



Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**“EXPRESIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DESERT HEDGEHOG
(DHH) SILVESTRES Y MUTANTES (L162P Y Δ G1086) EN DIFERENTES SISTEMAS
IN VITRO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. JOSUÉ JORAM CASTRO REYES

CO-DIRECTORA: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

CO-DIRECTOR: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA

ASESOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2011

COMITÉ TUTORAL

CO-DIRECTORA: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

Unidad de Investigación Biomédica, Laboratorio de Biología del Desarrollo,
Centro Médico Nacional 20 de noviembre., ISSSTE.

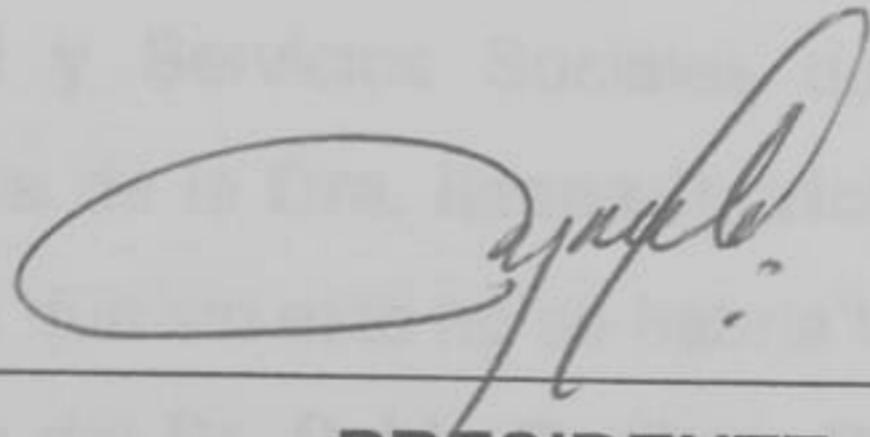
CO-DIRECTOR: DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATSUMURA

Laboratorio de Endocrinología Molecular, Departamento de Biología de la
Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I).

ASESOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

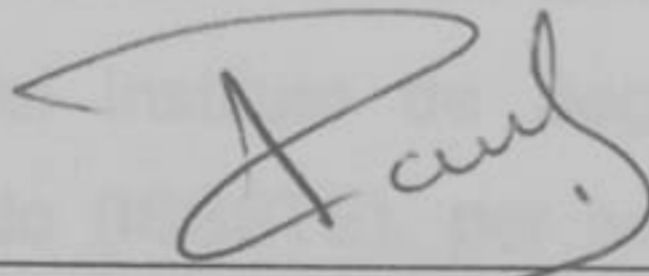
Laboratorio de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre,
ISSSTE.

Los miembros del Jurado de examen designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud (Posgrado en Biología Experimental), Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, abajo firmantes aprobaron la tesis titulada “ **EXPRESIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DESERT HEDGEHOG (DHH) SILVESTRES Y MUTANTES (L162P Y Δ G1086) EN DIFERENTES SISTEMAS *IN VITRO***”, con fecha 8 de Julio, 2011.



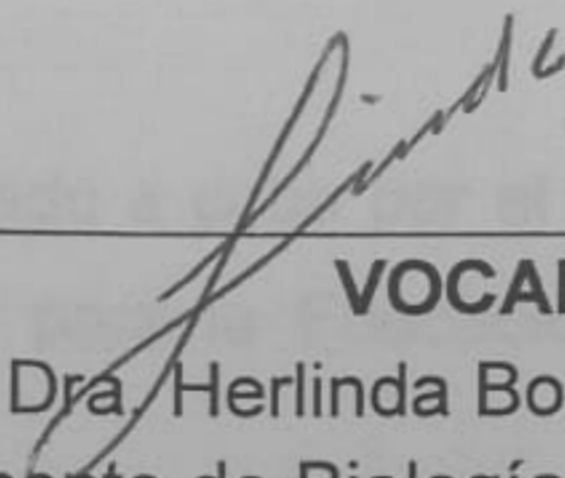
PRESIDENTE

Dra. Marcela Arteaga Silva
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



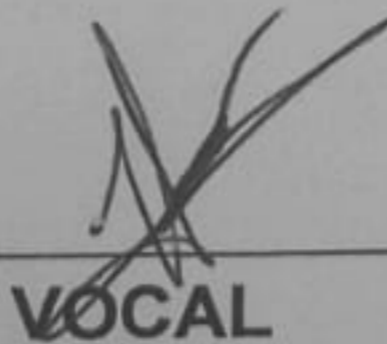
SECRETARIO

Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez
Unidad de Medicina Genómica, Centro Médico Nacional
20 de Noviembre, ISSSTE



VOCAL

Dra. Herlinda Bonilla Jaime
Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



VOCAL

Dra. Haydeé Rosas Vargas
Unidad de Investigación Médica en Genética Humana. Hospital de Pediatría
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS

La parte experimental de esta tesis se desarrollo en:

**EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LA DIVISIÓN
DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA, SUBDIRECCIÓN DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACIÓN DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE
NOVIEMBRE ", INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES
DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO (ISSSTE).**

AGRADECIMIENTOS

Fue para mí una distinción haber realizado la presente tesis en el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la División de Investigación Biomédica, Subdirección de Enseñanza e Investigación del centro Médico Nacional "20 de Noviembre ", Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), bajo la tutoría de la **Dra. Ileana Patricia Canto Cetina**, gracias por su apoyo incondicional, ya que sin esto no se habría logrado este trabajo.

Agradezco la co-tutoría del **Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura**, Laboratorio de Endocrinología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), admiro su pasión y dedicación por lo que hace.

Gracias a la asesoría del **Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez**, Laboratorio de Medicina Genómica del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE), por sus aportaciones en los experimentos, claro ejemplo a seguir.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por haber recibido una beca durante la realización de mis estudios de maestría (**Número de registro 212844**).

Este trabajo pudo ser llevado a cabo por el financiamiento otorgado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, CONACYT, referencia **SEP-2004-C01-46683/3043**.

INDÍCE

1.- INDICE.....	1
2.- RESUMEN.....	2-3
3.- INTRODUCCIÓN.....	4-5
4.- ANTECEDENTES.....	6-30
4.1) Diferenciación sexual en mamíferos.....	6-11
4.2) Genes que intervienen en la diferenciación gonadal a partir de la gónada indiferenciada.....	12-17
4.3) Alteraciones en la diferenciación sexual.....	17-20
4.4) Gen Desert hedgehog (DHH).....	20-26
4.5) Receptor PTCH2.....	26-27
4.6) Mutaciones en la proteína Sonic hedgehog (SHH).....	28-30
5.- JUSTIFICACIÓN.....	31-33
6.- OBJETIVO GENERAL.....	34
7.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
8.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	35-49
9.- RESULTADOS.....	50-64
10.- DISCUSIÓN.....	65-71
11.- CONCLUSIONES.....	72
12.- BIBLIOGRAFÍA.....	76-93

RESUMEN

No todas las alteraciones en la diferenciación sexual se pueden atribuir al gen SRY del cromosoma sexual Y. Se ha propuesto que la disgenesia gonadal (DG), trastorno del desarrollo embrionario que impide la maduración completa del tejido gonadal en testículo, podría estar determinada por genes autosómicos que intervienen en el desarrollo del mismo. Estudios con ratones machos que no expresan (*knock out*) el gen Desert Hedgehog (*Dhh*) señalan que no hay desarrollo testicular y que están totalmente feminizados. Por otra parte, nuestro grupo de investigación reportó tres pacientes con disgenesia gonadal pura 46XY (DGP, 46XY) con mutaciones puntuales en el gen *DHH*, una de las cuales da lugar a un cambio de un aminoácido (p.L162P) en el fragmento amino terminal y otra con la eliminación de un nucleótido (1086 Δ G) que recorre el marco de lectura y genera un codón de paro prematuro. El objetivo de nuestro estudio fue producir y caracterizar las proteínas DHH silvestre y mutantes en diferentes sistemas, con la finalidad de estudiar su posible participación en la DG. Los métodos incluyeron las construcciones moleculares en plásmidos circulares, así como la mutagénesis sitio-dirigida, secuenciación de las construcciones y la síntesis de las proteínas *in vitro* e *in vivo*. En la síntesis *in vitro* de la proteína DHH mutante (p.L162P) se observó disminución de la señal por medio de la hibridación tipo Western blot, con respecto a la proteína silvestre, mientras que la proteína mutada en el fragmento carboxilo terminal Δ G 1086 (p.L362del) no fue identificada con anticuerpos específicos para esta región.

Cuando se analizaron por Western blot las proteínas DHH mutantes obtenidas por síntesis en el modelo HEK 293, se observaron diferencias de tamaño con respecto a la

proteína silvestre, ya que la proteína mutante 1086 Δ G (p.L362del) se localizó aproximadamente 3KDa abajo del peso de la silvestre, así como en menor cantidad. La proteína mutante (p.L162P) no pudo ser identificada con anticuerpos específicos del fragmento amino utilizados en este sistema. Nosotros proponemos que las mutaciones p.L162P y Δ G1086 (p.L362del) podrían ser la causa de una deficiencia en cantidad de la proteína DHH, lo cual probablemente sea uno de los posibles factores etiológicos de la disgenesia gonadal completa 46, XY.

INTRODUCCIÓN

Se sabe en la actualidad que la diferenciación sexual en los mamíferos, incluyendo el humano, abarca múltiples eventos en los que participan varios genes, entre ellos el gen Desert hedgehog (*DHH*). Mutaciones puntuales en dicho gen, se sabe que están relacionadas con la disgenesia gonadal en el humano (Canto y cols., 2004). La disgenesia gonadal es un trastorno del desarrollo embrionario que impide la maduración y formación completa del tejido gonadal en su diferenciación, hacia testículo u ovario. Este estudio está enfocado en la expresión e identificación de la proteína Desert hedgehog (DHH) silvestre y dos mutaciones (p. L162P y Δ G1086) relacionadas con la disgenesia gonadal pura, con fenotipo, 46, XY.

Pocos estudios se han llevado a cabo, *in vitro*, para la identificación de esta proteína (DHH), o alguna otra proteína de la misma familia, teniendo algunas diferencias y similitudes en sus resultados. Nosotros utilizamos dos modelos celulares (reticulocitos y HEK 293) en los cuales se pudo sintetizar las proteínas, silvestre y mutantes, con la finalidad de identificar su expresión por medio de la técnica de Western blot.

Existe la posibilidad que dichas mutaciones puntuales, en el ADN, pueden estar afectando la estructura terciaria de la proteína Desert hedgehog (DHH), a nivel de los aminoácidos, los cuales podrían estar involucrados en la torsión y plegamientos de la estructura conformacional de la proteína.

Lo anterior se puede relacionar con nuestros resultados obtenidos por medio de los Western blots, ya que existe una gran diferencia de señal de la proteína DHH silvestre y mutantes (para ambos modelos celulares), en lo cual hay una disminución, cualitativa y

cuantitativa, de ambas mutaciones indicada por las densitometrías que llevamos a cabo.

Esta tesis demuestra la importancia que tiene el gen y la proteína Desert hedgehog (DHH) en la diferenciación sexual del macho, en mamíferos, evidenciando que es una molécula clave para la diferenciación gonadal.

ANTECEDENTES

DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN MAMÍFEROS

La diferenciación sexual es uno de los fenómenos biológicos más importantes y complejos, ya que permite la perpetuación de las especies. El dimorfismo sexual en los mamíferos es el resultado de una serie de eventos que se presentan en las etapas más tempranas de la vida, requiriéndose para ello un alto grado de precisión en sus mecanismos de regulación. Éste se realiza en tres etapas sucesivas: cromosómica, gonadal y fenotípica. La diferenciación cromosómica se inicia al momento de la fertilización cuando un espermatozoide que posee un cromosoma "X" o un cromosoma "Y" fertiliza a un óvulo que aporta un cromosoma "X", estableciéndose así el dimorfismo sexual que caracteriza a los mamíferos. La hembra presenta un complemento cromosómico sexual XX y el macho XY. El mecanismo posterior de la diferenciación sexual dependerá de la presencia de factores determinantes de feminización o de masculinización presentes en los autosomas y en los cromosomas sexuales (Ohno, 1967). La presencia del cromosoma "Y" es necesaria para la diferenciación testicular de la gónada primitiva, independientemente del número de cromosomas "X" presentes en el genoma de un individuo (Goodfellow y Darling, 1988).

En el humano, la diferenciación sexual cromosómica se realiza al momento de la fertilización, pero el dimorfismo sexual gonadal se hace evidente hasta la semana 6 o 7 de la vida intrauterina (Kofman-Alfaro y cols., 1990). En los embriones femeninos, uno de los principales indicadores del género del embrión es la presencia o ausencia de cromatina sexual, lo que genera el cuerpo de Barr al condensarse uno de los cromosomas "X". En este estadio indiferenciado del desarrollo sexual, los gametos

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

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

Cuando aparecen por primera vez las crestas genitales, tanto los embriones de sexo masculino como femenino, son morfológicamente indistinguibles debido a que la gónada “primitiva” está aún indiferenciada (Carlson, 2005). En el caso de los embriones de sexo masculino, la gónada primitiva se transformará en testículo, si es que existe y es funcional el producto del gen *SRY* o factor determinante testicular (Sinclair, 1990), el cual orquestrará una cascada de eventos (figura 1) que desencadenan el desarrollo testicular a partir de la gónada indiferenciada (López y cols., 1995).

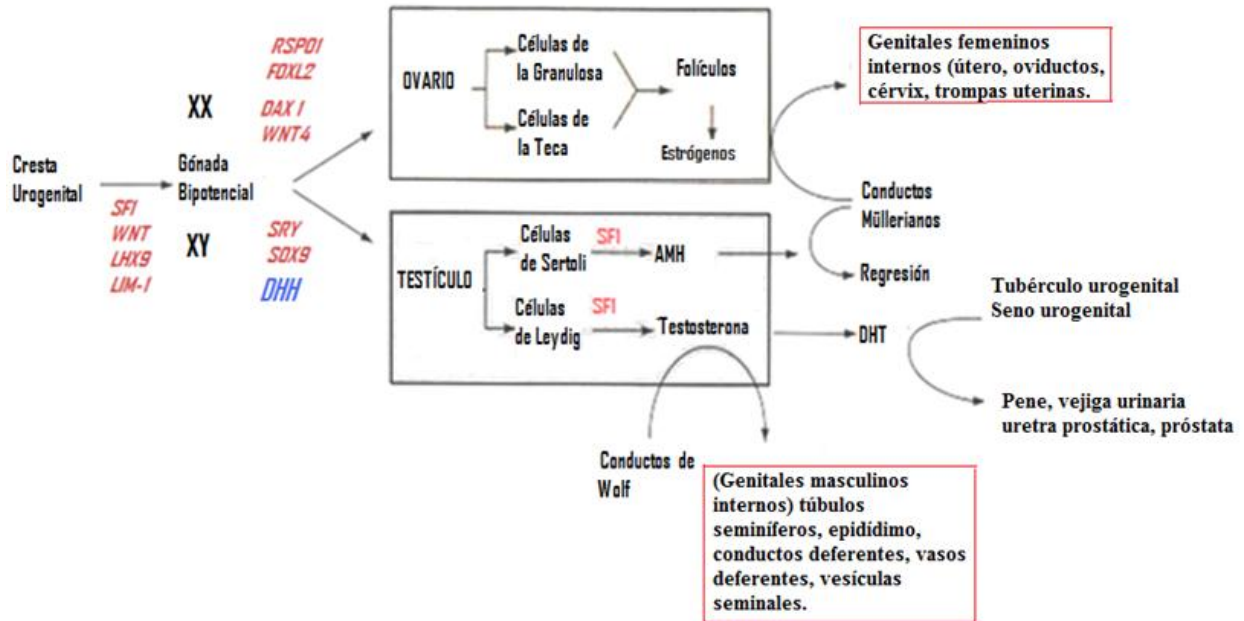


Figura 1. Genes que intervienen en la diferenciación gonadal en el humano en condiciones normales a partir de la cresta urogenital, la cual se convertirá en gónada bipotencial, ya que si se expresa el factor determinante testicular (*SRY*) la gónada se diferenciara en testículo, o por lo contrario se diferenciara en ovario en caso de que *SRY* no se exprese. (Modificado del Gilbert., 2010)

Se ha propuesto que el gen *SRY*, localizado en la región Yp11.3, codifica a una proteína que actúa como factor de transcripción que induce la proliferación del epitelio celómico de las crestas gonadales, así como la migración de células mesonéfricas hacia la cresta gonadal. La expresión del gen *SRY* en la cresta genital corresponde al periodo de inicio a la formación del testículo, es decir, en la sexta semana de edad gestacional en el humano y entre los días 10.5 y 12.5 días post coito en el ratón. Por su parte, en las células mesonéfricas, se encuentran los precursores de las células de Leydig, de vasos sanguíneos y de otros elementos del tejido intersticial del testículo, así como de las células mioideas peritubulares. La presencia de estas últimas parece ser determinante para que las futuras células de Sertoli, provenientes al menos en parte del

epitelio celómico, se organicen junto con las células germinales provenientes del saco vitelino, formando los cordones testiculares. La interacción entre las células mesonéfricas y las células del epitelio celómico generan la diferenciación de las últimas, en células de Sertoli, las cuales presentan un patrón de expresión específico, caracterizado por un aumento de proteínas como SOX9 (gen que codifica para la proteína 9 con caja HMG relacionada con el gen SRY) y HIM (hormona que inhibe las estructuras Müllermanas), entre otras (Capel, 2000).

