las células germinales primordiales (PGC) comienzan a experimentar meiosis y la gónada se diferencia hacia ovario.

La expresión del gen *SRY* induce una proliferación del epitelio celómico de las crestas gonadales en los fetos de sexo masculino y de la migración de células mesonéfricas hacia la cresta gonadal. Entre las células mesonéfricas se encuentran los precursores de las células de Leydig, los vasos sanguíneos, los elementos del tejido intersticial del testículo, así como de las células mioideas peritubulares. La presencia de éstas últimas parece ser determinante para que las futuras células de Sertoli, provenientes al menos en parte del epitelio celómico, se organicen junto con las células germinales provenientes del saco vitelino (Rey, 2001). La diferenciación de las células germinales en los testículos comienza aproximadamente en la sexta semana después de la fecundación. Las células germinales primordiales masculinas (pre-espermatogonia) y las células de Sertoli quedan encerradas en los cordones testiculares recién formados. En la séptima semana de gestación, las células del estroma mesonéfrico penetran en la gónada y se diferencian en las células de Leydig (Warne, G. L., & Kanumakala, S., 2002). Al tercer mes de gestación, las células de Leydig llenan completamente los espacios

intersticiales y durante el sexto mes los extremos de los testículos desarrollan una luz continua con los túbulos mesonéfricos los cuales se convertirán en los conductos eferentes.

Las diferencias tempranas en el desarrollo sexual masculino y femenino son evidentes en los patrones de proliferación de las células germinales. Las células germinales masculinas (XY) sufren mitosis durante su migración; sin embargo, su crecimiento se detiene en la fase G_0 (inactiva) del ciclo celular. Las pre-espermatogonias en las gónadas fetales se dividen por mitosis dentro de los acordes sin entrar en la meiosis. Después del nacimiento, las células germinales masculinas reanudan el ciclo celular y se someten a meiosis para producir espermatogonias (Sobel et al, 2004).

Inmediatamente después de la formación de los cordones testiculares, las células de Sertoli fetales secretan AMH (Rey, 2001). La función de la AMH es suprimir el desarrollo y la diferenciación de los conductos de Müller en el sexo masculino (Warne, G. L., & Kanumakala, S., 2002). La acción de la AMH es muy corta y la secreción testicular de AMH comienza a finales de la séptima semana. Los conductos de Müller se hacen refractarios a su acción luego de la semana diez. A partir de la octava semana las células de Leydig producen andrógenos T y dihidrotestosterona (DHT); estas hormonas son responsables de la estabilización de los conductos de Wolff y su diferenciación en epidídimo, conductos deferentes y vesículas seminales; así como de la masculinización del seno urogenital y de los genitales externos. Los conductos de Wolff expresan el receptor de andrógenos (AR). Al unirse la T al AR se induce la diferenciación de los conductos masculinos. En el seno urogenital y los esbozos de los genitales externos, la T es reducida en

DHT por la enzima 5 α -reductasa 2 (SRD5A2). En el sexo femenino, la falta de andrógenos resulta en una regresión de los conductos de Wolff y en una feminización de los genitales externos (Rey, 2001).

En el sexo masculino, los conductos de Wolff son la estructura anatómica precursora del epidídimo, los vasos deferentes y las vesículas seminales; mientras que en los embriones femeninos los conductos de Müller dan origen a las trompas de Falopio, útero y tercio superior de la vagina. Las porciones distales de ambos conductos salen a la cavidad denominada cloaca, la cual se divide en el seno urogenital y el seno recto-anal. El seno urogenital da paso a la formación de la vejiga en ambos sexos, en el sexo masculino es indispensable para establecer la próstata, las porciones prostáticas y membranosas de la uretra, mientras que en el sexo femenino es precursor de toda la uretra y la porción inferior de la vagina. Las membranas genitales y rectales, las estructuras anatómicas mesodérmicas que se desarrollan bajo el ectodermo de la membrana genital, los pliegues uretrales y las estructuras labio-escrotales son los precursores de los genitales externos, que permanecen indiferenciados hasta la novena semana. A partir de los pliegues uretrales se forman los labios menores en la mujer y la uretra del pene en el varón; en el caso de las estructuras labio-escrotales formarán los labios mayores en el sexo femenino y el escroto en el sexo masculino. El tubérculo genital, emerge como una estructura anatómica ventral y medial que origina el pene o el clítoris (Rey, R. A., & Grinspon, R. P., 2011).

Los conductos de Müller originan el desarrollo del útero, las trompas de Falopio y el tercio superior de la vagina (Warne, G. L., & Kanumakala, S., 2002). Los ovarios no producen la hormona inhibidora de Müller durante el desarrollo fetal; por lo

tanto, se permite el desarrollo y mantenimiento de las estructuras de los conductos de Müller. Los ovarios fetales tampoco secretan cantidades significativas de andrógenos, por lo que los conductos de Wolff se vuelven atróficos (Krishnan, S., & Wisniewski, A. B., 2014).

La diferenciación de los conductos masculinos requiere altas concentraciones de T. En ausencia de acción de T, los conductos de Wolff se degeneran. La acción de la SRD5A2 da paso a la conversión de la T a DHT, la cual posee mayor afinidad de unión al AR que la T. La DHT es la principal hormona esteroide sexual responsable de la virilización del seno urogenital mediante el cual se desarrolla la vejiga, la uretra y la próstata en el hombre y los genitales externos, que ocurre entre la semana diez y catorce de gestación (Rey, R. A., & Grinspon, R. P., 2011).

Los genitales externos masculinos comienzan a diferenciarse entre la octava y novena semana de gestación cuando se produce DHT. La DHT es requerida para la fusión de los pliegues uretrales y labios escrotales, el alargamiento del tubérculo genital y la regresión del seno urogenital. La masculinización completa de los genitales externos por DHT se logra en la semana catorce de gestación.

La T impulsa el agrandamiento del pene y el descenso de los testículos (Rey, R. A., & Grinspon, R. P., 2011). En ausencia de secreción de T o de la actividad de SRD5A2, los genitales externos en el sexo masculino se desarrollan de manera típicamente femenina (Krishnan, S., & Wisniewski, A. B., 2014).

1.2. Generalidades de *WT1*

La identificación de mutaciones en el gen supresor del tumor 1 de Wilms (*WT1*) en dos síndromes (Denys-Drash y de Frasier) indicó el papel crucial que desempeña el gen en el desarrollo del sistema genitourinario, la diferenciación sexual y el tumor de Wilms (Algar, 2002). El gen *WT1* fue identificado por primera vez como un factor transcripcional mutado en algunos casos de tumor de Wilms esporádico y como una neoplasia maligna del riñón que afecta a las células precursoras renales embrionarias pluripotenciales. Como el gen ocasionalmente está mutado en la forma esporádica del tumor de Wilms, se consideró que *WT1* era un supresor tumoral y que las mutaciones en el gen anulaban la función (Han et al, 2007). Mutaciones en el gen *WT1* han sido detectadas en múltiples enfermedades humanas, incluidos los tumores de Wilms (nefroblastoma), el síndrome de Denys-Drash y el síndrome de Frasier, Desórdenes del Desarrollo Sexual (DSD) y gonadoblastoma. Las mutaciones heterocigotas esporádicas de *WT1* pueden conducir al tumor de Wilms, acompañado de defectos urogenitales leves que incluyen criptorquidia e hipospadias en niños (Hartwig S. & Kreidberg J.A., 2009; Hossain et al, 2001).

El gen *WT1* codifica para una proteína nuclear de 449 aminoácidos con un peso molecular de 49188 Da. El gen *WT1* se localiza en el cromosoma 11 (11p.13) y abarca una extensión de 50 kilobases en el locus cromosómico. El gen está compuesto por 9 intrones y 10 exones, los primeros seis exones codifican para una región reguladora transcripcional rica en prolina/glutamina; mientras que los exones del 7 al 10 codifican para los cuatro dedos de zinc identificados como el dominio de unión al DNA (Figura 2) (Jalanko, 2013).