El mecanismo que origina el dimorfismo sexual en mamíferos fue descrito por Jost y colaboradores (1983), quienes demostraron que cuando la gónada primitiva se diferencia a testículo, secretan hormonas que induce el desarrollo del fenotipo masculino; en cambio, si la diferenciación gonadal es hacia ovario, el fenotipo femenino se desarrolla pasivamente. Asimismo, observaron que la ausencia temprana de gónadas fetales también induce fenotipo femenino (Jost y cols., 1983). Los genitales externos se desarrollan a partir de un primordio común que comprende el tubérculo genital y los pliegues genitales. Las estructuras primordiales del tracto genital que darán origen a los genitales internos incluyen dos sistemas de conductos presentes en los embriones de ambos sexos: los conductos de Wolff o mesonéfricos y los conductos de Müller o paramesonéfricos (Grumbach y Conte, 1998).

El desarrollo del fenotipo masculino es consecuencia del efecto de tres hormonas fetales sobre los primordios genitales. El primer paso en la diferenciación genital masculina es mediado por la HIM de origen testicular, que es sintetizada por las células de Sertoli y ocasiona la involución de los conductos de Müller. En el humano, este proceso se observa

entre la sexta y la octava semana de la gestación y concluye en la décima primera con la desaparición de estas estructura (Carlson, 2005).

La proteína HIM es parte de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y actúa a través de dos receptores (tipo I y tipo II). La interacción de HIM y su receptor es muy específica, ya que dará inicio a la fase hormonal de la vía de la diferenciación masculina. Posterior a la síntesis de la HIM, las células intersticiales del testículo fetal se citodiferencian en células de Leydig, las cuales servirán como sustrato anatómico para la producción de testosterona, segunda hormona fetal virilizante que participa en la diferenciación del fenotipo masculino. Este efecto virilizante de la testosterona se ejerce particularmente sobre los conductos de Wolff, dando lugar a los genitales internos, incluyendo el epidídimo, los vasos deferentes, las vesículas seminales y el conducto eyaculador (Wilson, 1995).

La biosíntesis *de novo* de testosterona en el testículo fetal se lleva a cabo a partir del colesterol, teniendo como sustrato al acetato o a las lipoproteínas de baja densidad del plasma. La testosterona es el principal andrógeno secretado por el testículo y es el precursor (o prohormona) de la tercera hormona fetal virilizante, la dihidrotestosterona (DHT). Ésta se forma en las células blanco por la acción de la 5α -reductasa extragonadal y es el mediador intracelular de la gran mayoría de las acciones de los andrógenos. La DHT, durante la embriogénesis, es la única responsable del desarrollo de los genitales externos masculinos y de la próstata durante la embriogénesis (Imperato-McGinley y Gautier, 1994).

La testosterona se une a dos proteínas: a la globulina transportadora de testosterona (SHBG) y a la albúmina. El paso de la testosterona libre hacia las células no es

dependiente de energía y probablemente está dado por un fenómeno de difusión pasiva. Tanto la testosterona como la DHT se unen con la misma afinidad a las proteínas receptoras. El complejo andrógeno-receptor cambia su conformación para promover su unión al ADN y activando la transcripción y síntesis de proteínas que desencadenan los mecanismos intracelulares que conducen a la virilización de los conductos de Wolff en la gestación.

Cabe mencionar que durante la embriogénesis, el ovario no secreta HIM ni testosterona, la ausencia de estas dos hormonas ocasiona la diferenciación de los conductos de Müller y la regresión de los conductos de Wolff, dando así a la formación de los genitales femeninos internos: útero, trompas de Falopio y tercio superior de la vagina (figura 1) (Imperato-McGinley y Gautier, 1994).

Por otra parte se sabe que proteínas como WT1, SF1, SOX9, DAX1, WNT-4 y DHH, interactúan con la región promotora de HIM, actuando como factores de transcripción específicos y regulan la expresión de la hormona antimuleriana. En todos ellos existen evidencias que demuestran su participación en el desarrollo gonadal y desarrollo del fenotipo masculino (Achermann y cols., 2002; MacLaughlin y Donahoe, 2004).

GENES QUE INTERVIENEN EN LA DIFERENCIACIÓN GONADAL A PARTIR DE LA GÓNADA INDIFERENCIADA.

Existe una gran cantidad de genes involucrados en la diferenciación sexual de los mamíferos (figura 1). Uno de estos genes es *WT1* (gen del tumor de Wilm's) el cual fue identificado originalmente como un gen supresor de tumor, que desempeña roles críticos en los diversos procesos del desarrollo durante la embriogénesis (Kreidberg y cols., 1993; Herzer y cols., 1999). En la actualidad se han descrito cuatro isoformas principales de *WT1* de acuerdo al sitio de inicio de la transcripción y de los sitios de procesamiento alternativo en el ARNm: *WT1-A*, la *WT1-B*, la *WT1-C*, la *WT1-D*, todas ellas con un peso molecular de 52-54 KDa (Haber y cols., 1991).

De igual forma, la expresión de las isoformas se mantiene en una proporción constante en todos los tejidos en los que se expresan, por lo que las alteraciones que modifican esta proporción pueden conducir a la presencia de patologías en el humano (Hammes y cols., 2001).

Además de su función de gen supresor de tumor, el gen *WT1* desempeña un rol esencial en el desarrollo normal del sistema genitourinario. La expresión de *WT1* y de *SRY* se superpone durante la diferenciación gonadal temprana de las gónadas masculinas. En el ratón, el gen *Wt1* se expresa continuamente en las células somáticas de las gónadas desde el día 9.5 post coito, mientras que el gen *Sry* se expresa en forma transitoria en las mismas células desde el 10.5 al 12.5 día post coito (Pelletier y cols., 1991; Armstrong y cols., 1993; Hacker y cols., 1995).

En los humanos la expresión de *WT1* se detecta a partir del día 32 postovulación en la cresta gonadal tanto en los embriones masculinos como femeninos. Se ha propuesto

que *WT1* regula al gen *SRY*, las evidencias que apoyan lo anterior son las siguientes:

- 1) La presencia de mutaciones tanto en *WT1* como en el *SRY* dan lugar a reversión sexual 46, XY.
- 2) El patrón de expresión de *WT1* y *SRY* en la gónada se sobreponen.
- 3) *WT1* puede regular en forma positiva el promotor del *SRY* al unirse a sus elementos en *cis*.
- 4) Asimismo, *WT1* puede en forma directa transactivar la expresión endógena del *SRY* en su contexto cromosómico nativo (Hossain y cols., 2001).

Otro gen involucrado en dicho proceso de la diferenciación gonadal, es el gen *SF1* (factor esteroideogénico), homólogo al factor 1 *Fushi tarazu* [*Ftz-F1*] de la *Drosophila melanogaster*. Este gen es considerado como un gen regulador maestro del sistema reproductivo, cuya función es esencial para la homeostasis endocrina en la vida posnatal. En el ratón la expresión de *Sf1* precede a la expresión del *Sry* y se puede observar en la cresta urogenital de machos y hembras a partir del día 9 post coito. Esta expresión se puede observar específicamente en los precursores de las células esteroideogénicas de las glándulas suprarrenales y de las gónadas (Ikeda y cols., 1994). En el día 12.5 post coito, en el cual ya se formaron los cordones testiculares, la expresión de *Sf1* persiste y se puede observar tanto en las células esteroideogénicas de Leydig como en los cordones testiculares. La expresión de *Sf1* en las células de Sertoli, indica que este gen tiene un rol en el desarrollo gonadal diferente a la regulación de la expresión de las enzimas esteroideogénicas. Asimismo, este gen tiene una expresión sexual dimórfica, es decir su expresión persiste en el testículo y desaparece en el ovario entre los 13.5 y 16.5 días pos coito (Ikeda y cols., 1994).

En el humano, *SF1* se expresa siguiendo un patrón similar al del ratón, lo cual indica que este gen desempeña un rol importante en la diferenciación y función de las células de Sertoli. Durante la diferenciación gonadal, *Sf1* interactúa con diversos factores de transcripción involucrados en la diferenciación gonadal (*WT1*, *SOX9* y *DAX1*) (Ozisik y cols., 2002).

Por otra parte, la proteína, en humano, *SOX9* (gen que codifica para la proteína 9 con caja HMG relacionada con el gen *SRY*) es un factor de transcripción involucrado en la diferenciación testicular (Mertin y cols., 1999). Ya que estudios llevados a cabo en murinos, demostraron que el gen *Sox9* se expresa en la cresta genital de los machos pero no en la de las hembras. Los transcritos, de los ratones, de *Sox9* pueden ser detectados en el linaje de las células de Sertoli del macho, entre los 10.5 y 11.5 días post coito en coincidencia con el tiempo en que el gen, en ratón, *Sry* alcanza su pico máximo de expresión. Con base en lo anterior, se ha sugerido que *Sry* pudiese regular directamente o indirectamente en forma positiva la expresión de *Sox9*. Esta expresión se observa sólo en los cordones sexuales a los 13.5 días post coito y se mantiene en dichas estructuras durante el desarrollo testicular. En el humano, *SOX9* se expresa siguiendo un patrón similar al del ratón lo cual indica que *SOX9* desempeña un rol importante en la diferenciación y función de las células de Sertoli (Harley y cols., 2003). Las evidencias en la literatura apoyan que *SOX9* posee un rol determinante en la diferenciación gonadal. Se ha descrito que el 75% de los sujetos con displasia campomélica y mutaciones en *SOX9* presentan reversión sexual 46, XY (Harley y cols., 2003).

Por otra parte el gen *DAX 1* (gen de la reversión sexual sensible a dosis o gen de la hipoplasia suprarrenal congénita o gen de la región crítica en el cromosoma X (*dax 1* o *nr0b* o *dss*) que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares huérfanos, el cual se expresa en las glándulas suprarrenales, en las gónadas, en el núcleo ventromedial del hipotálamo y en los gonadotrópos de la hipófisis. (Achermann y cols., 2001).

Este gen actúa en parte inhibiendo la transcripción de otros genes (incluyendo *SF1* y receptores de estrógenos y andrógenos) (Holter y cols., 2002). El gen *Dax1*, en ratón, y *DAX1*, en humano, se expresan en la cresta urogenital a los 10.5 días pos coito y al día 33 posovulación respectivamente (la cual es paralela a la expresión del gen *SF1*). En el ratón esta expresión se detecta en la gónada del macho hasta el día 12 pos coito y posteriormente disminuye en el testículo, pero continúa expresándose en el ovario. (Ikeda y col, 2001). Esta expresión dimórfica indica que *Dax1/DAX1* desempeña un rol importante en la determinación sexual. Los estudios llevados a cabo en ratones XY nulos para *Dax1*, demostraron que éstos eran hipogonádicos e infértiles y presentaban alteraciones en la arquitectura testicular caracterizada por degeneración progresiva de los túbulos seminíferos, pérdida de las células germinales, hiperplasia de las células de Leydig y deficiencia de las células miodes peritubulares ya que también presentan alteraciones en la morfología y peso de los testículos (el peso es por debajo de la mitad de los testículos de los ratones silvestres), así como alteraciones en la espermatogénesis, sugiriendo así que *Dax1* actúa en la regulación de la función testicular. Sin embargo en los ratones XX nulos para este gen, no se documentó alteraciones en los ovarios. Debido a esto, se postuló que *Dax1* desempeña un rol esencial en la diferenciación testicular (Jeffer y cols., 2001, Meeks y cols., 2003).

Otra proteína que también se encuentra involucrada en la determinación del sexo es *Wnt-4*, que es un miembro de la familia de las proteínas *Wnt* y se sugiere que la función de *Wnt-4* es bloquear el desarrollo del fenotipo masculino en los embriones XX (Jeays y cols., 2003). En un estudio llevado a cabo por Jordan y cols. (2003), demostraron en ratones machos XY transgénicos, que la sobreexpresión de *Wnt-4* conduce a una desorganización de la vasculatura testicular, así como a una disminución tanto de la testosterona sérica como de la proteína reguladora de la esteroidogénesis. Con estos antecedentes se puede sugerir que la alteración de *WNT-4* puede dar lugar a reversiones sexuales como la disgenesia gonadal pura 46, XY (Jordan y cols., 2001; Jordan y cols., 2003).

Tabla 1. Localización y alteraciones de los genes involucrados en la diferenciación sexual del macho, en humano (Modificado del Gilbert., 2010).

GEN	LOCALIZACIÓN EN EL CROMOSOMA	RESULTADOS CUANDO SE MUTA EL GEN
SF1	Brazo largo del cromosoma 9, en la banda 33.	Bloquea el desarrollo de la cresta urogenital y de la glándula adrenal así como alteraciones de la esteroidogénesis
WT1	Brazo corto del cromosoma 11, en la banda 13.	Afecta el desarrollo del riñón, bazo, glándula adrenal, fallas cardíacas y ausencia de gónadas (reversión sexual).
LHX9	Brazo largo del cromosoma 1, en la banda 31-32.	No hay desarrollo de la cresta urogenital.
LIM1	Brazo corto del cromosoma 11, en la banda 12-13.	Ausencia de riñones y cresta urogenital.
SRY	Brazo corto del cromosoma Y, en la banda 11.3.	Reversión sexual en el macho XY
SOX9	Brazo largo del cromosoma 17, en la banda 24.	Reversión sexual del macho y malformaciones esqueléticas.
FGF9	Brazo largo del cromosoma 13, en la banda 11-13.	Disgenesia gonadal en machos (XY) o alteraciones en el pulmón.
AMH	Brazo corto del cromosoma 19, en la banda 13.	Reversión sexual en el macho (XY) y persistencia de los conductos Mullerianos.
DAX1	Brazo largo del cromosoma X, en la banda 21.	No se presenta reversión sexual en individuos XX, pero si se presenta una degeneración progresiva del epitelio germinal testicular en individuos XY.
WNT4	Brazo corto del cromosoma 1, en la banda 35.	Alteraciones en el desarrollo de los conductos sexuales del macho, y alteraciones en las células germinales masculinas.

ALTERACIONES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Las alteraciones en cualquier estadio de la diferenciación sexual, durante la embriogénesis, conducen a malformaciones en el desarrollo sexual y éstas pueden ser clasificadas en: a) errores del cromosoma sexual, b) errores del sexo gonadal y c) errores en el sexo fenotípico (Griffin y Wilson., 1995).

Dentro de las alteraciones en la traducción del sexo cromosómico al sexo gonadal se encuentran las disgenesias gonadales (DG), en las que hasta la fecha no se ha podido dilucidar el factor preciso que las determina. Las DG abarcan a un grupo heterogéneo de patologías que presentan diversas anormalidades cromosómicas, gonadales y fenotípicas. Para su estudio han sido divididas en dos grandes grupos, las disgenesias gonadales puras (DGP), que a su vez se subdividen en 46, XX y 46, XY, y las disgenesias gonadales mixtas (DGM). El diagnóstico certero en estas entidades solamente se puede obtener mediante el análisis histopatológico de las gónadas existentes (Kofman-Alfaro y cols., 1999).

La DGP 46, XY es una alteración de la diferenciación gonadal en la cual individuos con complemento cromosómico 46, XY presentan disgenesia testicular y ésta puede presentarse como DGP completa o DGP parcial. Este síndrome posee una gran heterogeneidad fenotípica, ya que la virilización de los genitales externos dependerá del momento de la embriogénesis en que la afección tuvo lugar y si ésta abarcó a ambos compartimentos testiculares o solamente a uno de ellos. Si la alteración se presenta antes de que el testículo inicie la secreción de la HIM y de la testosterona, el fenotipo al nacimiento será totalmente femenino. Cuando se presenta el proceso disgenésico después de esta etapa, el individuo tiene diversos grados de ambigüedad genital que dependerá del grado de afección existente sobre los compartimentos testiculares. Ahora bien, en la mayoría de los casos los individuos afectados presentan fenotipo femenino e infantilismo sexual, este último, por lo general, constituye el motivo de la consulta y el estudio endocrinológico revela hipergonadotropismo y ausencia de esteroides gonadales (López y cols., 1998).

Con respecto a la disgenesia gonadal mixta (DGM) se define como aquella entidad en la que un individuo presenta una gónada de un lado (generalmente testículo) y contralateralmente se encuentra una estría gonadal, aunque en el lugar de ésta puede existir un tumor o también ausencia gonadal, pero siempre persisten las estructuras Müllerianas. En la mayoría de los casos se encuentra un mosaico en el complemento cromosómico (generalmente 45,X/46,XY). Aunque la presencia de un complemento cromosómico determinado no condiciona necesariamente la presencia de un mismo tipo de gónada. La deficiencia funcional, debida al desarrollo gonadal anormal, se expresa como una síntesis/actividad incompleta de la HIM, de la testosterona o ambas, con las consecuentes alteraciones tanto en los genitales internos como en los externos, observándose asimetría entre los mismos. La ambigüedad genital es extremadamente variable y los fenotipos ampliamente heterogéneos. En la gran mayoría de los casos, la posibilidad de DGM en el neonato se confirma por el grado de ambigüedad genital existente; sin embargo, en países en vías de desarrollo la atención médica es solicitada en la infancia tardía o incluso en la adolescencia, lo que condiciona el desarrollo de alteraciones psicológicas importantes que pueden ser prevenidas si se solicita la atención médica adecuada y se cuenta con un diagnóstico de certeza en los primeros meses de vida. Además de la ambigüedad genital, estos pacientes presentan estigmas Turnerianos; talla baja, cuello corto, cuello alado, implantación baja del cabello, hipertelorismo mamario, infantilismo genital, así como anomalías renales y cardiovasculares asociadas. Desde el punto de vista endocrinológico se observa hipergonadotropismo y por lo general hipogonadismo, aunque existen algunos casos en donde se observan concentraciones de testosterona dentro de los valores de referencia

normales y buena respuesta al estímulo con gonadotropina coriónica (Canto y Méndez, 1993).

GEN *DESERT HEDGEHOG* (*DHH*)

En la actualidad no se conocen los mecanismos precisos que condicionan a la DGP 46,XY, una explicación congruente sería la presencia de mutaciones en el gen *SRY*, pero al llevar a cabo los estudios de este gen se ha demostrado que solo aproximadamente del 10 al 15 % de los individuos con esta patología presentan mutaciones de dicho gen. Por lo que se ha propuesto que esta patología pudiese ser secundaria a mutaciones en genes autosómicos (Hanley y cols., 2003; Veitia y cols., 2002). Uno de estos genes candidato es *DHH*, ya que se ha demostrado que interviene en el desarrollo gonadal, constituyéndose como componente de una cascada génica responsable de la morfogénesis y la diferenciación sexual.

El gen *DHH* pertenece a la familia de proteínas de secreción hedgehog (Hh). Mientras que en *Drosophila melanogaster* se presentan una sola proteína Hh, en los mamíferos se encuentran tres: Sonic hedgehog (SHH), Indian hedgehog (IHH) y Desert hedgehog (DHH); siendo SHH la proteína más estudiada hasta la actualidad (Pierucci y col, 2001).

El gen *DHH* humano se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 12, en las bandas 12q12→q13.1 (números de acceso al banco de genes: AB010581; AB018401; AB010993; AB010994), está constituido por 3 exones y codifica para una proteína de 397 aminoácidos. Esta proteína es sintetizada como un proteína precursora, la cual está constituida por el péptido señal, el fragmento amino-terminal (N-terminal) y el fragmento carboxilo terminal (C-terminal). La proteína DHH completa pesa 43.58 kDa, posterior a la eliminación de su péptido señal y al proceso de

autoproteólisis, el fragmento N-terminal es de 19 kDa (conformado por los aminoácidos 23-198) y el fragmento C-terminal de 21.6 kDa (conformado por los aminoácidos 199-396) (Jeong y McMahon, 2002).

Los primeros estudios funcionales de la proteína Hh se realizaron en *D. melanogaster*, en los cuales observaron que Hh presentaba una secuencia consenso en el fragmento C-terminal, formado por 198 aminoácidos, en el cual se realiza la autoproteólisis y da lugar al fragmento N-terminal o proteína madura, esta última es la responsable de todas las funciones biológicas conocidas de las proteínas Hh (Lee y cols., 1994; Tate y cols., 2002). Se demostró que al eliminar diversas regiones del fragmento C-terminal de Hh se presenta pérdida o disminución de la actividad autoproteolítica, dependiendo de los aminoácidos eliminados (Lee y cols., 1994). Asimismo, se observó que la actividad de autoproteólisis de este fragmento influye en la localización celular del fragmento N-terminal, es decir de la proteína madura. Por otra parte, se ha postulado que la actividad de autoproteólisis de las proteínas Hh ocurre en los estadios tempranos de secreción, ya sea dentro del retículo endoplásmico rugoso o entrando al aparato de Golgi (Lewis y cols., 2002).

El proceso de autoproteólisis se lleva a cabo entre los aminoácidos 257 (glicina) y el 258 (cisteína) del C-terminal. Una de las primeras reacciones se da en el grupo tiol de la cisteína 258, llevando a cabo un ataque nucleofílico en el grupo carbonilo de la glicina 257 para reemplazar la unión del péptido con un enlace tioéster. Posteriormente, una molécula de colesterol se une al mismo carbono en el intermediario tioéster, el cual resulta en un enlace covalente del colesterol al fragmento N-terminal y la liberación del C-terminal (Jeong y McMahon, 2002).

Se ha postulado que la unión del colesterol en el fragmento N-terminal (N-Hh), permite que la proteína madura se dirija con mayor rapidez hacia la membrana plasmática, es decir que podría ser requerida para aumentar la capacidad de difusión de la proteína (figura 2). Es importante señalar que este mecanismo observado en la proteína Hh de *D. melanogaster* es el mismo que sucede en las proteínas Hh humanas, lo único que cambia es la posición de los aminoácidos glicina 198 y cisteína 199 (Jeong y McMahon, 2002).

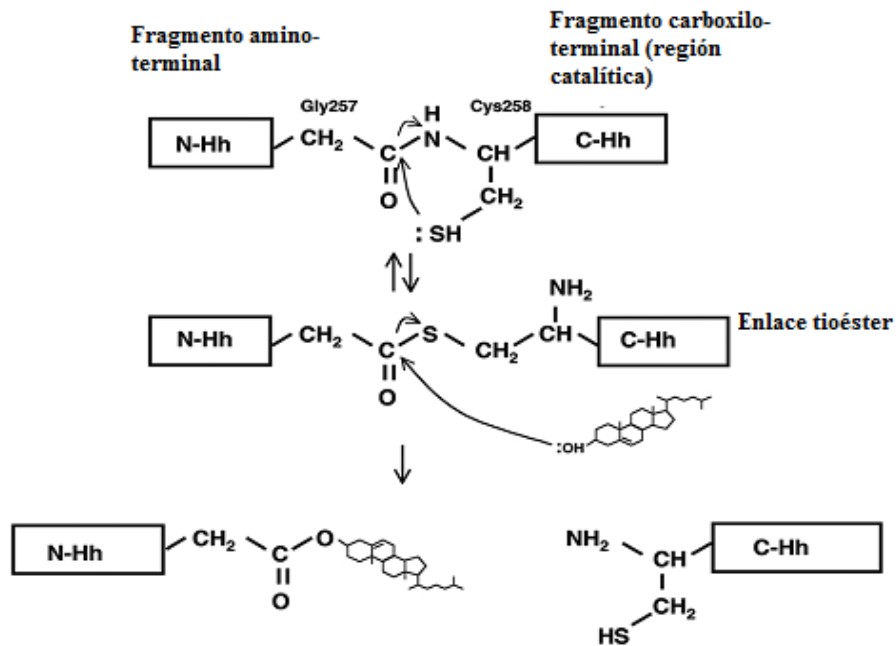


Figura 2. Mecanismo de procesamiento de la proteína Hh de *D. melanogaster*. La división se lleva a cabo entre la glicina 257 y la cisteína 258. (Jeong y McMahon, 2002)

Asimismo, la adición del colesterol también podría suceder en toda la familia de las proteínas Hh, ya que este proceso tienen un rol importante en la restricción espacial dentro de la célula donde actúan las Hh, debido a la propiedad del colesterol de

adherirse a las membranas celulares (Porter y cols., 2003). Sin embargo, se ha descrito que esta modificación por colesterol en el fragmento N-terminal de la proteína SHH no altera la afinidad de la proteína madura por su receptor (Porter y cols., 1998).

Los estudios funcionales del gen *Desert hedgehog* (*Dhh*, en *Mus musculus*) llevados a cabo en ratones, demostraron que su expresión sexual es dimórfica. Los transcritos de *Dhh* pueden ser detectados en el linaje de las células de Sertoli del macho, siguiendo de manera muy cercana la expresión del gen *Sry* en los testículos embrionarios (Bitgood y McMahon., 1995).

Asimismo, Bitgood y cols. (1996) generaron ratones deficientes (nulos) en este gen, observándose que los machos eran infértiles. Posteriormente, Clark y cols (2002) estudiaron las gónadas de ratones nulos para *Dhh*, observando que los ratones prepúberes, presentaban anormalidades peritubulares de los testículos, con ausencia de células de Leydig y acumulación de células semejantes a los fibroblastos en el intersticio, además de la presencia de abundante depósito de colágeno, la cual se observaba que se incrementaba con la edad; asimismo, más del 90% de estos animales se encontraban totalmente feminizados (pseudohermafroditas). Con estos resultados, los autores concluyeron que el gen *Dhh* es esencial para el desarrollo de las células peritubulares, para la diferenciación de las células de Leydig y para la espermatogénesis (Clark y col, 2002). Cabe mencionar que el gen, así como la proteína DHH humana presentan homología del 96.7% con respecto a la de ratón (Marigo y col 1998).

Paralelamente a los estudios antes descritos, se describió por primera vez en un individuo con DG 46, XY con polineuropatía, una mutación en el gen DHH, la cual se

presentó en el codón de inicio de la traducción y que codifica para la metionina (AUG). Los autores propusieron que la presencia de esta mutación en este individuo, condicionó la falta de diferenciación testicular ya que la proteína DHH no pudo ser traducida (ausencia total de proteína); Umehara y cols., 2002). Por otra parte, nuestro grupo de investigación, describió en tres pacientes con DGP completa 46,XY sin polineuropatía, dos mutaciones en el gen *DHH*, una en el exón 2 y otra en el exón 3 (observada en dos individuos con la misma patología (Canto y cols., 2004).

Con respecto a la mutación en el exón 2, ésta se encontró en la posición 485 de la secuencia de nucleótidos (c.C485T), el cual dio lugar al cambio del codón que codifica al aminoácido leucina (CTG) por el de prolina (CCG) en la posición 162 de la proteína (p.L162P). Este cambio se localizó en la región que codifica para el fragmento N-terminal de la proteína madura. Asimismo, al realizar el alineamiento de la proteína DHH de diversas especies, incluyendo al ratón, se observó que la mutación p.L162P, cambió un aminoácido altamente conservado (leucina) por otro no conservado (prolina), por lo que se propuso que dicha mutación podría afectar la unión de DHH a su receptor y de esa forma repercutir en su función (Canto y cols., 2004).

En relación a la mutación que se encontró en el exón 3 en dos sujetos con DGP 46, XY se determinó que se trataba de la eliminación de la guanina en la posición 1086 ($\Delta G1086$, p.L362del), generando el corrimiento del marco de lectura, debido a que en el cuarto codón corriente abajo de la mutación se genera un codón de paro (TAG), traducándose en una proteína truncada. Esta mutación se presentó en la región de la proteína que codifica para el fragmento C-terminal (Canto y cols., 2004).

Existen diversas evidencias que apoyan que el gen *Dhh*, en roedores, se encuentra involucrado en la diferenciación testicular. Se ha observado que los ratones nulos para *Dhh* muestran anomalías en el desarrollo de los testículos como son alteraciones en el desarrollo de las células mioideas, así como alteraciones en la disposición de la lámina basal de los cordones testiculares, lo cual conlleva a una desorganización de los cordones testiculares y como consecuencia, las células germinales (gonocitos) se localizan fuera de los cordones seminíferos. Por otra parte, en estos ratones se observa que las células germinales presenten alteraciones durante la espermatogénesis ya que no pueden alcanzar su estado de maduración (espermatozoides). Asimismo, se observan alteraciones en la diferenciación de las células de Leydig (Pierucci-Alves y cols., 2001; Hung-Chang y cols, 2002). Cabe recordar que el desarrollo y maduración de las células de Leydig son procesos que involucran la interacción entre hormonas y otros factores que se encuentran muy bien regulados (Caron y cols, 1997). Ya que durante el periodo gestacional del individuo, las células de Leydig secretan testosterona, la cual interviene en la formación de los genitales internos y externos del macho (Park y cols., 2007; Fowler y cols, 2008).

Con base en los estudios anteriores se ha postulado que uno de los roles más importantes de *Dhh*, en roedores machos, es el de regular la proliferación y expansión de las células de Leydig fetales de las gónadas. Debido a que este gen se expresa en las primeras etapas del desarrollo gonadal del humano y por las implicaciones éticas de estudiar gónadas embrionarias, en la actualidad existen pocos estudios en el humano, encaminados en la búsqueda de alteraciones moleculares de dicho gen (Canto y cols., 2004).

A la fecha los estudios funcionales, tanto del gen como de la proteína, son principalmente en Sonic hedgehog (Shh), los cuales han demostrado que mutaciones en un sitio específico para la región que codifica para el fragmento amino terminal, puede afectar dramáticamente la interacción de la proteína mutada con su receptor Patched 1 (PTCH1).

RECEPTOR PATCHED 2 (PTCH2)

La proteína madura DHH ejerce su función al unirse a su receptor Patched 2 (PTCH2) (isoforma de PTCH1) (Rahnama y cols., 2004). El gen *PTCH2* de humano consta de 22 exones (acceso al banco de genes: NM_003738.3) su transcrito es de 3,612 pb y la región que codifica para la proteína es de 1,204 aminoácidos con peso molecular de 131 kDa. Cabe mencionar que el gen *PTCH2* humano presenta una alta homología con el *Ptch2* de ratón, del 90% aproximadamente (Carpenter y cols., 2000).

El gen *PTCH2* humano que se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (1p33-34), codifica para una glicoproteína formada por 12 dominios transmembranales, un fragmento N-terminal, un fragmento C-terminal y dos asas extracelulares a las cuales se cree que se une la proteína N-DHH (figura 3). Se ha postulado que PTCH2 inhibe a otra proteína transmembranal llamada Smoothed (SMO), la cual media la señalización de las proteínas HH, Sonic, Indian y Desert (Rahnama y cols., 2004).

El receptor PTCH2 se expresa en el testículo: en las células de Leydig y en las células germinales, por lo que se ha propuesto que PTCH2 es el receptor endógeno de DHH (Humphrey y cols., 2002).

Por otra parte, en ausencia de su ligando (DHH) PTCH2 pudiera funcionar catalíticamente inhibiendo la vía de señalización corriente abajo de otros genes esenciales para la diferenciación sexual. Con base en lo anterior, se puede decir que PTCH2 funciona como transductor de la señal de DHH (Philip y cols., 2001).