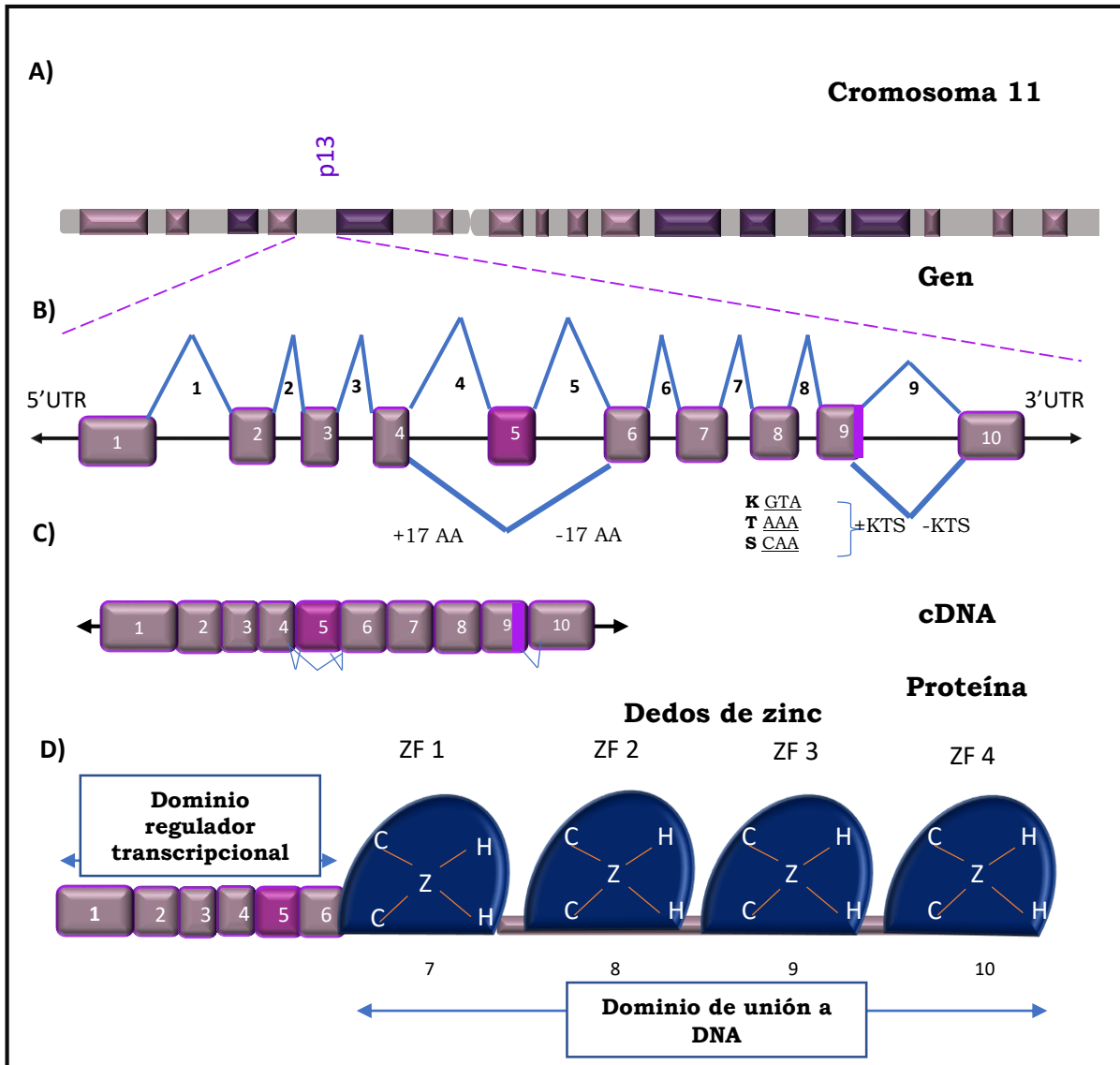


Figura 2 Estructura del gen: A) la ubicación del gen *WT1* en el cromosoma 11p.13. B) Estructura del gen conformado por 10 exones y 9 intrones. En azul puede observarse como se lleva a cabo el empalme normal del gen (zona superior) y los dos sitios de empalme alternativo que presenta el exón 5 y 9 (zona inferior). C) Se muestra únicamente los exones que codifican para *WT1*. D) La proteína *WT1* tiene dos dominios amplios: un dominio regulador transcripcional N-terminal y un dominio de unión al DNA C-terminal que contiene cuatro dedos de zinc (Elaborada en el Laboratorio de Bioquímica Hormonal, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ por Andrea Suzett Sosa Carrasco).

Entre las funciones asociadas al gen *WT1* se encuentran: la regulación de la expresión de numerosos genes blanco, codifica para una proteína necesaria para el desarrollo de los riñones y las gónadas durante la embriogénesis, además de poseer una actividad de supresión tumoral. En los tejidos de adultos, la expresión del *WT1* se encuentra en el sistema urogenital, el sistema nervioso central y en los tejidos involucrados en la hematopoyesis, incluida la médula ósea y los ganglios linfáticos (Yang et al, 2007).

La proteína WT1 contiene dos dominios funcionales: 1) el dominio N-terminal rico en glutaminas y prolina involucrado en la regulación transcripcional y el reconocimiento al RNA y 2) un dominio C-terminal formado por cuatro dedos de zinc (ZF), dichas estructuras están involucradas en la unión a DNA y RNA, así como en las interacciones proteína-proteína. Los dedos de zinc de WT1 lo colocan en la familia de factores de transcripción de respuesta de crecimiento temprano (EGR) (Bor et al, 2006; Han et al, 2007; Tatsumi et al, 2015).

Aunque existen múltiples isoformas del factor WT1, la importancia funcional de la mayoría es poco clara. Se han reportado cuatro proteínas principales las cuales se generan a través de dos eventos de empalmes alternativos que representan la presencia o ausencia de exón 5 (empalme 1) y el inserto lisina-treonina-serina (KTS) en el exón 9 (empalme 2), entre el tercer y cuarto dedo de zinc, estas proteínas se designan como isoforma A, isoforma B, isoforma C e isoforma D o -/- (ningún empalme está presente), +/- (sólo el empalme 1 está presente), -/+ (sólo el empalme 2 está presente) y +/+ (ambos empalmes están presentes). Estas isoformas son altamente conservadas entre las diferentes especies y juegan un papel crucial en el funcionamiento normal del gen. El gen *WT1* presenta tres

codones de inicio de traducción alternativos, el codón AUG primario, que forma proteínas de 52 a 54 kDa, un codón CUG localizado en el marco ascendente que codifica proteínas de 62 kDa y un codón AUG en el marco descendente que produce proteínas WT1 más pequeñas de 36 kDa (Dallosso, 2003; Tatsumi et al, 2015; Yang et al, 2007). La iniciación transcripcional de un promotor alternativo ubicado en el intrón 1 da como resultado la producción de una proteína WT1 truncada N-terminal más pequeña, denominada AWT1 o sWT1 (Tatsumi et al, 2015).

La isoforma de *WT1* (-KTS) en asociación con el producto de *SFI* promueve la expresión de la AMH, responsable de la regresión de los conductos de Müller en etapas embrionarias. Experimentos llevados a cabo de manera *in vitro* sugieren que variantes de esta isoforma es responsable de la activación transcripcional del gen *SRY*, el cual activa la diferenciación en el sexo masculino (Andrade et al, 2008). *WT1* es un regulador transcripcional con varias funciones, incluida la señalización tanto en los riñones embrionarios como en las gónadas. Las mutaciones en este factor de transcripción del dedo de zinc están asociadas con los síndromes de Denys-Drash o Frasier, lo que resulta en una amplia gama de malformaciones que incluyen hipospadias.

Si bien *WT1* juega un papel importante en el desarrollo indiferente de las gónadas y más tarde en la diferenciación testicular, también puede desempeñar un papel más localizado en los genitales externos. Los estudios en muestras fetales humanas mostraron que *WT1* y el *AR* se coexpresan en el mesénquima que rodea el seno urogenital a las 7 semanas. *In vitro*, *WT1* puede modular la expresión de *AR*. A la fecha se han descrito escasas mutaciones en *WT1* en niños con hipospadias aisladas.

En una cohorte de hipospadias, los polimorfismos en *WT1* se asociaron con un riesgo 2 veces mayor de hipospadias graves. Además, se sugiere que los polimorfismos en *WTAP*, una proteína nuclear que contribuye a la función WT1, estén asociados con hipospadias (Carmichael et al, 2013; Kohler et al, 2007; Little et al, 2000; Wang et al, 2004).

1.3. HIPOSPADIAS

El término hipospadia deriva del griego hipo (debajo) y spadon (fisura). Las hipospadias son anomalías congénitas del desarrollo y son muy comunes en los genitales externos masculinos (Figura 3). Las hipospadias son definidas como Desórdenes del Desarrollo Sexual (DSD) caracterizadas por una interrupción en el desarrollo normal de la uretra, el prepucio y/o en la parte ventral del pene y son presentadas como el resultado de la falla parcial o completa de los pliegues uretrales. La extensión del cierre determina la posición del orificio uretral dando como resultado una amplia gama de anormalidades; la abertura uretral puede estar posicionada a lo largo del eje ventral del pene, dentro del escroto o incluso en el perineo (Baskin, 2012; Kraft et al., 2010; Stein, 2012).

El pene hipospádico en ocasiones es anatómicamente similar al pene normal, al menos en lo que respecta al aspecto dorsal. Sin embargo, el aspecto ventral es patológico. El desarrollo del prepucio es incompleto, la formación de la placa uretral es defectuosa y el cuerpo esponjoso es deficiente. Existen tres anomalías comúnmente asociadas con el pene hipospádico: 1) una abertura ectópica del meato uretral ubicada en cualquier lugar entre el glande y la base del pene, 2) una curvatura ventral del pene (cordón) y 3) un prepucio encapuchado con un marcado exceso de piel en el dorso del pene y una falta de piel en el *ventrum*. El borde y el prepucio encapuchado no son constantes y se puede encontrar un meato hipospádico debajo de un prepucio formado normalmente (Djakovic et al, 2008; Mouriquand et al, 2010).