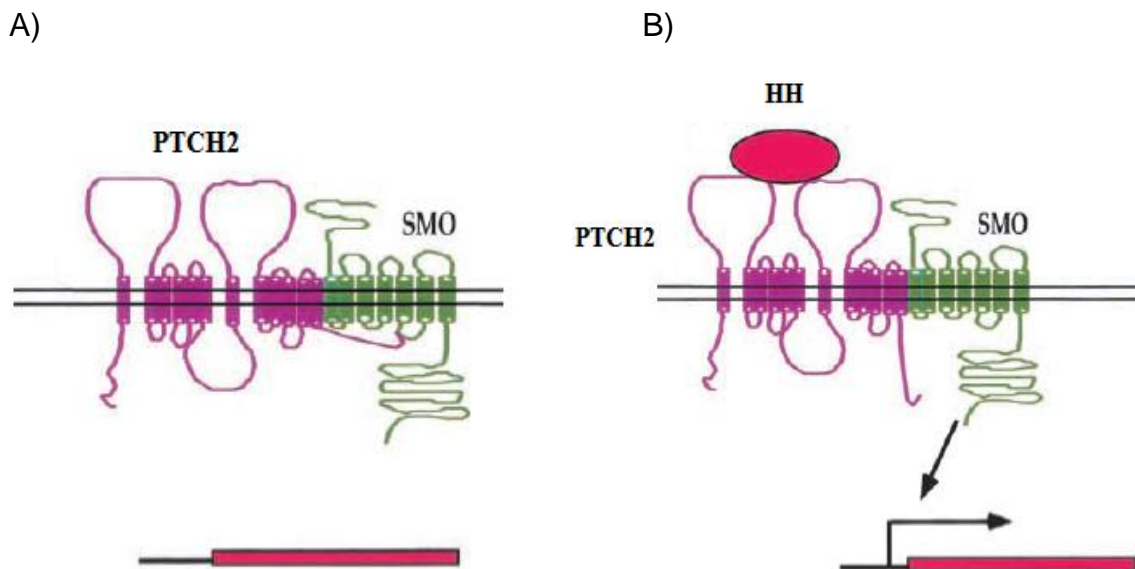


Figura 3. Representación de la ausencia de ligando (A) y presencia de ligando (B) interactuando (HH) con su receptor PTCH2. (Ingham y McMahon., 2007) HH representa a la proteína Hedgehod, en *Drosophila melanogaster*, PTCH2, es una proteína transmembranal, actúa como el receptor de HH, que está a su vez se cree que interactúa con otra proteína llamada Smoothened, SMO, y que esta ultima podría regular la vía de traducción de señales para la activación de otros genes (Modificado de Ingham y McMahon., 2007).

MUTACIONES EN SONIC DESERT HEDGEHOG (SHH)

En 1999, Williams y cols, llevaron a cabo estudios funcionales de la mutación en el aminoácido 24 de la proteína Shh, en roedores, en el cual se cambió una cisteína por una serina (p.C24S); estos autores observaron en los ensayos de unión, que esta proteína Shh mutada no interactuaba con su receptor. Con base en esas observaciones, los autores propusieron que este aminoácido es esencial para la función de la proteína Shh, así como tiene un rol importante en la modulación y regulación de la vía de señalización de esta proteína.

Por otra parte el grupo de investigación de Trainfort y cols. (2004), caracterizaron un modelo de la proteína Sonic hedgehog de humano (SHH), identificando diferentes tipos de mutaciones en el fragmento amino terminal así como el fragmento carboxilo terminal de la proteína, basándose en los pacientes que presentaban Síndrome de West (también llamada Holoprosencefalia), el cual se caracteriza por un largo espectro de malformaciones en el cerebro así como anomalías craneofaciales.

El estudio funcional se llevó a cabo midiendo la actividad de la fosfatasa alcalina (gen reportero), así como con densitometrías ópticas, realizadas a partir del Western blot tanto de la proteína SHH silvestre como de las proteínas SHH mutadas (Suji Pathi y col, 2001).

En la actualidad existen gran número de mutaciones descritas en el gen *SHH*, las cuales se han relacionado con el síndrome de West, la gran mayoría de ellas, se presentan en aminoácidos conservados en la secuencia de las otras proteínas de la misma familia (DHH e IHH) (Roessler y cols, 2009).

El primer grupo de mutaciones fue descrito por Trainffort y cols (2004), quienes concluyeron que las mutaciones localizadas en la región N-terminal de SHH de humano, pueden afectar la estabilidad estructural de la proteína madura. Las mutaciones descritas en SHH tanto en la región amino como carboxilo terminal se presentan en la tabla número 2.

Tabla 2. Mutaciones puntuales identificadas en Sonic hedgehog de humano (SHH). En fragmento amino y carboxilo terminal de la proteína (Trainffort y cols., 2004).

MUTANTES EN EL FRAGMENTO AMINO TERMINAL DE SHH (CAMBIO Y UBICACIÓN DEL AMINOÁCIDO EN LA PROTEÍNA)	MUTANTES EN EL FRAGMENTO CARBOXILO TERMINAL DE SHH (CAMBIO Y UBICACIÓN DEL AMINOÁCIDO EN LA PROTEÍNA)
<p>L17P P26L G31R D88V C102Y A110D A110T W117G W117R T150K S156R F170C D171H C183F S184L E188Q</p>	<p>196-200 (sí se cambia cualquier aminoácido de esta región no hay proteólisis de la proteína). L271P R310C R321S H329A V332A A346V P347R I354T S362L C363Y Y364C A373T H374R A376D F377S L382P</p>

Estos autores proponen, que las mutaciones localizadas en el fragmento amino terminal de humano, (SHH-N), podrían traducirse en proteínas inestables y susceptibles a una degradación de la misma en su estado maduro (después del proceso proteolítico), debido a cambios conformacionales que podrían presentar las proteínas mutadas. Esto puede estar relacionado a que ciertos aminoácidos estén formando iones de Zn^{2+} o puentes disulfuro, y que por siguiente la proteína puede perder su estabilidad tridimensional (Trainffort y cols., 2004).

Con base en los antecedentes observados en los estudios funcionales realizados en la proteína SHH con mutaciones puntuales, y que hasta el momento no se han realizado estudios funcionales de las mutaciones en el gen y la proteína DHH descritas en sujetos con alteraciones en la diferenciación gonadal, se propuso llevar a cabo los estudios funcionales de las proteínas DHH mutadas, previamente descritas, demostrando por vez primera que éstas afectan la expresión e identificación de la proteína DHH en comparación con la proteína DHH silvestre (Canto y cols., 2004; 2005).

JUSTIFICACIÓN

La diferenciación sexual constituye un paradigma de la embriogénesis debido a que mutaciones en los genes participantes en este proceso no son letales y pueden solo manifestarse como alteraciones en el fenotipo sexual. Debido a ello, el estudio molecular de pacientes con anomalías sexuales, es crucial en la identificación de genes implicados en la diferenciación sexual. La diferenciación gonadal se inicia por la presencia y acción del factor determinante testicular *SRY* (FDT). La identificación del gen *SRY* constituye solo un paso en este proceso y a pesar de las diversas evidencias en la literatura que apoyan que el gen *SRY* es el FDT, existen algunas alteraciones de la diferenciación sexual en las cuales se ha observado el desarrollo testicular en ausencia del *SRY*, como son los varones XX y hemafroditas verdaderos 46, XX (Grumbach y Conte., 1998).

Se ha propuesto la existencia de genes autosómicos y/o ligados al cromosoma X que intervienen en el desarrollo gonadal constituyéndose como componentes de una cascada génica responsable de los programas de morfogénesis y diferenciación gonadal (MacLaughlin y Donahoe., 2004). Estas observaciones han permitido sugerir una cascada de genes activos en las diferentes etapas del desarrollo sexual, que intervienen en múltiples niveles y que actúan de manera diferente en hombres y mujeres. Sin embargo, debido que las alteraciones en la diferenciación sexual no son frecuentes, es importante continuar la búsqueda de mutaciones en los diferentes genes que participan en este proceso, definir sus interacciones y establecer su jerarquía en la cascada que conduce a la diferenciación sexual (López y col., 1995).

Nuestro grupo de investigación ha contribuido, en los últimos años, en forma importante al conocimiento de los procesos normales y patológicos del dimorfismo sexual en el humano en diferentes patologías de la diferenciación sexual, así con la obtención de algunas respuestas nos permitirán aportar nuevos conocimientos en el área.

A pesar de los avances llevados a cabo en los últimos años en el área de la genética molecular de la diferenciación sexual, no se ha podido dilucidar con precisión las causas moleculares de la DGP 46, XY. Una explicación congruente es la presencia de mutaciones en el gen *SRY*; sin embargo, únicamente del 10 al 15% de estos sujetos presentan mutaciones en dicho gen. Se ha propuesto que esta patología pudiese ser secundaria a mutaciones en genes autosómicos, como en el caso del gen *DHH* que pudiera intervenir en la etiología de la DGP 46, XY. El grupo de investigación al que pertenezco llevó a cabo la búsqueda de mutaciones en el gen *DHH* en seis pacientes con diagnóstico de DGP 46, XY, encontrando que tres individuos presentaron mutaciones en *DHH*, una en la región que codifica para el fragmento N-terminal y la otra para el fragmento C-terminal.

Hasta el momento, en la literatura solo existen dos reportes más de mutaciones en *DHH* en individuos con DG 46, XY y uno en sujetos con DGM (Umehara y cols., 2002; Canto y cols., 2004 y 2005); sin embargo, no existen estudios funcionales que demuestren que dichas mutaciones están directamente involucradas en este síndrome.

El interés del trabajo es recrear diferentes mutaciones detectadas en pacientes con DGP en células o modelos animales, con la finalidad de descifrar parte de los mecanismos que conducen a estas patologías. Es por ello que hemos llevado a cabo estudios funcionales de los genes que codifican a las proteínas DHH silvestres y con las

mutaciones p.L162P y Δ G1086 (p.L362del), descritas por nuestro grupo de investigación, utilizando dos modelos celulares (reticulocitos y HEK 293) para su expresión, con lo que posteriormente se podrán asociar con la DGP 46, XY y otras patologías relacionadas con la diferenciación testicular.

Con este trabajo, se espera contribuir al conocimiento de la diferenciación sexual y sus alteraciones, que constituyen una parte esencial en el área de la salud reproductiva, la cual es considerada como prioritaria en la investigación nacional e institucional.

OBJETIVO GENERAL

- Expresar e identificar las proteínas DHH silvestres y mutantes (p.L162P y Δ G1086 (p.L362del) en diferentes sistemas *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Generar las construcciones moleculares de los genes *DHH* silvestre y mutantes (c.*C485T* y Δ *G1086*).
- Expresar y obtener las proteínas DHH silvestres y mutantes por medio de síntesis de transcripción/traducción.
- Expresar y obtener las proteínas, DHH silvestres y mutantes en la línea celular HEK 293 por transfección.
- Identificar las proteínas DHH silvestres y mutantes, de los diferentes modelos, por la técnica de Western blot.

MATERIAL Y MÉTODOS

Construcciones moleculares del gen *DHH*

El ADN complementario (ADNc) que codifica a la proteína DHH humana se adquirió de la compañía Origene (TrueClone Human Colection[®]; número de catálogo SC122903; Homo sapiens desert hedgehog homolog to Drosophila (*DHH*) as transfection-ready DNA) que codifica para la proteína de acuerdo a la secuencia reportada en el banco de genes de los Institutos Nacionales de Salud (NM_021044.2).

Trasformación de células componentes por choque térmico

El gen *DHH* fue clonado en el vector de expresión pCMV6-XL5 unidireccionalmente entre los sitios *Not I*, (corriente arriba) y *Not I* (corriente abajo). Se procedió a la transformación en células competentes *E. coli* DH5 α de la siguiente forma: en 10 tubos de 1.5 ml que contenían cada uno 100 μ l de células competentes (DH5 α), se adicionó a cada uno de 50 a 100 ng de la construcción pCMV6-XL5+*DHH* y se incubaron por 10 min en hielo con agitación suave cada 30 seg. Posteriormente, se colocaron los tubos en baño de agua a 42°C/45 seg (período crítico para el rendimiento de las reacciones), e inmediatamente se colocaron los tubos en hielo por 2 min. Se agregó 1 ml de medio SOC a cada tubo y se incubó por 90 minutos a 37°C con agitación a 350 rpm. Cuando finalizó la incubación, se transfirió el contenido a tubos nuevos para ser centrifugados por 5 min a 4,000 rpm. A continuación se retiró el sobrenadante y se dejó en cada tubo de 100 a 200 μ l, con lo que se resuspendió el sobrenadante.

Por último, se sembraron 100 µl de células competentes por cada caja Petri, que contenían cada una LB agar con 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37°C toda la noche (Sambrook y Russel, 2001).

Cabe mencionar que el vector donde fue clonado *DHH* contiene el gen de resistencia a la ampicilina y por lo tanto las clonas resistentes a dicho antibiótico fueron purificadas en nuevas placas de cultivo para eliminar a las no portadoras de los plásmidos (segunda siembra) en nuevas cajas Petri que contenían LB agar con 100 µg/ml de ampicilina (Sambrook y Russel, 2001).

Extracción de ADN plasmídico (purificación).

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el estuche comercial PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kit (Invitrogen™, U.S.A. California) siguiendo las indicaciones del fabricante. Con la finalidad de amplificar una colonia de las células transformadas, se procedió a colocar en un matraz 20 ml de medio LB con ampicilina (se utilizaron 4 matraces de 50 ml) y se dejó incubando a 37°C con agitación de 250 rpm por 16 horas. Posteriormente, el cultivo celular fue transferido a 4 tubos de 50 ml cada uno, se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min y al finalizar se procedió a retirar el sobrenadante dejando únicamente el botón. Después se adicionaron 4 ml del amortiguador R3 con amortiguador de resuspensión de RNAasa A, (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 y EDTA 10mM) hasta que se homogenizó el botón totalmente. El cultivo celular homogéneo se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml y se le adicionaron 4 ml del amortiguador de lisis L7 (NaOH 0.2 M y SDS al 1%), los tubos se mezclaron suavemente por inversión y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. A continuación, a cada tubo se le agregaron 4 ml del

amortiguador de precipitación N3 (acetato de potasio 3.1 M, pH 5.5) e inmediatamente se mezclaron por inversión hasta obtener una mezcla homogénea y se procedió a centrifugar los tubos a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Previo al procedimiento anterior y con la finalidad de equilibrar las columnas, se procedió a montar la columna por cada tubo, para la purificación del ADN plasmídico, adicionándole 10 ml del amortiguador de equilibrio EQ1 (acetato de sodio 0.1 M, NaCl 0.6 M, Triton® X-100 al 0.15%, pH 5.0).

Posteriormente, se cargo el sobrenadante en la columna ya equilibrada (una columna por cada tubo) y el contenido comenzó a drenar por gravedad a un tubo nuevo de 15 ml. Durante el transcurso de este paso, a cada columna se le agregaron 10 ml, dos veces el amortiguador de lavado W8 (acetato de sodio 0.1 M, NaCl 825 mM, pH 5.0) y al término de este procedimiento, se retiraron los tubos donde se drenó la solución y se cambió nuevamente a tubos nuevos, colocándolos por debajo de cada columna.

Con el fin de eluir el ADN, a cada columna se le agregaron 5 ml del amortiguador de elución E4 (Tris-HCl 00 mM, pH 8.5, NaCl 1.25 M), se procedió a recuperar el ADN en tubos de 15 ml, se agregaron 3.5 ml de isopropanol a cada tubo y se centrifugaron a 4°C durante 3 min a 15000 rpm. Una vez finalizada, se retiró el sobrenadante y se recuperó el botón de cada tubo. A continuación se resuspendió el precipitado en 3 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 15000 rpm por 5 minutos y nuevamente se retiró el sobrenadante de cada tubo y se procedió a secar el precipitado de cada uno de los tubos a temperatura ambiente por 20 minutos. Finalmente el ADN plasmídico se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 0.1 mM).

Cuantificación de la concentración, verificación de la integridad y secuenciación del ADN plasmídico

La cuantificación del ADN plasmídico se llevó a cabo por espectrofotometría (Aenor ND - 3300 Nanodrop ®) y la verificación de la integridad de los productos de cada reacción fueron analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % teñidos con bromuro de etídio al 0.002%, y visualizados en un fotodocumentador (Alphamager HP) de alta resolución.

La liberación del fragmento que contiene la secuencia del gen *DHH* contenido en el plásmido pCMV6-XL5 se llevó a cabo con 1 µl de la enzima de restricción Not I (10,000 unidades/ml), 2.5 µl del amortiguador para la enzima NEBuffer 3 (Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 10 mM, ditioneitol 1 mM, pH 7.9), 0.5 µl de albumina sérica bobina a 100 µg/ml (BSA) y 1µl de ADN plasmídico (1µg/µl). Las reacciones se incubaron a 37°C durante 16 a 20 horas. Posteriormente, para verificar la separación del gen *DHH* y el plásmido, los productos de cada reacción fueron nuevamente analizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % y teñidos con bromuro de etídio al 0.002%. En todos los casos, se incluyó un marcador de peso molecular, para corroborar el peso del inserto y del plásmido así como una muestra de ADN plasmídico sin enzimas de restricción (control).

Para verificar la secuencia del gen *DHH*, se llevó a cabo la secuenciación del mismo con el estuche comercial BigDye™, terminator cycle sequencing ready reaction (PE Biosystems, Foster City, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, así como las condiciones dadas por el mismo. Las reacciones fueron analizadas en un secuenciador automático ABI-PRISM 377®. Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a realizar su

análisis por BLAST y se comprobó que la identidad y la integridad de la secuencia que se obtuvo fue igual al gen *DHH* descrito en el banco de genes (número de acceso NM_021044.2), (Sambrook y Russel, 2001).

Mutagénesis sitio-dirigida

Posterior a la verificación de la secuencia del gen *DHH* se procedió a la mutagénesis sitio-dirigida por medio del diseño de oligonucleótidos que introdujeron las dos mutaciones presentes en el gen (c.C485T y Δ G1086). Se procedió a delimitar la región que rodea el sitio donde se dirigió cada mutación, se incluyeron de 10 a 15 bases de cada lado del sitio de las mutaciones y se determinó la temperatura de alineamiento (T_a) con la siguiente fórmula:

$T_a = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \% \text{ de bases no apareadas}$, donde N fue el tamaño total de oligonucleótidos.

Diseño de oligonucleótidos dúplex para la generación de las mutantes:

T485C: 5'CAAGTATGGGTTGCGGGCGCGCCTCG 3'

Δ G1086: 5'CCTTGAGACT*CTGCACGCGCTAGG 3' (* se elimino la guanina)

Una vez adquiridos los oligonucleótidos arriba señalados, se llevo a cabo la mutagénesis sitio dirigida de acuerdo a las instrucciones del proveedor, brevemente: se llevó a cabo la reacción con 50 ng del plásmido portador del gen *DHH*, 5 μ l del amortiguador 10X, 10 pmoles de cada oligonucleótido, 1 μ l de la mezcla de los cuatro dNTP, 1 μ l de ADN polimerasa *Pfu* turbo y ddH₂O para dar un volumen final de 50 μ l. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con las siguientes condiciones; un paso de desnaturalización, 1 ciclo, a 95°C/1min, 18 ciclos a 95°C/50seg; 60°C/50seg, 68°C/7min y una extensión final de

68°C/7min (1 ciclo). Después de la amplificación se adicionó 1 µl de la enzima de restricción *Not I* que corta específicamente el ADN que corresponde a la región que codifica para el gen *DHH* y se incubó por un período de 16 hrs. Posterior a la obtención de las construcciones moleculares mutantes se procedió a la cuantificación, verificación y secuenciación del ADN plasmídico por el mismo método mencionada anteriormente.

Modelo de síntesis de las proteínas DHH silvestres y mutantes (transcripción/traducción).

Con el fin de llevar a cabo el proceso de transcripción/traducción de las proteínas DHH silvestre y mutantes, p.L162P y ΔG1086 (p.L362del), se utilizó el estuche comercial TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega, Madison, WI, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante; brevemente: para cada reacción se colocó en un tubo de 1.5ml, 40µl del Quick Master Mix TNT®, 1 µl de metionina (1mM), 0.5 µg de ADN plasmidico (2.5 µl para cada construcción, silvestres y mutantes,(C485T y ΔG1086) y 6.5 µl de H₂O libre de nucleasas, para dar un volumen final de la reacción de 50 µl; todas las reacciones se realizaron a 4°C. Se utilizó como control la reacción con todos los reactivos mencionado anteriormente, excepto el ADN plasmídico. Posteriormente, todos los tubos que contenían cada construcción, así como sus controles, se incubaron a 30°C durante 90 min.

Identificación de las proteínas DHH (silvestres y mutantes) obtenidas en el modelo transcripción/traducción.

Una vez finalizado los procesos de transcripción y traducción de las proteínas DHH silvestre y mutantes, los productos de las reacciones se analizaron en 2 geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), uno al 12% correspondiente al gel de corrida y el otro al 5%, correspondiente al gel concentrador, ambos de 1.5 mm de grosor.

Cada gel de corrida fue elaborado con los siguientes reactivos: 4 ml de acrilamida/bis acrilamida (30%/8% peso/vol), 2.5 ml del amortiguador Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 100 µl de SDS (dodecil sulfato de sodio al 10% p/v), 5 µl de TEMED (N,N,N',N-tetrametiletilenediamina), 50 µl de persulfato de amonio (PSA) y 3.4 ml de ddH₂O para tener un volumen final de 10.5 ml. La parte concentradora de los geles se elaboró con los siguientes reactivos: 1.7 ml acrilamida/bis acrilamida (30%/8% p/v), 2.5 ml del amortiguador Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), 100 µl de SDS al 10% (p/v), 5 µl de TEMED, 50 µl de PSA y 5.7 ml de ddH₂O para tener un volumen final de 10.5 ml.

Con el fin de verificar la integridad de las proteínas, se analizó 1µg de proteína con 3 µl del amortiguador de carga de proteína (Tris-HCl 1.5M, pH 6.8, glicerol al 8%, SDS al 10%, azul de bromofenol al 0.05%, β-mercaptoetanol y dd-H₂O) para cada pozo. Previo a realizar la electroforesis, todas las muestras se calentaron a 90° C por 5 min, y subsecuentemente, se cargaron las muestras en los geles de poliacrilamida en cada pozo del gel, los cuales ya se encontraban dentro de la cámara de electroforesis con el amortiguador de corrida al 1X (3g de Tris-base, 1.44g de glicina y 1 L de dd-H₂O), se procedió a ajustar el voltaje a la cámara de electroforesis, quedando en 80 volts durante 120 min. Cabe mencionar que para la transferencia de los geles, con las proteínas hacia la

membrana de nitrocelulosa, se cargaron para cada reacción 30 µg de proteína disuelta en 7 µl del amortiguador de carga. El corrimiento electroforético se realizó a 80 volts durante 120 minutos.

Cultivo celular (HEK 293)

Se llevó a cabo el cultivo de la línea celular HEK 293, células de riñón de origen embrionario, de la siguiente forma: se realizó la siembra de células en medio DMEM suplementado (Dulbecco's Modified Eagle Medium), el cual contenía los siguientes compuestos: L-glutamina (4mM), piruvato de sodio (2mM), antibiótico-antimicótico al 1.25% y suero fetal bovino (SFB), al 10%. Las células se cultivaron en 5 botellas T- 50, las cuales fueron incubadas a 37°C con 5% de CO₂, durante 5 días con todas las condiciones óptimas que les permitió alcanzar una confluencia del 80% y de esa forma llevar a cabo la transfección de las construcciones moleculares.

Previo a la transfección y con la finalidad de preservar las células HEK 293, se procedió a realizar alícuotas de las mismas, brevemente: las células contenidas en las botellas T-50 fueron removidas con 2 ml de tripsina cada una, se incubaron por 3 minutos a 37°C y 5% de CO₂, y con el fin de inactivar a la tripsina se le adicionaron 5ml de medio DMEM suplementado, se homogenizaron las células con el medio y de cada botella se colectó una muestra y se transfirió a tubos de 15ml. Los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min, se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 ml de medio DMEM suplementado.

Para tener alícuotas disponibles para posteriores experimentos se procedió a congelarlas de la siguiente manera; se utilizaron tubos de 2.5ml y se distribuyeron 250 µl de células en 2 ml de medio de congelación, el cual contenía lo siguiente: medio DMEM suplementado,

glicerol al 10% p/v, suero fetal bovino (SFB) al 12.5% y solución de antibiótico/antimicótico al 1.25%, se mantuvieron en hielo por 30 min, después se congelaron a -20°C y al siguiente día se guardaron en nitrógeno líquido.

Conteo celular

La transfección se llevó a cabo con las células en las botellas; para ello, se procedió a contar y hacer una nueva resiembra de células en cajas Corning® (Corning, NY, USA) de 6 pozos. Se tomaron 15µl de células (botón) que se obtuvo después de la centrifugación y que habían sido resuspendidas en 4 ml de medio DMEM suplementado, se colocaron en la cámara de Neubauer, se cubrió con un cubre objetos y posteriormente se procedió al conteo celular de cada cuadrante de la cámara, empleando un microscopio de campo claro para el conteo. Para obtener el número y volumen correcto de células que debieron ser resembradas, se utilizó la siguiente fórmula:

Número de células por ml = El promedio del No. de células de cada cuadrante (4) X 10,000

Después de obtener el cálculo óptimo, se sembraron 3 cajas de cultivo por duplicado, de 6 pozos con 85,000 células cada uno a 37°C por 24 horas o 48 horas con CO₂ al 5%.

Transfección por el método de lipofectamina™2000 (Invitrogen™, U.S.A. California)

Cuando las cajas alcanzaron una confluencia del 80%, se procedió a la transfección de las construcciones (silvestre y mutantes) en la línea celular HEK 293, de la siguiente manera (stock): para cada pozo, en un tubo de 0.5ml se adicionaron 100 µl de medio DMEM (sin suplementar), 4 µl de lipofectamina™2000 y 1 µg de ADN (2 µl), la reacción se homogenizó suavemente y se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente en

condiciones de esterilidad. Para las reacciones que contenían los controles, no se les adicionó el ADN. Durante el periodo de incubación, a cada pozo de las cajas de cultivo se les retiró el medio DMEM suplementado con SFB al 10% y se les substituyó por 1 ml de medio DMEM sin suplementar con antibiótico- antimicótico al 1.25%. Posteriormente, a cada pozo se adicionó por goteo suave los 106 μ l del stock que se preparó, previamente por separado en tubos de 0.5 ml. Después de que se sembraron todos los pozos, las cajas se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% por 5 horas, siempre observando al microscopio que las células no presentaran alteraciones en su morfología ocasionadas por la lipofectamina. Después de este tiempo se le retiró el medio DMEM sin suplementar y se le adicionó 1 ml de medio DMEM suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico al 1.25%, se incubó a 37°C por 24 o 48 horas. Cumplidos los tiempos, se procedió a la extracción de las proteínas DHH silvestre y mutantes p.L162P y Δ G 1086 p.L362del). En total se sembraron 3 cajas en las cuales cada construcción (silvestres y 2 mutantes), se realizaron por duplicado y los experimentos en general se realizaron por triplicado.

Extracción de proteínas DHH silvestres y mutantes.

Para la extracción de las proteínas DHH silvestres y mutantes p.L1632P y Δ G1086 (p.L362del), se utilizó el estuche comercial “ProteoJET membrane protein extraction” (Fermentas[®]) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para cada caja de cultivo que contenían a las células HEK 293 (6 pozos) y una vez que alcanzaron la confluencia del 80-90% se procedió a remover el medio de cada pozo y se le adicionaron 400 μ l de la solución de lavado. Posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 200 μ l del amortiguador de permeabilización celular, se agitó la caja

suavemente y se dejó incubar por 10 min a 4°C. A continuación, a cada pozo se le adicionaron 300 µl del amortiguador de extracción de proteína de membrana y con el fin de remover las células de los pozos, se procedió a incubar la caja por 30 min a 4°C con agitación de 450 rpm. Enseguida las células se colectaron y transfirieron de cada pozo a tubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 16,000 rpm por 20 min a 4°C. Finalmente el sobrenadante de cada tubo (fracción de las proteínas de membrana) fue removido y transferido a tubos nuevos de 1.5ml, de estas muestras se hicieron pequeñas alícuotas para su uso inmediato y el resto de las alícuotas fue almacenado a -70°C.

Cuantificación de las proteínas DHH silvestres y mutantes, por el método de Bradford.

Las concentraciones que se utilizaron en la curva estándar, con albúmina de suero bovino (BSA), para cuantificar la concentración de proteínas fue: 0 µg, 0.75 µg, 1.5 µg, 2.25 µg, 3µg, 3.75 µg, 4.5 µg, 5.25 µg, 6 µg y 6.75 µg.

Una vez determinada la concentración de las proteínas, se procedió a utilizar dichas concentraciones de la curva estándar, sustituyendo a la BSA por la proteína de nuestros intereses (silvestres y mutantes).

Identificación de las proteínas DHH (silvestre y mutantes) en geles SDS-PAGE.

Para la identificación de las proteínas DHH silvestre y mutantes, p.L162P y ΔG1086 (p.L362del) expresadas en la línea celular HEK 293, se llevó a cabo el mismo método en el cual se utilizo para identificar las proteínas sintetizadas por traducción/transcripción (TNT®), con las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Transferencia de las proteínas a membrana de nitrocelulosa

Con el fin de identificar a las proteínas de nuestro interés en una mezcla compleja de moléculas, se procedió a transferir las proteínas obtenidas del gel (SDS-PAGE) a una membrana de nitrocelulosa para su análisis de la siguiente manera: se cortaron dos membranas de nitrocelulosa a la medida del gel de poliacrilamida que fue de aproximadamente de 7.5 por 5.5 cm y se utilizaron 8 papeles filtro (Watman No 3) del mismo tamaño, las membranas fueron colocadas en el amortiguador de transferencia 1X por 10 min (3.03 g de Tris-base, 14.4 g de glicina, 200 ml de metanol y 800 ml de dd-H₂O). Una vez finalizada la electroforesis, los geles se retiraron de la cámara y se colocaron en el siguiente orden; cassette, fibra, dos papeles filtro (Watman No 3), gel, membrana, dos papeles filtro y nuevamente una fibra, después de esto se cuidó que no se formaran burbujas en la membrana y se cerró el cassette para que fuera montado en la cámara de transferencia, llenando toda la cámara con el amortiguador de transferencia al 1X (transferencia en húmedo) y se procedió a realizar la electroforesis con un voltaje de 300 mA por 2.30 h a 4°C. Subsecuentemente, se desmontaron los dos cassettes y se retiró la membrana de nitrocelulosa de cada uno, para teñirla con rojo de Ponceau al 2% en ácido acético al 1% por 5 min, se enjuagaron con dd-H₂O para quitar el excedente de colorante y se dejaron secar a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada muestra de tres experimentos independientes.

Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa.

Una vez que se transfirieron las proteínas DHH silvestres y mutantes, p.L162P y ΔG1086 (p.L362del) en las membranas de nitrocelulosa, tanto las proteínas sintetizadas por transcripción-traducción (TNT[®]) así como la transfección de las construcciones en la línea

celular HEK 293, se procedió a bloquear cada una de las membranas de la siguiente manera: se utilizaron 20 ml de leche al 6 % con PBS-Tween20 al 1X (8g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.5g de Na₂HPO₄- 7H₂O, K₂HPO₄ y 1ml de Tween20) durante 3 hrs con agitación constante a temperatura ambiente, finalizado el tiempo de bloqueo, se procedió a lavar la membrana con PBS-Tween20, durante 15 min en agitación constante (se hicieron cuatro lavados), todo esto con la finalidad de eliminar el exceso de leche.

Incubación con los anticuerpos primario anti-DHH y secundario.