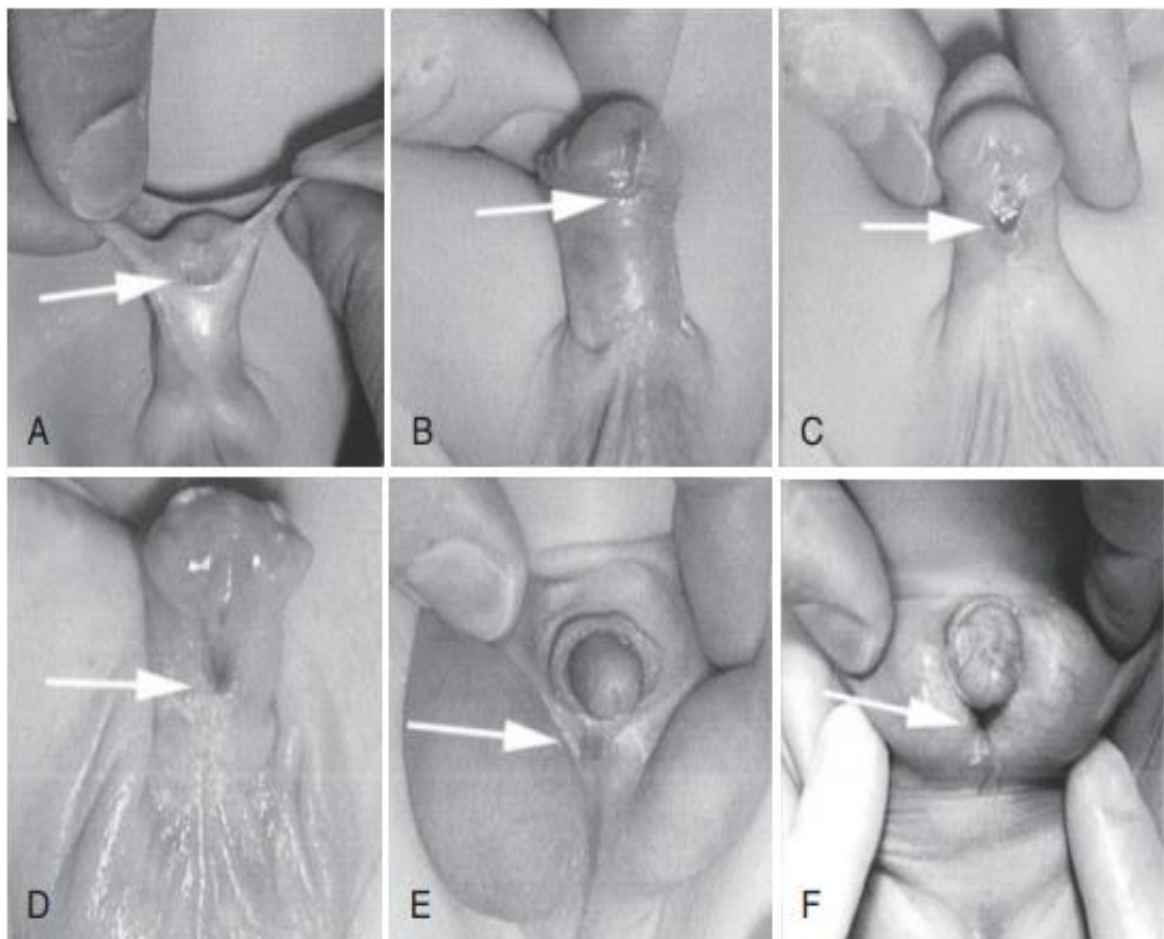


Figura 3 Hipospadias leves a severas. A) Hipospadias leves con la abertura uretral en el glande. B) Hipospadias leves con la abertura uretral en el margen coronal. C) Hipospadias moderadas con la abertura uretral en el eje distal del pene. D) Hipospadias moderadas con la abertura uretral en el eje del medio plumaje. E) Hipospadias severas con la abertura uretral en la unión penoscrotal. F) Hipospadias severas con la abertura uretral en el escroto (las flechas indican la apertura del meato uretral hipospádico). Las formas más severas de hipospadias están asociadas con la curvatura del pene (De Baskin LS: Hipospadias y desarrollo uretral. J Urol 2000; 163: 951-956).

Las hipospadias se caracterizan principalmente por anomalías de ubicación y configuración del meato uretral, este se encuentra en una variedad de configuraciones en términos de forma, diámetro, elasticidad y rigidez. El meato uretral puede ubicarse solo ligeramente ventralmente, justo debajo de un hoyo ciego en la abertura normal del meato en el glande, o puede estar tan atrás en el perineo que aparece como "hipospadias vaginales" (Baskin, L. S., 2012).

La clasificación estándar de las hipospadias se basan en la ubicación del meato uretral: distal, medio o proximal. Las hipospadias leves (distales) pueden ser glandulares (meato en la superficie ventral del glande), coronales (meato en el surco balanopenil) o distal (en el tercio distal del eje del pene). Las hipospadias moderadas se encuentran a lo largo del tercio medio del eje del pene. Las hipospadias severas (posteriores) se extiende a través del tercio proximal del eje del pene hasta el perineo y puede describirse como el pene posterior (en la base del eje), penoscrotal (en la base del eje frente al escroto), escrotal (en el escroto o entre las inflamaciones genitales), o perineal (detrás del escroto o detrás de las inflamaciones genitales) como se puede observar en la figura 3 (Baskin, 2012; Keays, M. A., & Dave, S, 2017).

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las hipospadias son las anomalías congénitas del desarrollo uretral más comunes que ocurren en aproximadamente 1 de cada 250 recién nacidos masculinos, o aproximadamente 1 de cada 125 nacimientos de varones vivos. Se han propuesto muchas hipótesis sobre la etiología del hipospadias, incluida la predisposición genética, la estimulación hormonal inadecuada prenatalmente, los factores materno-placentarios y las influencias ambientales. Por lo tanto, parece posible que la etiología de las hipospadias sea multifactorial (Baskin, 2012; Van der Hors et al, 2017). Debido a que la formación de la uretra masculina depende completamente de los andrógenos, parece que una teoría más razonable para explicar las hipospadias es una anomalía en la vía del metabolismo de los andrógenos y su regulación. De hecho, esos defectos en algunas moléculas involucradas en la vía, como *SRY*, *SOX9*, *AR*, *SRD5A2* y *WT1* podrían contribuir al desarrollo masculino anormal, incluido un subconjunto de hipospadias (Chen, T., 2006). En este proyecto se plantea la posibilidad de estudiar la región codante del gen *WT1* en pacientes con hipospadias y encontrar una asociación genética.

2.1. JUSTIFICACIÓN

Evidencias recientes han demostrado que el gen *WT1* está implicado en el desarrollo del borde urogenital, específicamente en etapas tempranas del desarrollo embrionario durante la diferenciación hacia la gónada masculina. Sin embargo, existen escasos estudios que demuestren la importancia del gen *WT1* en el desarrollo de los genitales externos masculinos, incluidos el desarrollo del pene y la uretra peneana. Por lo tanto, en este trabajo nosotros proponemos estudiar el gen *WT1* en pacientes con hipospadias y cariotipo 46, XY.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Identificar y determinar la existencia de mutaciones o variantes génicas en el gen *WT1* en pacientes con desórdenes del desarrollo sexual 46, XY mediante el uso de técnicas moleculares para determinar la relación del gen con la presencia de hipospadias.

2.3. OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar deleciones, inserciones o duplicaciones de un número amplio de pares de bases en el gen *WT1*.
- Identificar mutaciones puntuales o variantes génicas de una sola base en la región codante del *WT1*.
- Determinar y examinar la presencia de mutaciones en el gen *WT1* en pacientes con hipospadias.

2.4. HIPÓTESIS

Si *WT1* es uno de los principales genes implicados en el desarrollo del sistema genitourinario y tiene un papel específico en varones en la determinación del sexo, la alteración de la secuencia nucleotídica podría causar una expresión errónea o nula en los productos proteicos involucrados en la correcto desarrollo de la genitales externos masculinos dando como resultado la presencia de hipospadias.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y sujetos control

Se utilizó DNA genómico (gDNA) de 20 individuos con cariotipo 46, XY. Se utilizaron 18 pacientes con diagnóstico clínico de hipospadias; 48.5 % presentaban hipospadias distales y el 51.5% hipospadias proximales. Dos sujetos sanos fueron utilizados como controles. El diagnóstico de hipospadias se basó en la exploración física. Los pacientes fueron referidos de diferentes regiones de México. Todos los individuos tenían un cariotipo 46, XY normal. Clínicamente, no presentaron otra enfermedad o desorden endocrino. En este proyecto sólo obtuvimos el consentimiento informado para estudiar las muestras biológicas de gDNA de los pacientes (0.3-9 años de edad); por lo tanto, se excluyeron las mediciones hormonales. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (número de registro del proyecto Institucional BRE-2614-18-21-1).

3.1. Extracción de DNA genómico (gDNA)

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica por venopunción en 18 pacientes y 2 sujetos sanos como control. La muestra fue depositada en tubos cónicos de 50 ml que contenían 200 µl de EDTA 0.5 M pH 8. Posteriormente, se llevó a un volumen de 35 ml adicionando solución fría de sacarosa-tritón 2X (sacarosa 0.64 M, Tris-base 0.02 M, MgCl₂ 0.01 M y Tritón X100 2%) y finalmente se llevó a 50 ml con agua estéril, desionizada y bidestilada (ddH₂O) mezclando por inversión. Las muestras se dejaron durante 10 minutos a 4°C mezclando por inversión y se centrifugó a 1000 xg durante 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 5 ml de solución sacarosa-tritón 1X. Se centrifugó a 1000 xg por 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante, el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de solución de lisis nuclear (Tris-base 10 mM, NaCl 400 mM y Na₂EDTA 2 mM), 108 µl de Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) al 20% y 100 µl de proteinasa K (5 mg/ml), se mezcló y se colocó en una incubadora con agitación a 50°C durante 2 horas. Pasado este tiempo, se transfirió el contenido a un tubo cónico estéril de 15 ml y se adicionó 1 ml de NaCl saturado. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se centrifugó a 1000 xg durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15 ml estéril. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión hasta la obtención de gDNA precipitado. El gDNA se extrajo con una pipeta Pasteur sellada y se lavó con etanol al 70% durante 30 segundos. Se dejó secar durante 30 segundos. Se agregaron 400 µl de Tris-EDTA (TE, 1 ml de Tris 1 M, 0.02 ml de EDTA 0.5 M pH 8) a tubos de microcentrífuga de 500 µl. Se introdujo la pipeta Pasteur con el gDNA adherido y se agitó hasta el desprendimiento del mismo. Se dejó disolver a 37°C durante 24 horas y se cuantificó en un espectrofotómetro (Beckman DU 650, Fullerton, CA, USA).

3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se amplificaron los 10 exones del gen *WT1* (número de acceso al GenBank NC_000011.10, NM_024426.6) de manera individual mediante la técnica de PCR utilizando oligonucleótidos sintetizados como indicadores para la amplificación del DNA. Veintiocho oligonucleótidos fueron sintetizados a partir de la región intrónica adyacente a la zona de corte y empalme de cada exón. El exón 1 fue dividido en cinco fragmentos (Tabla 1). Los oligonucleótidos fueron diseñados de acuerdo a la secuencia nucleotídica ya reportada en la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando el programa PrimerQuest (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>).

Tabla 1 Oligonucleótidos utilizados para amplificar cada uno de los exones del gen *WT1* de humanos.

Exon	MgCl ₂	Temp.	Primers
Exon 1A	2.5 mM	66°C	<i>WTE1-1F/WTE1-1R</i>
Exon 1B	2.0 mM	60°C	<i>WTE1-2F/WTE1-2R</i>
Exon 1C	2.0 mM	60°C	<i>WTE1-3F/WTE1-3R</i>
Exon 1D	2.0 mM	60°C	<i>WTE1-4F/WTE1-4R</i>
Exon 1E	2.5 mM	60°C	<i>WTE1-5F/WTE1-5R</i>
Exon 2	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E2F/WT1-E2R</i>
Exon 3	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E3F/WT1-E3R</i>
Exon 4	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E4F/WT1-E4R</i>
Exon 5	2.5 mM	60°C	<i>WT1-EXF/WT1-EXR</i>
Exon 6	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E5F/WT1-E5R</i>
Exon 7	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E6F/WT1-E6R</i>
Exon 8	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E7F/WT1-E7R</i>
Exon 9	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E8F/WT1-E8R</i>
Exon 10	2.5 mM	60°C	<i>WT1-E9F/WT1-E9R</i>

Las amplificaciones por PCR (condiciones de reacción tabla 2) se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l, utilizando 0.3 μ g de gDNA, 10 μ M de cada dNTP, 1.0 U de DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI, USA), 0.5 μ l de cada oligonucleótido 20 μ M y 3 μ Ci de α -³²P-dCTP (actividad específica 3000 Ci/mmol; PerkinElmer, Boston, MA, USA).

Tabla 2 Condiciones de reacción del PCR.

N° de ciclos	Temperatura 1	Temperatura 2	Temperatura 3	
1	94°C/3 min			
30	94°C/30 seg	60-66°C/30 seg	72°C/30 seg	
1			72°C/3 min	4°C

Los productos amplificados mediante PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% [1 g de agarosa en 100 ml de TBE 0.5X (TBE 5X, 27.5 g de ácido bórico, 54 g de Tris-base y 20 ml de EDTA 0.5 M pH 8)] y teñidos con bromuro de etidio. Los productos fueron depositados colocando 5 μ l del producto más 3 μ l de solución de carga para DNA (azul de bromofenol 0.25% p/v, ficoll 400 5%p/v) y comparados con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Los productos se dejaron correr a 100 volts durante 1 hora y se observaron mediante un transiluminador.

3.3. Polimorfismo Conformacional de Cadena Sencilla (SSCP)

Los ensayos de SSCP se realizaron posterior a la amplificación de los 10 exones del gen *WT1*. Para el análisis de cada exón en los 18 pacientes y los 2 sujetos control se prepararon cuatro sistemas en geles de poliacrilamida de 30 x 40 cm, a diferentes concentraciones de 8% y 5.4% con y sin glicerol (Tabla 2). Las muestras depositadas en los geles fueron preparadas mezclando 2 µl de los amplicones obtenidos por PCR y 13 µl de solución de carga para SSCP (formamida al 95%, EDTA 20 mM y azul de bromo fenol al 0.05%). Las mezclas fueron desnaturalizadas a 94°C durante 5 minutos y colocadas inmediatamente a 4°C durante 5 minutos. Se tomaron 2 µl de cada muestra y se aplicaron en los cuatro sistemas diferentes. La electroforesis se llevó a cabo utilizando una solución de corrida TBE 0.5X a 250 volts (con glicerol) y 200 volts (sin glicerol) durante un tiempo mínimo de 18 horas. Terminada la electroforesis, los geles fueron desmontados y las muestras se transfirieron a papel Whatman 3 MM. Los geles fueron secados en un equipo “Slab Gel Dryer, Savant” durante 1 hora a 70°C. Posteriormente, los papeles secos fueron expuestos a una pantalla “Molecular Imager FX, Imaging screenK (Molecular Imager Gel Doc XR System, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) en un cartucho con pantallas intensificadoras durante un tiempo de 2 horas y finalmente analizados en un escáner PMI haciendo uso del programa QuantityOne (Molecular Imager Gel Doc XR System, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Tabla 3 Preparación de geles de poliacrilamida.

Reactivos	Geles de poliacrilamida al 8%		Geles de poliacrilamida al 5.4%	
	Con glicerol	Sin glicerol	Con glicerol	Sin glicerol
H₂O	29.85 ml	36.89 ml	35.91 ml	42.91 ml
TBE 5X	14.0 ml	14.0 ml	14.0 ml	14.0 ml
Acrid/Bis	18.66 ml	18.66 ml	12.6 ml	12.6 ml
Glicerol	7.0 ml	-----	7.0 ml	-----
APS 10%	0.49 ml	0.49 ml	0.49 ml	0.49 ml
Temed	25 µl	25 µl	24.5 µl	24.5 µl

3.4. Purificación directa a partir de amplificaciones de PCR

Para la purificación del gDNA se utilizó el kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se amplificó el exón 1, 3 y 7 del gen *WT1*, se llevó a cabo un total de 5 reacciones de PCR para cada exón con las siguientes condiciones:

Tabla 4 Condiciones de reacción del PCR.

Nº de ciclos	Temperatura 1	Temperatura 2	Temperatura 3	
1	94°C/3 min			
30	94°C/30 seg	60-66°C/30 seg	72°C/30 seg	
1			72°C/3 min	4°C

Se hizo una mezcla de las 5 reacciones obteniéndose un volumen final de 100 µl de gDNA los cuales fueron depositados en un tubo de 1.5 ml. Se adicionó 100 µl de una solución tampón para purificación de PCR directa (Wizard, Promega, Madison, WI, USA) y se agitó brevemente. Posteriormente, se adicionaron 2 ml de resina de purificación de DNA (Wizard, Promega, Madison, WI, USA) y se agitó 3 veces en intervalos de 1 minutos. Se preparó la Minicolumna Wizard (Se unió el émbolo a la Minicolumna Wizard) y se depositó la mezcla. Se insertó el émbolo y empujó la suspensión de resina/DNA en la Minicolumna Wizard®. Se lavó con 2 ml de isopropanol al 80% haciéndolo pasar por la Minicolumna Wizard. La Minicolumna Wizard se transfirió a un tubo limpio de 1.5 ml y se centrifugó a 1000 xg por 2 minutos. Se depositó 40 µl de H₂O en la Minicolumna Wizard y se centrifugó a 1000 xg por 20 segundos. El gDNA obtenido se analizó por electroforesis y se almacenó a -20°C.

3.5. Secuenciación

Se seleccionaron los fragmentos de gDNA para examinar cualquier variación y se secuenciaron con el estuche de secuenciación BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Austin, TX, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor en un volumen de reacción de 10 μ l. Las condiciones de termociclado fueron de 1 minuto a 96°C seguido de 35 ciclos de 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 4 minutos (Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Las muestras se purificaron con 45 μ l de solución SAM y 10 μ l de solución XTerminator siguiendo el protocolo del fabricante (kit de purificación BigDye XTerminator; Applied Biosystems, Austin, TX, USA). Las reacciones se agitaron durante 30 minutos (2000 rpm; mezclador de vórtice BV1000, Edison, NJ, USA) y se centrifugaron a 1000 xg durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones de secuenciación se realizaron con un secuenciador automático ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) en ambas direcciones (sentido y anti-sentido) a través de tres experimentos independientes. Las reacciones de secuenciación se sometieron a electroforesis capilar utilizando el módulo de ejecución KB_310POP6_BDTv3_36 Rapid (temperatura: 50°C; voltaje de inyección: 15 kV; tiempo de inyección: 5 a 7 segundos; 5 a 8 μ A).

4.- RESULTADOS

Se amplificaron los 10 exones (el exón 1 se dividió en cinco fragmentos) del gen *WT1* mediante la técnica de PCR en sujetos DSD-46, XY con hipospadias y sujetos sanos como controles. Cada exón fue colocado en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y analizado en electroforesis utilizando un marcador de peso molecular (MPM) de 100 pares de bases. Los resultados obtenidos mostraron la amplificación específica de cada exón en los 20 individuos analizados y además presentaron el tamaño de aproximadamente 200 pares de bases que era la talla esperada.

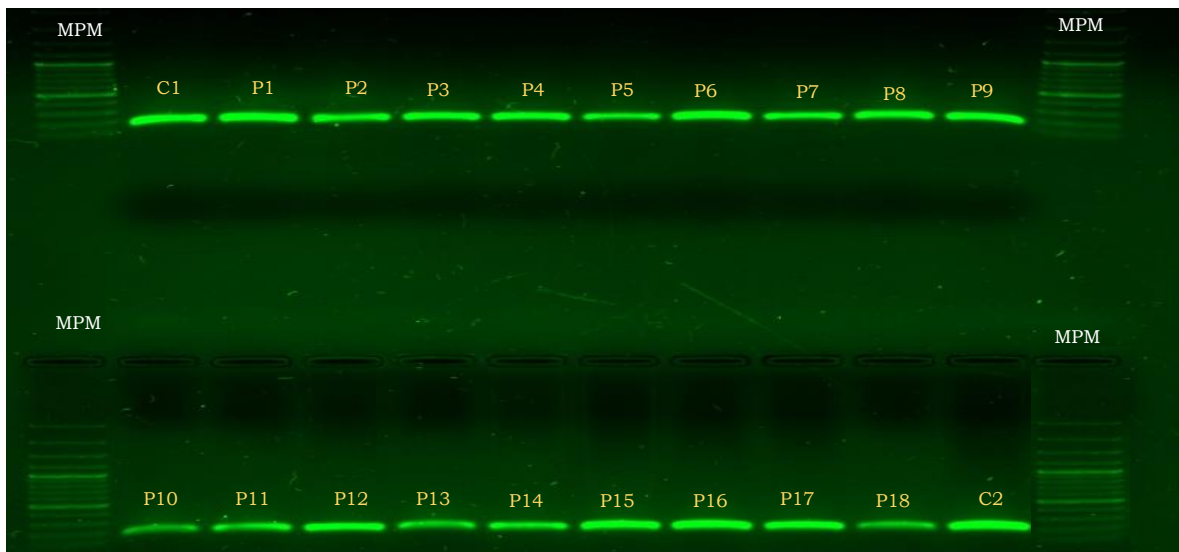


Figura 4 Imagen representativa del análisis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En este caso se presenta únicamente el exón 5 del gen *WT1*. En los extremos inicial y final se encuentran los individuos controles sanos (C1 y C2) y entre estos los pacientes analizados (P1-P18), comparados con el MPM de 100 pares de bases.