Una vez finalizado los cuatro lavados de cada membrana, se procedió a incubar el anticuerpo primario policlonal contra la proteína DHH (generado en cabra) y la concentración (1:100) se calculó con la siguiente fórmula:

Volumen de anticuerpo primario: Volumen total/concentración de la dilución

En un tubo de 15 ml se adicionaron 2.47.5 ml de leche al 6% con PBS-Tween20 y 25 µl de anticuerpo primario, se mezcló el tubo y se dejó a 4°C, se colocó la membrana en un contenedor y se le adicionaron 250 µl por cada carril de proteína transferida en la membrana de nitrocelulosa y se dejó incubar toda la noche en movimiento constante a 4°C. Posteriormente, se retiró la membrana del contenedor y se lavó con PBS-Tween20 por 15 minutos a temperatura ambiente y movimiento constante (se hicieron 4 lavados de 15 min), se procedió a incubar la membrana con el anticuerpo secundario, anti cabra (generado en ratón) a una concentración 1:5000, la cual se calculó con la misma fórmula del anticuerpo primario. La membrana se depositó en un contenedor en el cual contenía 2.499 µl de leche al 6% con PBS-Tween20 y 0.5 µl de anticuerpo secundario (anti cabra generado en ratón) y se homogenizó por agitación; después se puso en un contenedor y se adicionaron 250 µl de anticuerpo secundario y leche al 6% con PBS-T por carril de

proteína transferida a la membrana de nitrocelulosa y se dejó incubar por 1 h a temperatura ambiente con movimiento constante. Con el fin de quitar el excedente de anticuerpo secundario, se retiró la membrana del contenedor y se lavó con PBS-T por 15 min con movimiento constante (se hicieron 4 lavados de 15min), al término de los lavados se procedió a preparar cada una de las membranas de nitrocelulosa para su revelación con luminol. Para cada membrana, se colocó un cassette, una lámina de acetato, de 12 x 15 cm, la membrana de nitrocelulosa, 100 μ l de luminol por cada carril de proteína transferida en la membrana (50 μ l de solución A y 50 μ l de solución B), se selló la membrana con otra membrana de acetato, de las mismas dimensiones, y se procedió al revelado.

Para el sistema celular en HEK 293, se utilizó un anticuerpo primario de GAPDH, hecho en ratón, como control de expresión para dicha proteína, y un anticuerpo secundario hecho en cabra, anti ratón. Todo esto en las mismas condiciones ya mencionadas previamente.

Revelado en placas del Western blot de las proteínas (DHH silvestres y mutantes).

Este proceso de revelado de las placas se llevó a cabo en el cuarto oscuro. Previamente se cortaron varias placas de revelado con una dimensión igual a la membrana de nitrocelulosa (7.5 x 5.5 cm), las cuales se utilizaron a diferentes tiempos de exposición con el luminol; los tiempos de exposición que se manejaron fueron 3, 6 y 10 min. Cada una de las placas se colocaron sobre la lámina de acetato (la membrana de nitrocelulosa quedó en la parte media) y con el cassette cerrado. Una vez finalizado el tiempo de exposición de cada placa, se retiraron del cassette y la placa se sumergió en solución reveladora por 3 min en movimiento constante, se retiró el excedente de solución

reveladora con dd-H₂O e inmediatamente se sumergió en solución fijadora por 4 min; posteriormente, la placa se sumergió en dd-H₂O para retirar el excedente de solución fijadora y cada placa se dejó secar a temperatura ambiente. Para los diferentes tiempos que se manejaron de exposición con el luminol, el procedimiento fue semejante al descrito anteriormente.

Cuantificación de las proteínas DHH (silvestres y mutantes), obtenidas de los distintos modelos celulares, por densitometrías ópticas.

Sobre las bandas obtenidas en las placas se realizó el análisis densitométrico utilizando el software Scion Image[®]. El valor obtenido correspondió a un área debajo de la curva, proporcional a la intensidad de la banda y por lo tanto a la concentración de proteína en la muestra. La técnica nos permitió medir la cantidad de luz que absorbe la placa radiográfica para determinar cuantitativamente y cualitativamente la presencia de las proteínas DHH (silvestres y mutantes) sintetizadas en los diferentes modelos celulares. Finalmente, con los datos obtenidos se pudo calcular el valor exacto de las proteínas acorde al diseño experimental.

RESULTADOS

Construcciones moleculares

Con la finalidad de expresar e identificar las proteínas DHH silvestres y mutantes, p.L162P y Δ G1086 (p.L362del) en diferentes sistemas celulares, primero se realizó la obtención de las construcciones con la secuencia silvestre que codifica para DHH y posteriormente modificada por mutagénesis dirigida para la obtención de las formas mutantes. En la figura 4 se puede observar el análisis de restricción con la enzima *Not I* de la construcción molecular del gen *DHH*. Se muestra el inserto del gen *DHH*, el cual corresponde a un tamaño aproximado de 1.197 Kb que se suman a la longitud de *pCMV6-XL5* una vez que ha sido clonada, por lo que el vector linealizado se visualiza como una banda de aproximadamente 4.5Kb

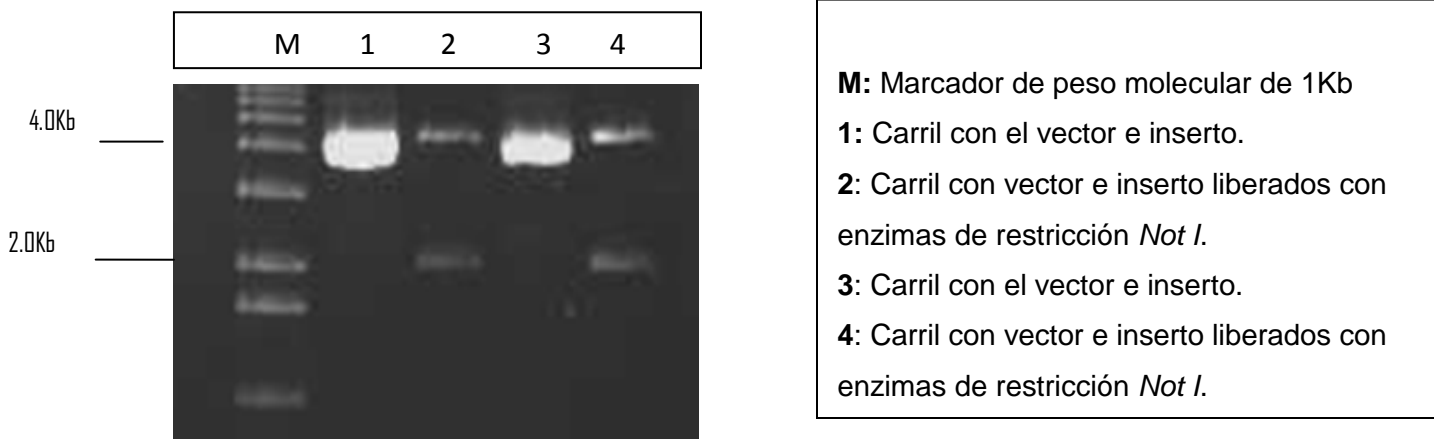
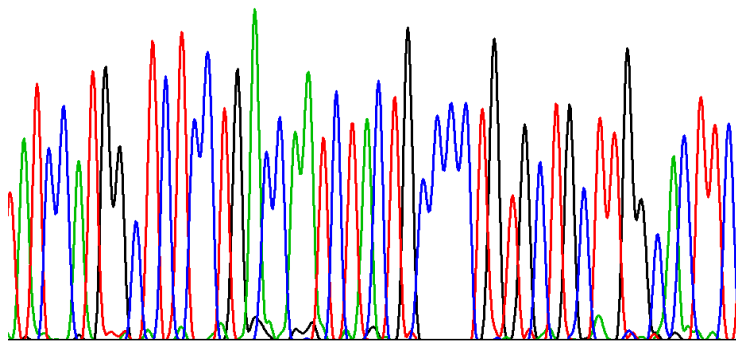


Figura 4. Gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio con el vector *pCMV6XL-5* y el gen *DHH*.

Posteriormente, se secuenció el fragmento de ADN clonado y se comparó contra la base de datos del NCBI, banco de genes, corroborando que la secuencia obtenida presenta 100% de homología a la reportada por Bitgood y cols., 1996, y cuyo número de acceso en el banco de genes es: NM_021044.2 (figura 5). La figura nos indica que se pudo obtener la lectura de los nucleótidos identificando el codón de inicio a partir donde se lleva a cabo la transcripción de este gen y que posteriormente dará lugar a la traducción de la proteína DHH. Cabe mencionar que la secuencia del gen completo de *DHH* fue analizada y verificada con el banco de genes.

) 450 460 470 480 490
 ATCCATGGCTCTCCAGACCAATCTACTGCCCTGTGCTGCTTGGCACATTC



- La línea en la figura señala el codón de inicio (ATG), antes del nucleótido 450 en la lectura de la secuencia.

Figura 5. Secuencia parcial del gen *DHH*. Observamos que nuestra secuencia es igual a aquella reportada en el banco de genes (número de acceso NM_021044.2).

Teniendo la certeza del la obtención del gen *DHH*, se procedió a llevar a cabo las construcciones moleculares mutantes en el sitio c.C485T y Δ G1086 (construcciones por separado) y para esto se utilizo en la PCR la *Taq* ADN polimerasa (*Pfu* Turbo), con la finalidad de obtener dichas mutaciones puntuales, ya que cabe recordar que la primera mutación (c.C485T) se localiza en el exón 2 del gen y la segunda (Δ G1086) se localiza en el exón 3 de dicho gen. La figura 6 muestra el resultado de la PCR de cada una de las

construcciones mutadas puntualmente, las cuales fueron incubadas con enzimas de restricción (*Not I*), para liberar los insertos y vectores correspondientes de cada construcción. La figura 6 muestra que tanto los insertos y los vectores se encuentran en el peso molecular esperado al ser liberados con la enzima.

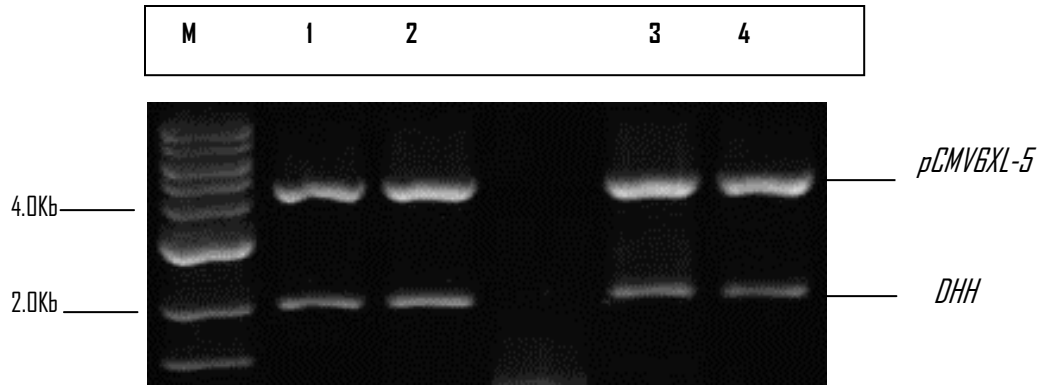


Figura 6. Análisis de las construcciones moleculares mutantes del gen *DHH* en gel de agarosa al 0.7%, teñida con bromuro de etidio

M: Marcador de peso molecular de 1Kb.

1 y 2: Construcciones moleculares del gen *DHH* mutante (**c.C485T**).

3 y 4: Construcciones moleculares del gen *DHH* mutante (**Δ G1086**).

Después de verificar la liberación de los insertos se continuó con la secuenciación de dichas construcciones moleculares con la finalidad de identificar las mutaciones puntuales. La figura 7 muestra la ubicación de la primera mutación en el exón 2 (**c.C485T**). La secuencia se pudo obtener con el oligonucleótido 5'-3' reverse. Hay que recordar que el codón de la secuencia silvestre que codifica para la leucina (CTG) se

localiza en la posición 485 de la secuencia. El cambio esperado fue verificado en la posición 485 con el codón que codifica para el aminoácido de la prolina (CCG), como lo muestra la figura 7.

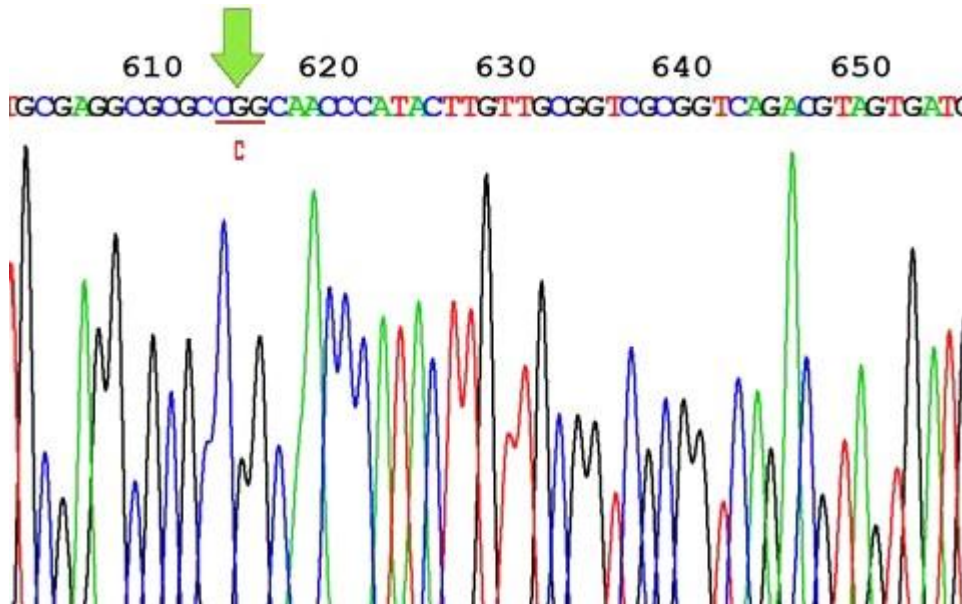


Figura 7. Secuencia parcial del gen *DHH*. La flecha indica la ubicación de la mutación puntual c.C485T (CCG).

Este mismo procedimiento se realizó para la mutante $\Delta G1086$, localizada en el exón 3 del gen *DHH*. La figura 8 muestra el resultado de la secuencia de la construcción mutada la cual se pudo obtener con el oligonucleótido 5'--3' forward. En esta figura se muestra la pérdida del nucleótido de guanina (G) en la secuencia de *DHH*, (entre la timina y citocina, flecha). Esta mutación hace que el marco de lectura de *DHH* se corra y se produzca un codón de paro tres codones después de la mutación puntual, eliminando aproximadamente 35 aminoácidos de la proteína original (*DHH* silvestre).

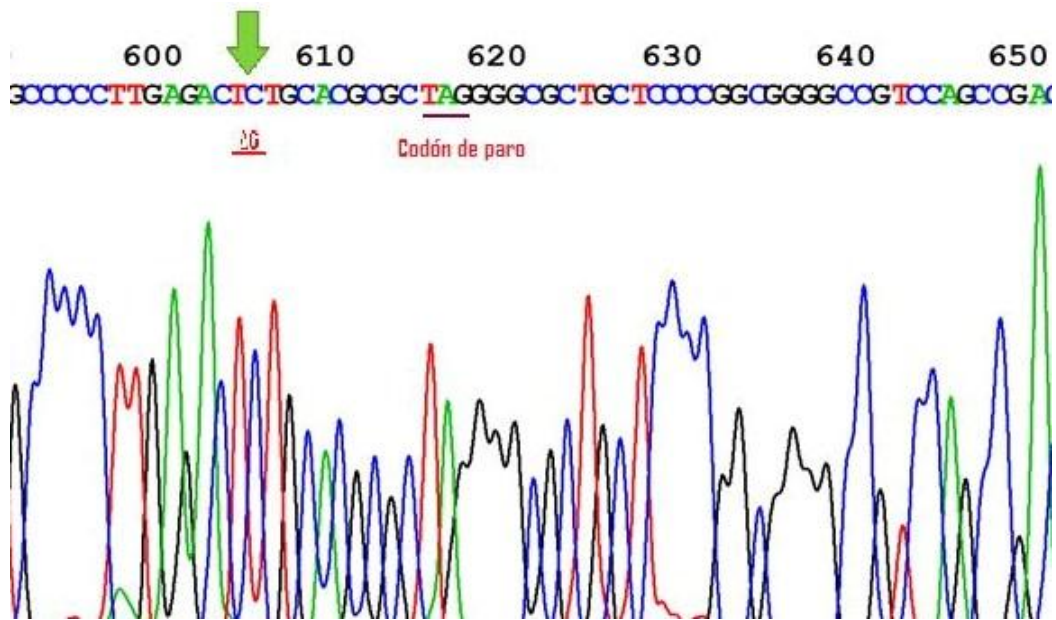


Figura 8. Secuencia parcial y localización de la mutación puntual $\Delta G1086$ del gen *DHH*. La flecha indica la eliminación de la guanina (G) en la secuencia del gen, correspondiente a su ubicación en el exón 3.

OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA MUTANTE p.L162P EN EL SISTEMA CELULAR TRADUCCIÓN/TRANSCRIPCIÓN.

Con la finalidad de obtener las proteínas DHH silvestre y mutantes por medio de síntesis en este sistema, utilizo al modelo de Traducción-Transcripción/TNT®. Se observan en la figura 9 los resultados de los geles de SDS-PAGE al 12%, en los cuales se encuentra la proteína DHH silvestre y mutante, p.L162P.

La figura muestra tres diferentes paneles (A, B y C) que corresponden a tres carriles, cada uno, con la misma cantidad de proteína cargada.

Se debe mencionar que no se observa el carril de la proteína mutante p.L362del ($\Delta G1086$) ya que no se obtuvo señal como se menciona más adelante. Cada gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para su posterior identificación de cada proteína por medio de Western blot.

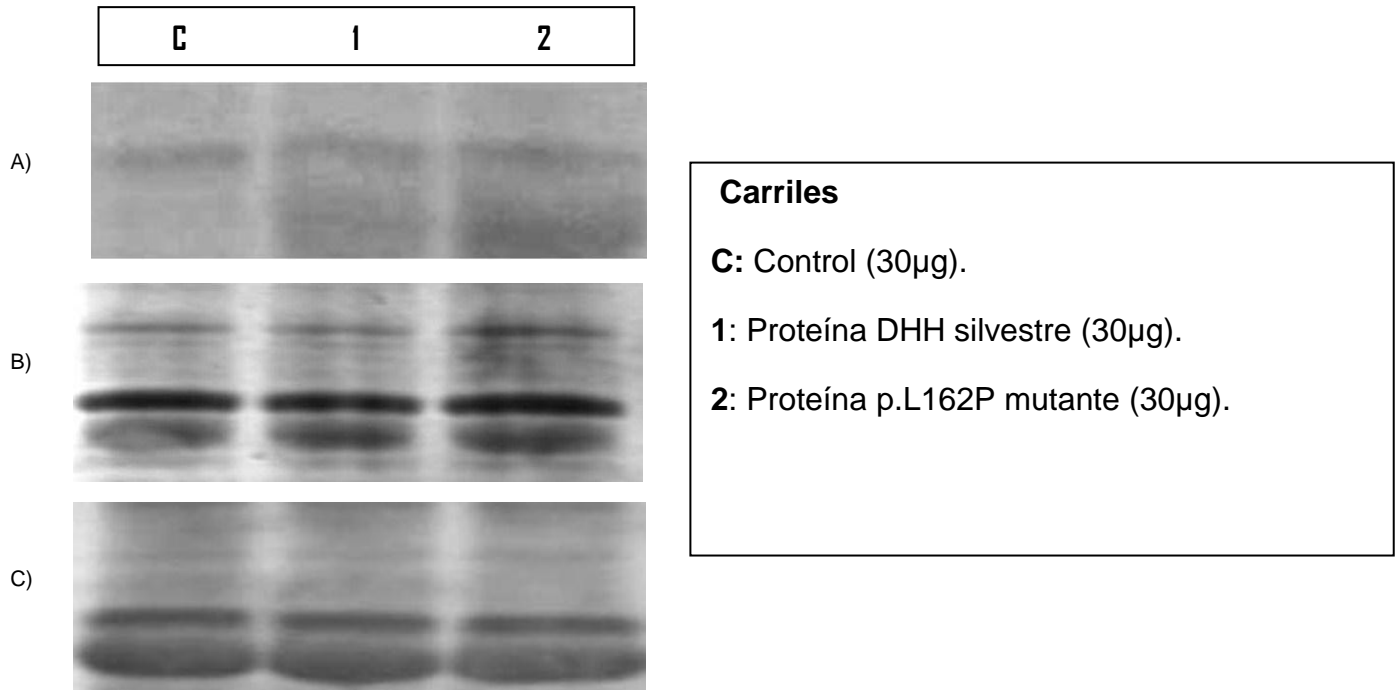


Figura 9. Identificación, en geles de SDS-PAGE, de la proteína DHH silvestre y mutante p.L162P, teñidos con azul de Coomassie.

IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MUTANTE p.L162P, (SISTEMA TRANSCRIPCIÓN/TRADUCCIÓN), POR LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT

La figura 10 muestra el revelado en placas de la señal de las proteínas, correspondientes a cada uno de los paneles anteriores (A, B y C), figura 9.

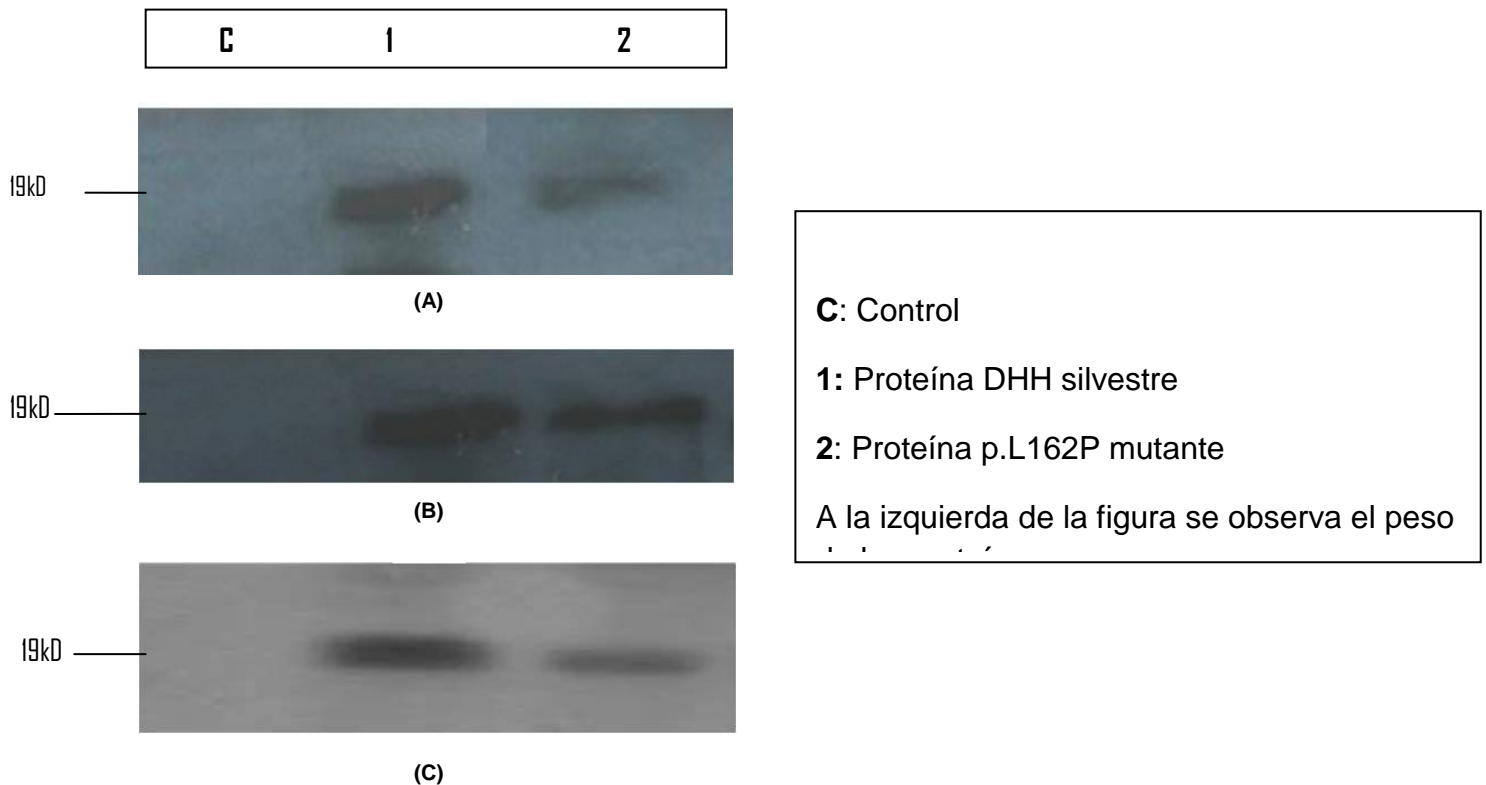


Figura 10. Identificación de proteína DHH silvestre y mutante p.L162P por la técnica de Western blot.

En el caso de la construcción con la mutación p.L162P (localizada en la región amino terminal de DHH correspondiente a la proteína madura) sometida al sistema de transcripción-traducción, observamos que hay una menor intensidad en la banda de la proteína mutante en comparación con la proteína DHH silvestre (dichos resultados se observaron en forma consistente en tres experimentos independientes) (figura 10).

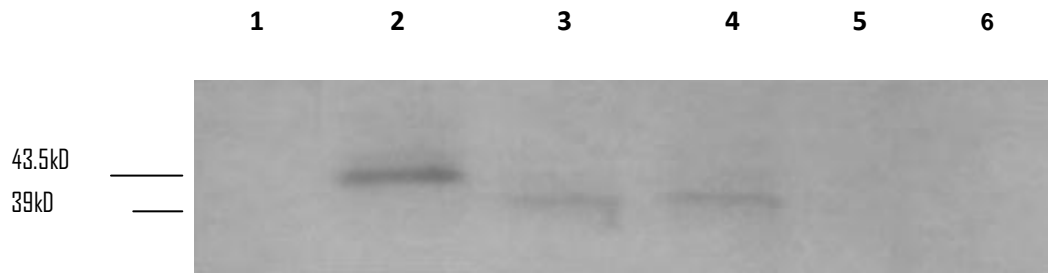
Lo anterior se corroboró con las mediciones realizadas con las densitometrías, las cuales nos permitieron demostrar que el promedio de la expresión de las proteínas mutantes (p.L162P) es 28% menor que la proteína silvestre, para este modelo.

Con respecto a estos mismos resultados obtenidos, para este modelo, (transcripción-traducción), la proteína DHH silvestre no presento en ninguno de nuestros extractos niveles de expresión de la proteína DHH en su forma completa (sin proteólisis), la cual corresponde a un peso en masa de 43.5 kDa, ya que sólo pudimos obtener la señal de la proteína DHH en su forma madura (proteólisis), que corresponde al fragmento amino terminal (19.6 kDa). Con respecto a la mutación p.L362del ($\Delta G1086$) localizada en el fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH, no se observó señal de banda correspondiente al peso molecular de dicho fragmento de 21.6 kDa en masa, con proteólisis, y por consiguiente tampoco del peso completo de 43.5 kDa, sin proteólisis, como se menciona anteriormente, (estos resultados se observaron en todos los experimentos independientes).

IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MUTANTE $\Delta G1086$ (p.L362del) EN HEK293, POR LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT.

Cubriendo otro de los objetivos del proyecto de investigación, se pudo identificar a la proteína DHH silvestres y mutantes $\Delta G1086$ (p.L362del), utilizando la línea celular HEK 293 como modelo celular. La figura 11 muestra la identificación de la proteína DHH silvestre y mutante p.L362del (panel A).

A)



B)



Figura 11. Identificación de la proteína DHH silvestre y mutantes $\Delta G1086$ (p.L362del), por medio de la técnica de Western blot.

Panel A

1: Carril del control positivo.

2: Proteína DHH silvestre (WT)

3 y 4: Proteínas mutantes p.L362del ($\Delta G1086$) que se ubican en el fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH.

5 y 6: Proteína mutante p.L162P (C485T) que se ubica en el fragmento amino terminal de la proteína DHH (sin señal)

Panel B

Controles correspondientes a cada carril con GAPDH.

A la izquierda de la figura 11 se presenta el marcador de peso molecular. Se observa que en el carril 2 se obtiene una señal intensa que corresponde a la proteína DHH silvestre, con un peso de 43.5kD. En los carriles 3 y 4 se puede observar una señal muy tenue, que corresponde a la de la proteína DHH mutante $\Delta G1086$ (p.L362del), ambos carriles.

Se puede ver que el peso de estas proteínas se localiza a los 39kD. En los carriles 5 y 6, que corresponde a la proteína DHH mutante (p.L162P) no se identifico señal alguna para este sistema.

En el panel B, de la figura 11, se muestra la identificación de la proteína GAPDH que se utilizo como control de normalización de nuestro experimento y que se pudo identificar en un peso de 37kD. Estos resultados se repitieron en por lo menos tres diferentes experimentos, para este modelo celular, figura 12.

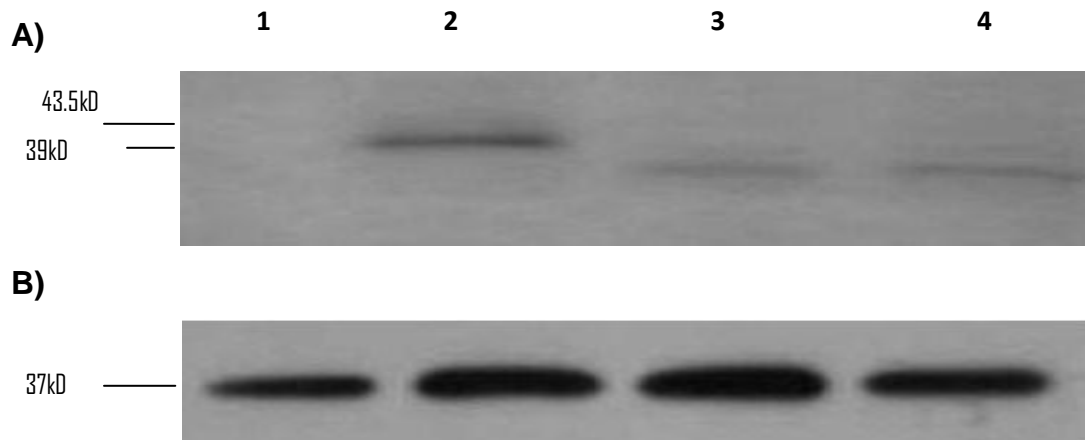


Figura 12. Identificación de la proteína DHH silvestre y mutante (p.L362del). Proteínas extraídas de la línea celular HEK-293.

Panel A)

1: Control positivo

2: Proteína DHH Silvestre (WT).

3 y 4: Proteína mutante p.L362del (Δ G1086) que se ubica en el fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH.

Obsérvese que los resultados se conservan en los diferentes experimentos.

Panel B)

Controles correspondientes a cada carril con GAPDH.


```

sp|O43323|DHH_HUMAN  VLASCYAVLESHQWAHRAFAPLRLHALGALLP----- 371
sp|Q15465|SHH_HUMAN  VLASCYAVIEEHSWAHRAFAPFRLAHALLAALAPARTDRGGDSGGGDRGGGGGRVALTAP 418
*****.*.******.* ** * * .

sp|O43323|DHH_HUMAN  GGAVQP-----TGMHWYSRLLYRLAEELG----- 396
sp|Q15465|SHH_HUMAN  GAADAPGAGATAGIHWYSQLLYQIGTWLLDSEALHPLGMAVKSS 462

```

Figura 13. Alineamiento de las proteínas DHH y SHH. Las franjas azules indican el sitio de las mutaciones puntuales en DHH p. L162P y Δ G1086 (p.L362del). Los aminoácidos homólogos se encuentran en color rojo. Los aminoácidos que se encuentran en negritas son los que han sido estudiados y asociados con mutaciones en Sonic hedgehog (SHH).

DENSITOMETRÍAS: ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Una vez obtenido los resultados con la técnica de Western blot, tanto de las proteínas DHH silvestres como de las mutantes p.L162P y Δ G1086 (p.L362del) para ambos sistemas, se procedió al análisis semicuantitativo por medio de la realización del análisis densitométrico, todo esto con la finalidad de analizar de forma más detallada nuestros resultados.