Una vez obtenida la amplificación de los exones, las muestras de los pacientes fueron analizadas para cada exón mediante el uso de la técnica de SSCP utilizando cuatro sistemas de geles de poliacrilamida a concentraciones de 5.4% y 8% con glicerol y sin glicerol, respectivamente.

Se realizaron un total de 56 sistemas para el análisis completo de los 10 exones del gen *WT1* para los 18 pacientes. Los exones 2, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 presentaron bandeos normales similares a los controles, es decir sin cambios de movilidad electroforética (Figura 5). Sin embargo, en los exones 1, 3 y 7 se detectó variabilidad en su movilidad electroforética con respecto a los sujetos control (Figura 6, 7 y 8).

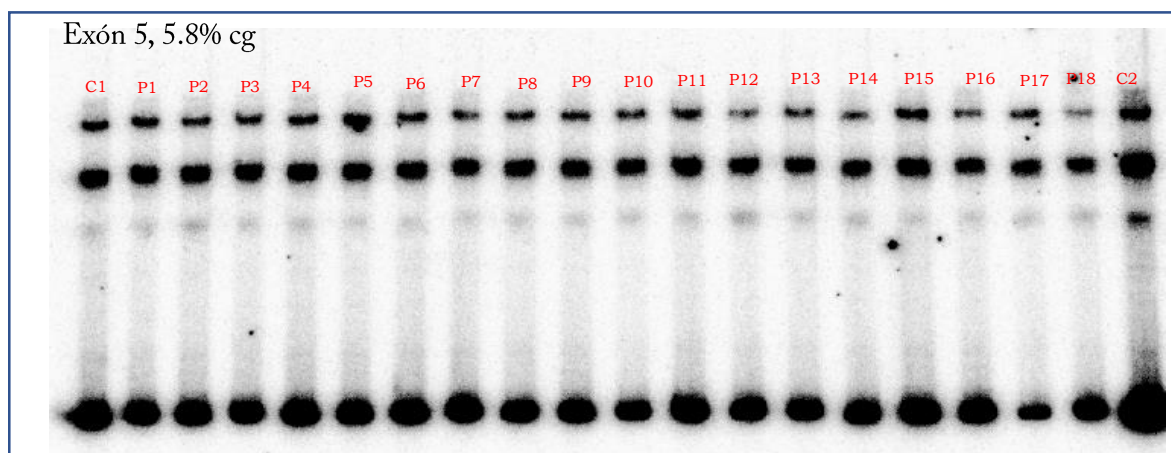


Figura 5 Imagen representativa del patrón de bandeo del exón 5 del gen *WT1* obtenido mediante la técnica de SSCP en gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol. Todos los individuos 46, XY con hipospadias presentaron un patrón de migración electroforética similar a los individuos control.

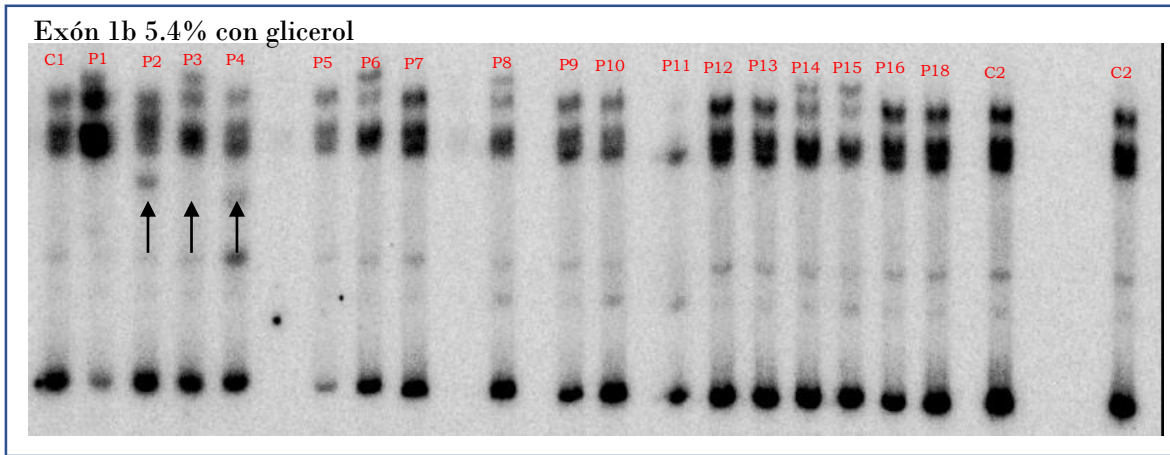


Figura 6 Resultados del análisis del exón 1b mediante técnica de SCCP en un gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol en el cual se pueden observar ligeras variaciones en la movilidad de los patrones de bandeo en los individuos P2, P3 y P4 marcados con flechas.

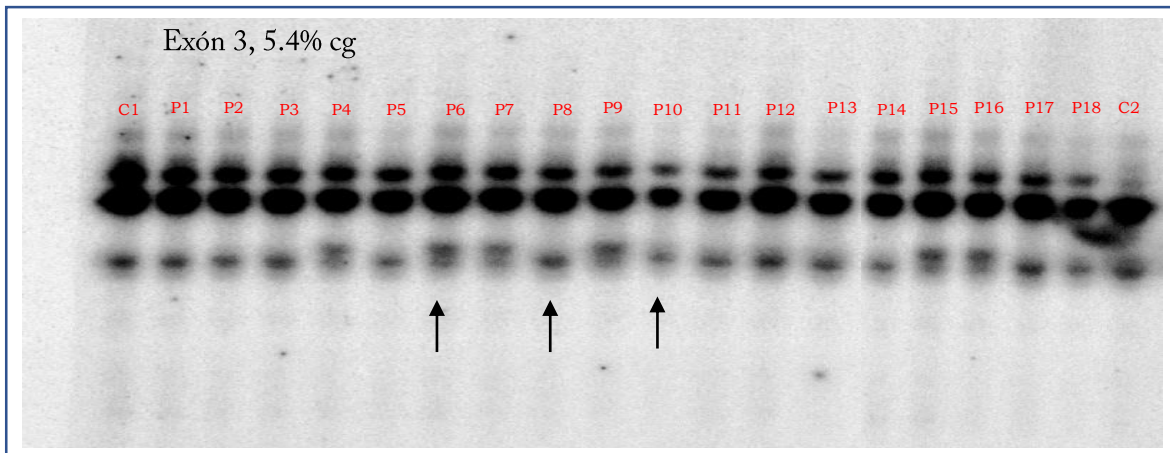


Figura 7 Resultados del análisis del exón 3 mediante técnica de SCCP en un gel de poliacrilamida al 5.4% con glicerol en el cual se pueden observar ligeras variaciones en la movilidad de los patrones de bandeo en los individuos P6, P8 y P10 marcados con flechas.

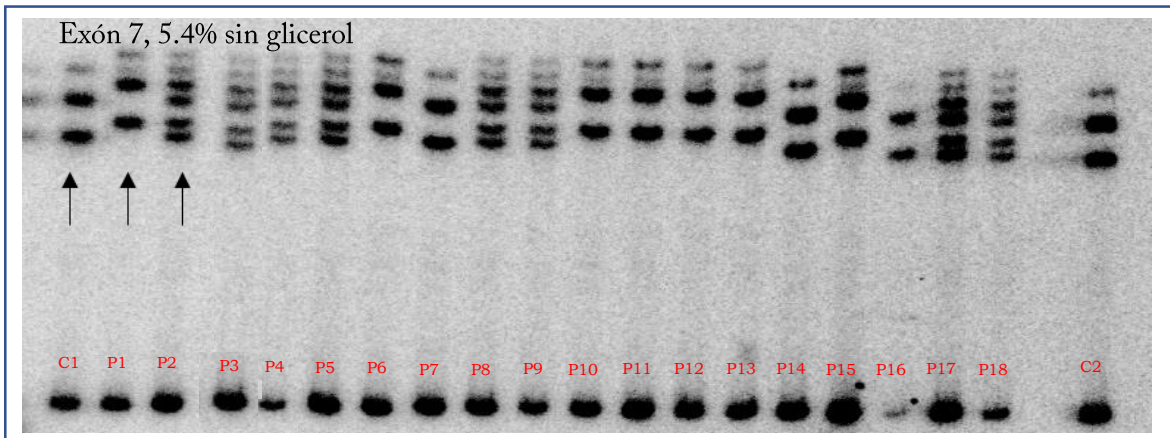


Figura 8 Resultado del análisis del exón 7 mediante la técnica de SSCP en un gel de poliacrilamida al 5.4% sin glicerol en el cual se pueden observar ligeras variaciones en la movilidad de los patrones de bandeo en los individuos P1, P2 y P3 marcados con flecha.

Una vez analizados los exones por la técnica de SSCP y en donde se identificaron variaciones en tres de los diez exones (exón 1, 3 y 7), las muestras de pacientes que presentaron una diferencia en el bandeo fueron purificados mediante el uso del kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Los productos purificados fueron corridos en un gel de agarosa al 1% a 100 volts durante una hora, y comparados haciendo uso de un MPM de 100 pares de bases (Figura 9).

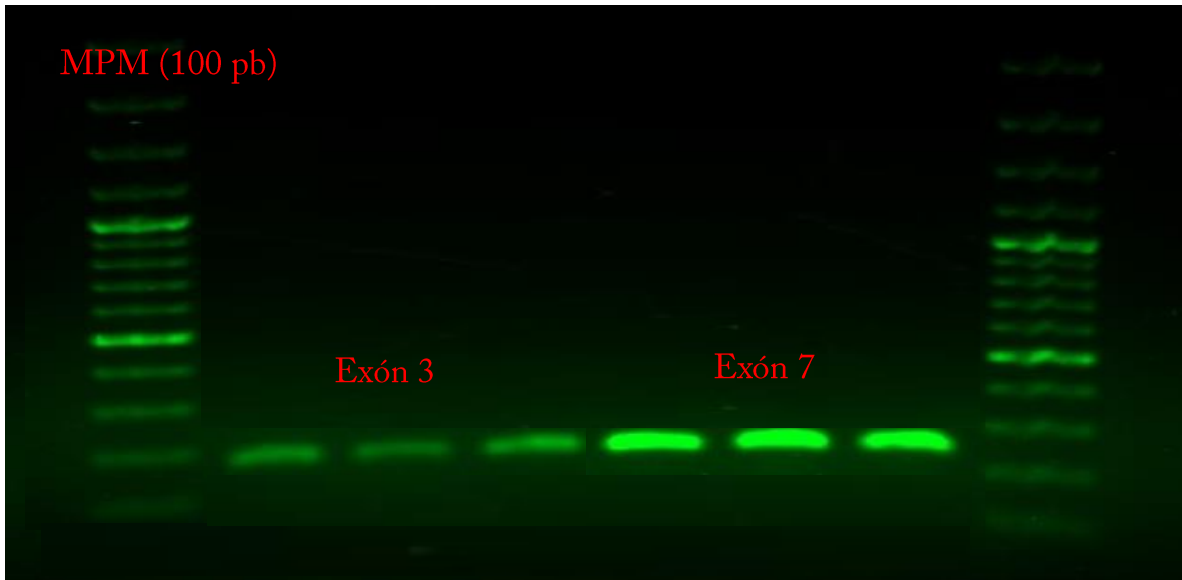


Figura 9 Imagen representativa de las muestras purificadas del exón 3 y 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100 volts.

Los productos purificados fueron secuenciados y se identificó una transversión G>T en la posición 213 del exón 1 que generó una variante sinónima p.P71P (Figura 10). En el exón 3 se identificó una transición G>A en la posición 873 que generó una variante sinónima p.R291R (Figura 11). En el exón 7 se identificó una transversión G>A en la posición 1122 que codifica para una variante p.R374R (Figura 12). La secuencia de aminoácidos fue tomada a partir de la isoforma D (Número de acceso al GenPept NP_077744.4).

WT1 Exón 1 c.213G>T p.P71P

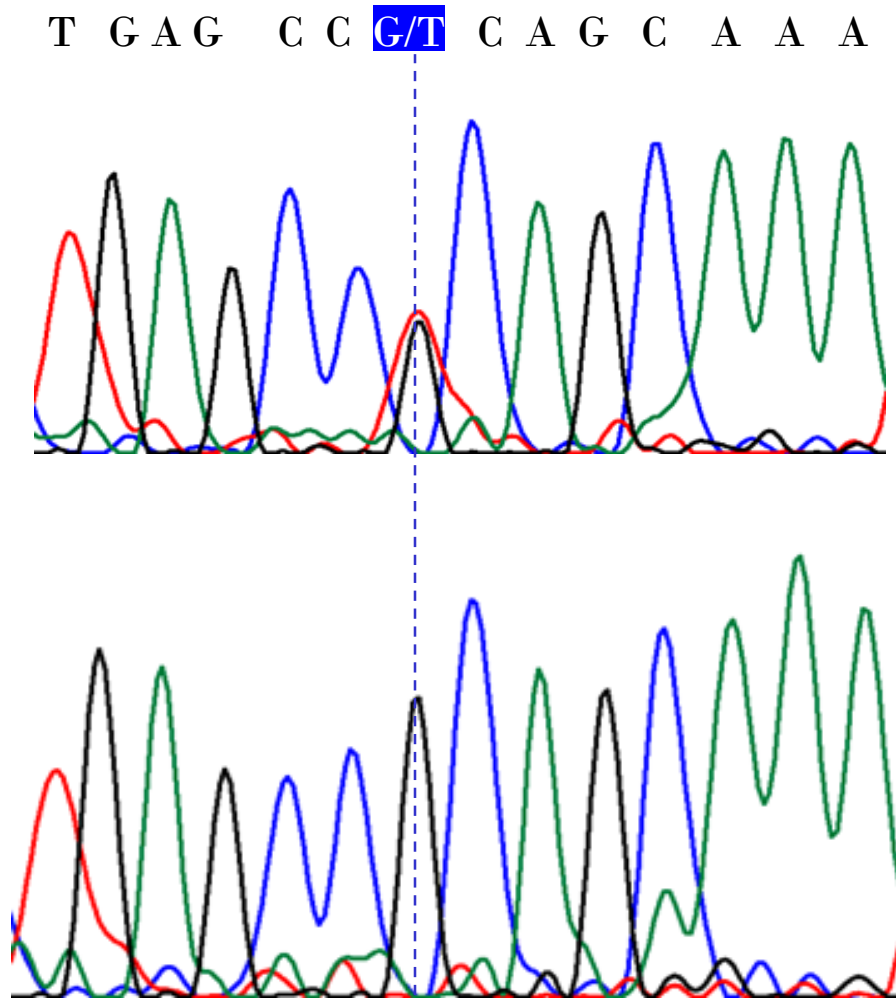


Figura 10 Secuencia nucleotídica parcial del exón 1 del gen *WT1* a partir de pacientes DSD-46, XY con hipospadias.

WT1 Exón 3 c.873G>A p.R291R

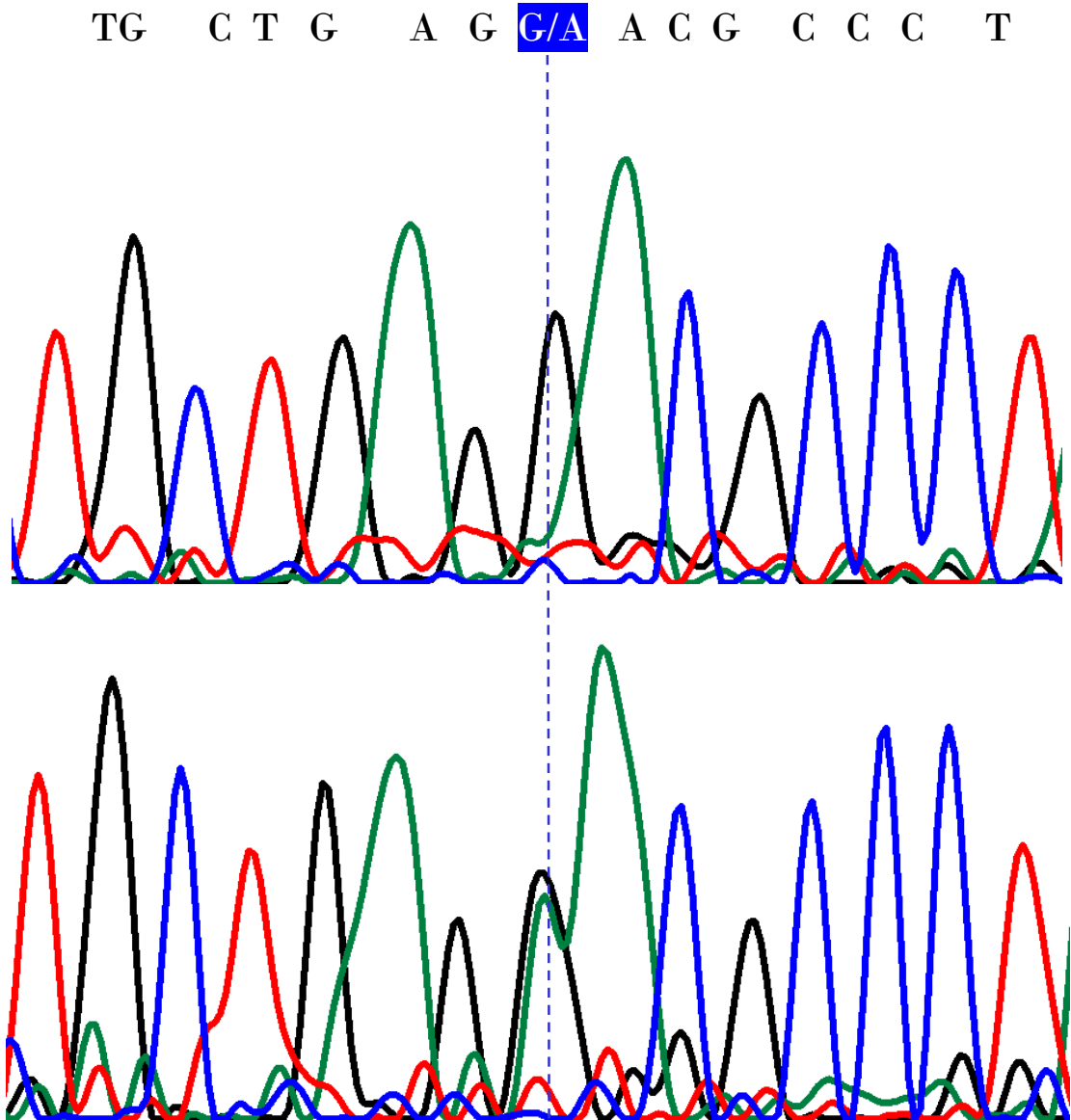


Figure 11 Secuencia nucleotídica parcial del exón 3 del gen *WT1* a partir de pacientes DSD-46, XY con hipospadias.

WT1 Exon 7 c.1122G>A p.R374R

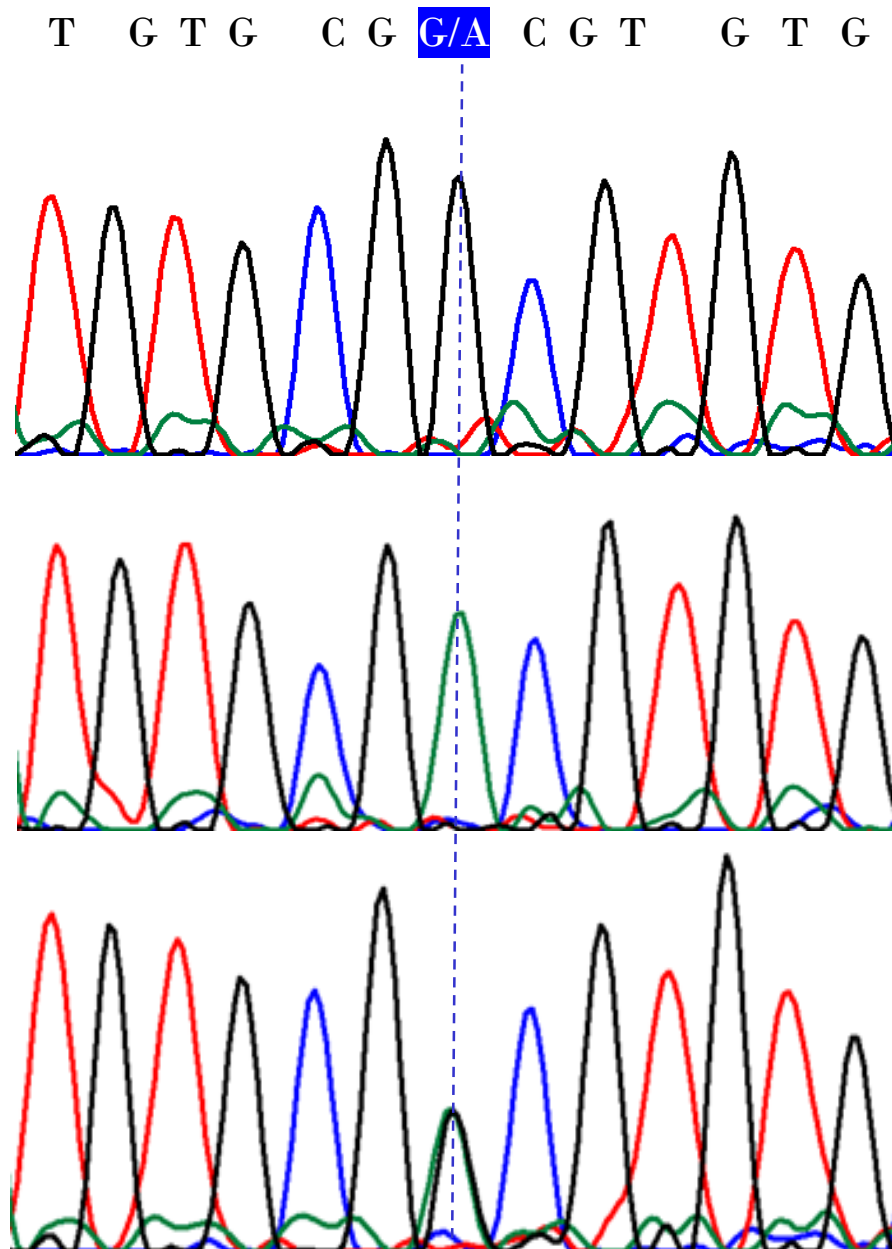


Figura 12 Secuencia nucleotídica parcial del exón 7 del gen *WT1* a partir de pacientes DSD-46, XY con hipospadias.

5.- DISCUSIÓN

En las últimas 2 décadas se han identificado un número abundante de mutaciones en factores de transcripción y genes (por ejemplo *SRY*, *WT1*, *NR5A1*, *DHH* y *SOX9*) asociados al desarrollo genital temprano en pacientes con DSD-46, XY y malformaciones congénitas. Sin embargo, hasta ahora solo en aproximadamente el 40% de los casos clínicos con DSD-46, XY se ha identificado la causa genética (Köhler et al, 2011). Gran parte de la investigación genética sobre hipospadias se ha centrado en la identificación de mutaciones causales.

Todos los genes involucrados en el desarrollo de los genitales externos masculinos han sido genes candidatos para las hipospadias. Debido a que *WT1* y *SFI* desempeñan funciones importantes en el desarrollo embrionario temprano del sistema urogenital, es probable que las mutaciones en estos genes causen no solo hipospadias, sino también defectos más severos (Van der Zanden et al, 2012). El gen *WT1* se ha considerado tradicionalmente como un importante regulador de las primeras etapas, ya que sus mutaciones han sido reportadas en baja frecuencia como causantes de casos sindrómicos graves de hipospadias. Se ha sugerido que las alteraciones en la secuencia de los exones 1 y 2 del gen *WT1* son responsables de hipospadias aisladas (Buglyó et al, 2017).

En este estudio se llevó a cabo el análisis molecular del gen *WT1* mediante la amplificación de los 9 exones de la variante D que es la más grande y no presenta deleciones o carencia de regiones codantes. En la figura 4 se muestra de manera representativa la amplificación del exón 5 en gel de agarosa al 1%, el patrón de

bandas electroforéticas muestran la correcta amplificación del exón en las diferentes muestras de pacientes con hipospadias e individuos sanos control. Nuestros resultados indicaron que todos los exones del gen *WT1* se amplificaron y su tamaño fue el esperado (aproximadamente 250 pares de bases), lo que sugiere la ausencia de deleciones, duplicaciones o inserciones de un número amplio de pares de bases en todos los pacientes analizados DSD-46, XY con hipospadias. Se sabe desde hace mucho tiempo que las anomalías en el gen *WT1* causan síndromes genéticos asociados con hipospadias. Las mutaciones en *WT1* son causas conocidas de hipospadias sindrómicas, pero aún no está claro si juegan un papel en formas aisladas de la enfermedad (Buglyó et al 2018). Los estudios que relacionan al *WT1* como un factor genético causante de hipospadias son escasos; sin embargo, las mutaciones en *WT1* son más probables en el DSD-46, XY con enfermedad renal asociada como la nefropatía, tumor de Wilms y/o malformación renal (Köhler et al 2011), anomalías genitales, insuficiencia renal, gonadoblastoma y síndromes como el síndrome de Denys-Drash (DDS), el síndrome de Frasier y el síndrome nefrótico aislado. Las deleciones completas del gen *WT1* dan como resultado el síndrome WAGR (tumor de Wilms, aniridia, anomalías genitales y discapacidad intelectual) (Dabrowski et al, 2018).

En este proyecto, los resultados obtenidos mediante la técnica de SSCP indicaron una variación en la migración electroforética en los exones 1, 3 y 7. Su posterior secuenciación mostró la existencia de probables polimorfismos de nucleótido único (SNP).

En el exón 1 el cambio se presentó en el nucleótido 213 (G>T). Wang et al en el 2004 reportó SNP presentes en el exón 1 (una transición C-T en la posición 390 en dos pacientes y una transición G-A en la posición 391 en un paciente). Los defectos

en el exón 1 se asociaron con hipospadias más graves (penoescrotal o peneal), mientras que la mutación única del exón 2 se observó en un caso glandular leve. Buglyó et al en el 2017 realizó estudios encontrando una transición 390C-T, reportada originalmente por Wang et al. Según los datos de secuenciación del exoma y del genoma completo disponibles durante los últimos años, el alelo T en la posición 390 es lo suficientemente frecuente como para ser considerado un polimorfismo (rs2234583) en la mayoría de las poblaciones: tiene una frecuencia global del 7,77 por ciento según la última versión la base de datos dbSNP. Este mismo autor reportó una transición GA en el exón 1 y una transición CT en el exón 2, cada una detectada en un solo paciente.

En el exón 3 los resultados indican un cambio en la posición 873 (G>A) y el exón 7 tuvo un cambio en el nucleótido 1122 (G>A). Las investigaciones realizadas por diferentes autores relacionando a *WT1* como factor genético causante de hipospadias aisladas son escasos. Diposarosa et al, en el 2018 reportaron un polimorfismo heterocigoto en la región codificante del exón 7 (c.471A> G), sin embargo, esta variante no provoca ningún cambio en producto de aminoácido (polimorfismo silencioso). No existen reportes de SNPs encontrados en el exón 3. Otros estudios reportan la presencia de mutaciones en el gen y la aparición de hipospadias, sin embargo, están asociadas a algún síndrome de DSD.

El exón 1 y el exón 3 presentan una mutación sinónima. Desde 2006, ha existido un informe constante de mutaciones sinónimas asociadas con enfermedades humanas. En análisis realizados se han encontrado asociaciones de enfermedad por SNP (Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C., 2011). Por lo tanto, la alteración en ambos exones podría estar relacionadas con la presencia de hipospadias.

Nuestra comprensión de cómo un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP conduce a un fenotipo patógeno en una escala de genoma es un esfuerzo fructífero para cualquier persona interesada en desarrollar pruebas de diagnóstico, terapias o simplemente querer comprender la etiología de una enfermedad o rasgo. Las variantes sinónimas a menudo se agrupan como un tipo de variante, sin embargo hay pocas herramientas disponibles para analizar sus efectos sobre la expresión génica. Aunque ahora está claro que las variantes sinónimas son importantes en una variedad de contextos, desde la enfermedad humana hasta la seguridad y eficacia de las proteínas terapéuticas, no existe un consenso claro sobre los enfoques para identificar y validar estos cambios. Los estudios posteriores (en el gen *WTL* y variantes sinónimas reportadas en la literatura) deben estar enfocados en identificar si estas variantes génicas o polimorfismos tienen significado funcional para la proteína.

6.- CONCLUSIONES

Se identificaron tres variantes en el patrón electroforético del gen *WT1* en los exones 1, 3 y 7 al realizar un análisis mediante la técnica de SSCP. La secuenciación de cada uno de ellos reveló el cambio en la secuencia nucleotídica causando una transversión c.213G>T en el exón 1 que generó una variante sinónima p.P71P; una transición c.873G>A en el exón 3 con una variante sinónima p.R291R. En el exón 7 se identificó una transición c.1122G>A que codifica para una variante p.R374R. Las tres variantes identificadas no han sido reportadas por otros autores. No se pudo determinar si los SNPs encontrados pueden ser clasificados como un polimorfismo, sin embargo, estudios posteriores dando seguimiento a los resultados obtenidos, podrían mostrar la significancia de las variantes encontradas en la población mexicana en pacientes con hipospadias.

7.- REFERENCIAS

A

Andrade, J. G., Guaragna, M. S., Soardi, F. C., Guerra-Junior, G., Mello, M. P., & Maciel-Guerra, A. T. (2008). Clinical and genetic findings of five patients with WT1-related disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 52(8), 1236-1243. Doi: 10.1590/s0004-27302008000800006

Algar, E. (2002). A review of the Wilms' tumor 1 gene (WT1) and its role in hematopoiesis and leukemia. *J Hematother Stem Cell Res*, 11(4), 589-599. Doi: 10.1089/15258160260194749

B

Baskin, L. (2012). *Hypospadias*. *Pediatric Surgery*, 1531–1553. doi:10.1016/b978-0-323-07255-7.00121-5

Bor, Y. C., Swartz, J., Morrison, A., Rekosh, D., Ladomery, M., & Hammarskjold, M. L. (2006). The Wilms' tumor 1 (WT1) gene (+KTS isoform) functions with a CTE to enhance translation from an unspliced RNA with a retained intron. *Genes Dev*, 20(12), 1597-1608. doi:10.1101/gad.1402306

Buglyó, G., Beyer, D, Biró, S, & Oláh, É. (2018). The Wilms' tumour 1 gene as a factor in non-syndromic hypospadias: evidence and controversy. *Pathology*, 50(4), 377-381. Doi: 10.1016/j.pathol.2017.12.341

Buglyo, G., Magyar, A., Biro, S., Csizy, I., Beyer, D., Molnar, K., & Olah, E. (2017). Nucleotide Transition 390C-T in the Wilms' Tumor 1 Gene: A Risk Factor of Hypospadias? *Curr Urol*, 10(3), 136-139. Doi: 10.1159/000447167

C

Carmichael, S. L., Ma, C., Choudhry, S., Lammer, E. J., Witte, J. S., & Shaw, G. M. (2013). Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development. *J Urol*, *190*(5), 1884-1892. doi:10.1016/j.juro.2013.05.061

Chen, T., Li, Q., Xu, J., Ding, K., Wang, Y., Wang, W.,... Shen, Y. (2007). Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet*, *15*(1), 23-28. doi:10.1038/sj.ejhg.5201722

D

Dabrowski, E., Armstrong, A. E., Leeth, E., Johnson, E., Cheng, E., Gosiengfiao, Y., & Finlayson, C. (2018). Proximal Hypospadias and a Novel WT1 Variant: When Should Genetic Testing Be Considered? *Pediatrics*, *141*(Suppl 5), S491-S495. doi:10.1542/peds.2017-0230

Dalosso, A. R., Hancock, A. L., Brown, K. W., Williams, A. C., Jackson, S., & Malik, K. (2004). Genomic imprinting at the WT1 gene involves a novel coding transcript (AWT1) that shows deregulation in Wilms' tumours. *Hum Mol Genet*, *13*(4), 405-415. Doi: 10.1093/hmg/ddh038

Diposarosa, R., Pamungkas, K. O., Sribudiani, Y., Herman, H., Suciati, L. P., Rahayu, N. S., & Effendy, S. H. (2018). Description of mutation spectrum and polymorphism of Wilms' tumor 1 (WT1) gene in hypospadias patients in the Indonesian population. *Journal of Pediatric Urology*, *14*(3), 237.e1–237.e7. doi:10.1016/j.jpuro.2017.11.021

Djakovic, N., Nyarangi-Dix, J., Ozturk, A., & Hohenfellner, M. (2008). Hypospadias. *Adv Urol*, 650135. doi:10.1155/2008/650135

H

Hartwig S. y Kreidberg J.A. (2009). Genetic Diseases of the kidney. Pages 509-525.

Han, Y., San-Marina, S., Yang, L., Khoury, H., & Minden, M. D. (2007). The zinc finger domain of Wilms' tumor 1 suppressor gene (WT1) behaves as a dominant negative, leading to abrogation of WT1 oncogenic potential in breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, 9(4), R43. Doi: 10.1186/bcr1743

Hossain, A., & Saunders, G. F. (2001). The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem*, 276(20), 16817-16823. Doi: 10.1074/jbc.M009056200

Hiort, O. (2017). Normal and Variant Sex Development. *Principles of Gender-Specific Medicine*, 1–16. Doi: 10.1016/b978-0-12-803506-1.00014-0

Hughes, I. A. (2001). Minireview: sex differentiation. *Endocrinology*, 142(8), 3281-3287. Doi: 10.1210/endo.142.8.8406

J

Jalanko, H., & Kääriäinen, H. (2013). Nephrotic Disorders. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 1–13. Doi: 10.1016/b978-0-12-

K

Keays, M. A., & Dave, S. (2017). Current hypospadias management: Diagnosis, surgical management, and long-term patient-centred outcomes. *Can Urol Assoc J*, 11(1-2Suppl), S48-S53. doi:10.5489/cuaj.4386

Kraft, K. H., Shukla, A. R., & Canning, D. A. (2010). Hypospadias. *Urol Clin North Am*, 37(2), 167-181. Doi: 10.1016/j.ucl.2010.03.003

Krishnan, S., & Wisniewski, A. B. (2014). Ambiguous Genitalia in Newborns. *Genetic Steroid Disorders*, 87–97. Doi: 10.1016/b978-0-12-416006-4.00007-7

Kohler, B., Biebermann, H., Friedsam, V., Gellermann, J., Maier, R. F., Pohl, M., Krude, H. (2011). Analysis of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1) in patients 46, XY disorders of sex development. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(7), E1131-1136. doi:10.1210/jc.2010-2804

Kohler, B., Delezoide, A. L., Boizet-Bonhoure, B., McPhaul, M. J., Sultan, C., & Lumbroso, S. (2007). Coexpression of Wilms' tumor suppressor 1 (WT1) and

androgen receptor (AR) in the genital tract of human male embryos and regulation of AR promoter activity by WT1. *J Mol Endocrinol*, 38(5), 547-554. Doi: 10.1677/JME-06-0020

L

Little, N. A., Hastie, N. D., & Davies, R. C. (2000). Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein. *Hum Mol Genet*, 9(15), 2231-2239. doi:10.1093/oxfordjournals.hmg.a018914

Lucas-Herald, A. K., & Bashamboo, A. (2014). Gonadal development. *Endocr Dev*, 27, 1-16. Doi: 10.1159/000363608

M

MacLaughlin, D. T., & Donahoe, P. K. (2004). Sex determination and differentiation. *N Engl J Med*, 350(4), 367-378. Doi: 10.1056/NEJMra022784

Makiyan, Z. (2016). Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis*, 12(1), 42-51. Doi: 10.1080/15476278.2016.1145318

Migeon, C. J., & Wisniewski, A. B. (1998). Sexual differentiation: from genes to gender. *Horm Res*, 50(5), 245-251. Doi: 10.1159/000023285

Miller, W. L. (2012). The syndrome of 17,20 lyase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(1), 59-67. doi:10.1210/jc.2011-216

Miller, W. L., & Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*, 32(1), 81-151. doi:10.1210/er.2010-0013

Mouriquand, P. D. E., Demède, D., Gorduza, D., & Mure, P.-Y. (2010). HYPOSPADIAS. *Pediatric Urology*, 526-543. Doi:10.1016/b978-1-4160-3204-5.00041-4

O

Ostrer, H. (2000). Sexual differentiation. *Semin Reprod Med*, 18(1), 41-49. Doi: 10.1055/s-2000-13474

R

Rey, R. A., & Grinspon, R. P. (2011). Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25(2), 221-238. doi:10.1016/j.beem.2010.08.013

Rey, Rodolfo. (2001). Fetal sex differentiation: from molecules to anatomy. *Revista chilena de anatomía*, 19(1), 75-82. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682001000100012>

S

Santos, Amilton Cesar dos, Viana, Diego Carvalho, Oliveira, Gleidson Benevides de, Lobo, Luis Miguel, & Assis-Neto, Antônio Chaves. (2015). Intrauterine sexual differentiation: biosynthesis and action of sexual steroid hormones. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(3), 395-405. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500479>

Stein, R. (2012). Hypospadias. *European Urology Supplements*, 11(2), 33–45.

Doi: 10.1016/j.eursup.2012.01.002

Sobel, V., Zhu, Y. S., & Imperato-McGinley, J. (2004). Fetal hormones and sexual differentiation. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 31(4), 837-856, x-xi. doi:10.1016/j.ogc.2004.08.005

Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2013). Synonymous Mutations as a Cause of Human Genetic Disease. *eLS*.doi:10.1002/9780470015902.a0025173

T

Tatsumi, N., Hojo, N., Sakamoto, H., Inaba, R., Moriguchi, N., Matsuno, K., . . . Oji, Y. (2015). Identification of a Novel C-Terminal Truncated WT1 Isoform with Antagonistic Effects against Major WT1 Isoforms. *PLoS One*, 10(6), e0130578. doi:10.1371/journal.pone.0130578

V

Van der Horst, H. J., & de Wall, L. L. (2017). Hypospadias, all there is to know. *Eur J Pediatr*, 176(4), 435-441. Doi: 10.1007/s00431-017-2864-5

Van der Zanden, L. F., van Rooij, I. A., Feitz, W. F., Franke, B., Knoers, N. V., & Roeleveld, N. (2012). Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum Reprod Update*, 18(3), 260-283. doi:10.1093/humupd/dms002

Voutilainen, R. (1992). Differentiation of the fetal gonad. *Horm Res*, 38 Suppl 2, 66-71. Doi: 10.1159/000182601

W

Wang, Y., Li, Q., Xu, J., Liu, Q., Wang, W., Lin, Y., . . . Shen, Y. (2004). Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur J Hum Genet*, 12(9), 706-712. doi:10.1038/sj.ejhg.5201232

Warne, G. L., & Kanumakala, S. (2002). Molecular endocrinology of sex differentiation. *Semin Reprod Med*, 20(3), 169-180. Doi: 10.1055/s-2002-35381

Y

Yang, L., Han, Y., Suarez Saiz, F., & Minden, M. D. (2007). A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21(5), 868-876. doi:10.1038/sj.leu.2404624