La tabla 2, 3 y 4 presenta los resultados del análisis densitométrico de los Western blot (figura 10, panel A, B y C) de las proteínas DHH silvestre y mutante (p.L162P) que se localiza en el fragmento carboxilo-terminal. En este modelo se pudo observar que existe una disminución en la expresión de la proteína mutante p. L162P, con respecto a la proteína DHH silvestre el cual se conserva en los diferentes experimentos.

MODELO TRANSCRIPCIÓN/TRADUCCIÓN

Tabla 2. Densitometría 1 para las proteínas DHH silvestre y mutante p.L162P

Densidad	1/intensidad mm²	Porcentaje de proteína
Control: 131579.0	7.6X10 ⁻⁶	100 % WT
p.L162P: 188983.1	5.3X10 ⁻⁶	67% p.L162P

En la tabla 2 se puede observar que existe una disminución de la expresión relativa de la proteína mutante p.L162P hasta un **33%**, con respecto a la proteína DHH silvestre (WT).

Tabla 3. Densitometría 2 para las proteínas DHH silvestre y mutante p.L162P

Densidad	1/intensidad mm²	Porcentaje de proteína
Control: 113766	8.8X10 ⁻⁶	100 % WT
p.L162P: 145688.3	6.8X10 ⁻⁶	77% p.L162P

En la tabla 3 se puede observar que existe una disminución de la expresión relativa de la proteína mutante p.L162P hasta un **23%** con respecto a la proteína DHH silvestre (WT).

Tabla 4. Densitometría 3 para las proteínas DHH silvestre y mutante p.L162P

Densidad	1/intensidad mm²	Porcentaje de proteína
Control: 138585.1	7.2X10 ⁻⁶	100 % WT
p.L162P: 192114	5.2X10 ⁻⁶	72% p.L162P

En la tabla 4 se puede observar que existe una disminución de la expresión relativa de la proteína mutante p.L162P hasta un **28%**, con respecto a la proteína silvestre DHH (WT).

DESITOMETRÍAS DE LAS PROTEÍNAS DHH (MODELO HEK 293).

Para el modelo de la línea celular HEK 293, también se procedió al análisis semicuantitativo por medio de la realización del análisis densitométrico. Se analizó a la proteína DHH silvestre y mutante $\Delta G1086$ (p.L362del), que se localiza en el fragmento carboxilo-terminal. Al analizar las proteínas de nuestro interés, para su expresión en la línea celular HEK 293, se puede observar diferencias significativas, en cuanto a la señal de los Western blots y que se conservan en todos los experimentos independientes (en al menos tres experimentos realizados en forma independiente). Esta característica de la señal se observa muy disminuida, de la proteína mutante $\Delta G1086$ (p.L362del), con respecto a la proteína silvestre de DHH, como ya se menciono anteriormente (Tabla 5 y 6).

Tabla 5. Densitometría 1 para las proteínas DHH silvestre y mutantes $\Delta G1086$ (p.L362del).

Densidad	1/intensidad mm ²	Porcentaje de proteína
Control: 121379	8.23X10 ⁻⁶	100 % WT
MUT 1($\Delta G1086$): 190013	5.26X10 ⁻⁶	63% (p.L362del)
MUT 2($\Delta G1086$): 189913	5.27X10 ⁻⁶	64% (p.L362del)

Se puede observar en la tabla que hay una disminución de la expresión de la proteína MUT1 $\Delta G1086$ (p.L362del), hasta de un **37%** menor con respecto a la proteína DHH silvestre (control).

En la siguiente mutante se sigue conservando el mismo resultado en cuanto a la expresión de la proteína MUT2 (p.L362del), hasta de un **36%** menor con respecto a la silvestre (control).

Tabla 6. Densitometría 2 para las proteínas DHH silvestre y mutantes Δ G1086 (p.L362del).

Densidad	1/intensidad mm²	Porcentaje de proteína
Control: 119966	8.33×10^{-6}	100 % WT
MUT 1(ΔG1086): 169977	5.88×10^{-6}	70% (p.L362del)
MUT 2(ΔG1086): 175655	5.69×10^{-6}	68% (p.L362del)

En la tabla 6 los resultados siguen indicando que existe una disminución de la expresión de las proteínas mutantes MUT1y MUT2 Δ G1086 (p.L362del).de hasta un **30%** y **32%**, respectivamente, menor en comparación con la proteína DHH silvestre (control).

DISCUSIÓN

La presente tesis llevo a cabo la expresión e identificación del las proteínas DHH silvestres y mutantes, p.L162P y, Δ G1086 (p.L362del) en diferentes modelos celulares, las cuales están relacionadas con la DGP 46, XY.

Se sabe que la diferenciación sexual, en mamíferos, es un proceso aún no altamente dilucidado, que involucra una cascada de eventos, iniciada por la presencia del factor determinante testicular (gen *SRY*) y que no todas las alteraciones en la diferenciación sexual pueden ser atribuidas a dicho gen, es por eso que se ha propuesto la existencia de algunos genes autosómicos que están ligados al desarrollo gonadal expresándose en diferentes tiempos de la vida del individuo. Uno de estos genes, autosómicos es Desert Hedgehog (DHH), en el cual se han identificado mutaciones puntuales del gen y que están relacionadas con la DGP 46, XY. (Canto y cols., 2004).

En nuestro trabajo, el poder haber obtenido las construcciones moleculares satisfactoriamente del gen *DHH* (silvestres y mutantes) nos permitió continuar con la síntesis de las proteínas en los diferentes modelos celulares, los cuales mostraron algunas semejanzas y diferencias en los resultados. Quizá con esto, estemos aportando parte de una posible explicación a dicha patología en el individuo.

MODELO TRANSCRIPCIÓN/TRADUCCIÓN (WESTERN BLOTS)

Los resultados en la identificación de la proteína DHH silvestre y mutante (p.L162P) se observó dos características muy similares en cada uno de ellos, la primera; es de que ambas proteínas (silvestre y mutante) se visualizan en una banda de 19kDa, la cual corresponde a la proteína DHH en su forma madura, esto se refiere que la proteína, en este sistema, sufrió proteólisis. La segunda característica; es que las proteínas silvestres se encuentran en mayor expresión con respecto a las proteínas mutantes p.L162P, ya que es evidente que la señal de las proteínas mutantes difiere considerablemente de las proteínas silvestres en las diferentes repeticiones, misma que corroboran con las densitometrías

Una de las posibles explicaciones para nuestros resultados, en este modelo, es que probablemente la proteína mutante p.L162P podría presentar un cambio conformacional en su estructura terciaria y por consecuencia el anticuerpo primario, que reconoce al fragmento amino terminal, tiene dificultad para reconocer dicho sitio de unión, algo que probablemente no sucede con la proteína silvestre. Se sabe que las proteínas llevan a cabo en su estructura, torsiones y pliegues por segmentos cortos de aminoácidos (entre 15-20 aminoácidos), entre las que se forman las α -hélices y hojas- β (laminas β). Dichas estructuras interaccionan, unas con otras, con la finalidad de estabilizar a todos los complejos (hélices y laminas) que puedan existir a lo largo de toda la proteína (Stryer., 1993). Existen diferentes tipos de aminoácidos que favorecen la formación de las hélices- α , como por ejemplo: residuos de glutamato, metionina, alanina y leucina (Stryer., 1993). Con todo esto y de acuerdo con el modelo tridimensional de Trainffort y col, (2004), de la proteína SHH, existe la posibilidad de que el aminoácido de leucina, de nuestra mutante p.L162P, se encuentre formando parte de una α -hélice de la

proteína DHH y por consiguiente al sufrir este cambio conformacional se esté degradando en forma más rápida (figura 10, panel A, B y C), debido a la inestabilidad en su estructura química de la proteína, algo similar a lo reportado por Trainffort y cols, (2004), en una mutación semejante en la proteína SHH de humano.

Con respecto a la mutación que se localiza en el fragmento carboxilo terminal p.L362del, ($\Delta G1086$), no se detectó señal alguna, por la técnica de Western blot, a pesar de que estos experimentos se repitieron tres veces en forma independiente. Debe quedar claro; que el hecho de no detectar señal de la mutante p.L362del, ($\Delta G1086$), no quiere decir quizá no se exprese, quizá la cantidad de proteína para este modelo es mínima y por consecuencia el anticuerpo no pudo detectarla a la hora del revelado de la placa. Esto pudiera ser que la eliminación de aminoácidos que conforman el fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH (a cualquier nivel), afectan la identificación de la proteína, por lo menos para este modelo celular.

Otra posible explicación es que se haya degradado la proteína antes de poder sido detectada, por consecuencia de la mutación, resultados muy similares como los que obtuvo Lee y cols., (1994) al utilizar un modelo *in vitro* muy similar al nuestro y al identificar las proteínas en los Western blots.

MODELO HEK 293 (WESTERN BLOT)

Es evidente que los resultados muestran que en este sistema, (línea celular HEK-293), no se pudo identificar la proteína DHH mutante p.L162P, que se ubica en el fragmento amino-terminal de la proteína, una de las posibles razones pueden ser las mismas sugerencias, ya comentadas anteriormente en el modelo de transcripción/traducción. Lo que es interesante de este modelo celular, es de que las proteínas DHH silvestre y mutante p.L362del ($\Delta G1086$) no fueron identificadas en su estado proteolítico, ya que se ubican en un peso de 43.5kD y 39kD, respectivamente.

Es importante remarcar que la mutante p.L362del ($\Delta G1086$) presenta un peso molecular menor (39 kDa) con respecto al DHH silvestre (43.5 kDa), esto debido a la pérdida de un nucleótido (guanina) en la secuencia del ADN y por consiguiente se da un cambio del marco de lectura, eliminando un aminoácido de leucina, dando como consecuencia, tres codones después de la mutación, un codón de paro (adelantado), resultando en la pérdida de 35 aminoácidos en la secuencia del fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH, esto nos da una diferencia de casi 4 kDa menor en el peso de la proteína DHH mutante, con respecto a la silvestre.

Si observamos las figuras 11 y 12 (diferentes experimentos) podemos ver que se conserva un patrón en la señal de la proteína mutante $\Delta G1086$ en el fragmento carboxilo terminal, ya que se presenta una señal disminuida con respecto a la proteína DHH silvestre. En forma importante este resultado se ve respaldado por los valores obtenidos en la densitometrías (tablas 5 y 6) en las que encontramos un promedio de la expresión de las proteínas mutantes $\Delta G1086$ (p.L362del) que es de 66.25% con respecto a las proteínas silvestres de un 100% (menor expresión de las mutantes).

Con estos resultados, para este modelo de HEK 293, no podemos afirmar que esta mutación afecta directamente la proteólisis, ya que no pudimos identificar la proteína DHH en su estado maduro (proteólisis), y porque la mutación no se encuentra en la secuencia consenso de este proceso (cinco primeros aminoácidos del fragmento carboxilo terminal), pero si podemos sugerir que la mutación si afecta su expresión (figura 11 y 12) e incluso pudiera existir la posibilidad que la mutación podría estar afectando la función de autoproteólisis de la proteína DHH, algo similar a lo descrito por Lee y cols, (1994) en la proteínas Hh de la *Drosophila melanogaster*. Estos autores observaron que cuando realizaban eliminaciones de diferente número de aminoácidos del fragmento carboxilo terminal de la proteína Hh, observaron que aunque solo eliminaran los últimos 9 aminoácidos de este fragmento, la eficiencia de la proteólisis se observaba disminuida en comparación a la proteína Hh silvestre.

Asimismo, Trainffort y cols, (2004), llevaron a cabo el estudio funcional de la mutación p.L271P localizada en el fragmento carboxilo terminal de la proteína SHH, en humano; éstos autores propusieron que quizá la proteína mutante, podría ser muy inestable y por lo tanto, susceptible a una degradación antes de la maduración de la proteína (proteólisis), esto en el mismo modelo celular que el nuestro (HEK 293).

Con base en lo anterior, podríamos proponer que la eliminación de un nucleótido ($\Delta G1086$) al dar lugar a la introducción de un codón de paro y por lo tanto de una proteína truncada, podría reducir la eficiencia del proceso de proteólisis de la proteína DHH, por lo observado en los blots así como en las densitometrías de las proteínas DHH, silvestres y mutantes (tablas 5 y 6).

DENSITOMETRÍAS PARA AMBOS MODELOS CELULARES (TRANSCRIPCIÓN/TRADUCCIÓN Y HEK 293)

En las tablas 2, 3 y 4 de nuestros resultados se corrobora lo dicho con anterioridad para la cuantificación de la proteína DHH silvestre y mutante (p.L162P). Las densitometrías muestran una clara disminución de la proteína mutante, que van desde un 33%, 28% y 23%, con respecto a las proteínas silvestres. Por otro lado las tablas 5 y 6 presenta un patrón muy similar, a las anteriores densitometrías, ya que también hay una disminución de la expresión de las proteínas mutantes p.L362del ($\Delta G1086$), que se localiza en el fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH, y que van de un 37%, 32% y 30% menor a las proteínas silvestres.

A pesar de los diferentes resultados en la identificación de las proteínas (silvestres y mutantes) en ambos modelos, los resultados cualitativos y cuantitativos (densitometrías) nos indican que ambas proteínas mutantes, p.L162P y $\Delta G1086$ (p.L362del) tuvieron problemas para ser identificadas. Esto nos lleva a un solo punto de convergencia de ambos resultados.

Como ya se había mencionado con anterioridad existen ciertos aminoácidos conservados en las proteínas que regulan sus estructuras secundarias de las proteínas y que son importantes para que la molécula tenga una estructura conformacional que le dé una funcionalidad (actividad biológica) de acuerdo a su naturaleza biológica. Entre estos aminoácidos se encuentra el aminoácido de leucina. Es claro que para la mutante que se localiza en el fragmento amino terminal de la proteína DHH cambia su aminoácido de leucina por una prolina y para la segunda mutante que se localiza en el fragmento carboxilo terminal de la proteína DHH al eliminar el nucleótido de guanina,

elimina un aminoácido de leucina (CUG), ya que se corre el marco de lectura en la secuencia.

Modificando así todos los aminoácidos que se conservaban en la proteína DHH silvestre del fragmento carboxilo terminal. Con todo esto podemos sugerir que probablemente dichos aminoácidos de leucina, que son conservados en diferentes especies, estén involucrados en la regulación y formación de las estructuras secundarias (α -hélices y lamina β), basándonos en el modelo tridimensional de la proteína SHH propuesto por Trainfort y cols, (2004). Ya que según este modelo, existe la posibilidad de que nuestra mutante p.L162P podría estar involucrada en la formación de una α -hélice y la mutante p.L362del ($\Delta G1086$) podría estar involucrada en la formación de una lamina β , las cuales estarían dando una estabilidad a toda la proteína. Con todo lo anterior, podemos determinar, que estas mutaciones puntuales, en ambos modelos, si podrían estar afectando significativamente la actividad biológica de la proteína DHH a un nivel de expresión e identificación.

Con respecto a los diferentes resultados obtenidos con los dos modelos utilizados para llevar a cabo la expresión de las proteínas mutadas, podríamos sugerir que debido a que en el modelo de transcripción-traducción sólo cuenta con pocos elementos para que se lleve a cabo dicho proceso, para muestras proteínas DHH silvestre y mutadas, por otra parte el modelo de la línea celular HEK-293 probablemente sea un mejor modelo para llevar a cabo este tipo de estudios ya que no se encuentra tan limitado, debido a que cuenta con lo necesario para llevar a cabo todos los procesos requeridos para la expresión de la proteína.

CONCLUSIONES

Por primera vez se realizan estudios funcionales tanto de la proteína DHH silvestre así como de dos proteínas DHH con mutaciones puntuales que se habían descrito previamente en dos patologías conocidas con disgenesia gonadal pura 46,XY y disgenesia gonadal mixta.

En el modelo de transcripción-traducción sólo se identificó a la proteína DHH silvestre y mutante (p.L162P) en su forma madura (proteólisis) con una menor diferencia de señal de la mutante con respecto a la proteína silvestre.

En el modelo celular con HEK-293, solo se identificó a la proteína DHH silvestre y a la mutante Δ G1086 (p.L362del) en un estado inmaduro (sin proteólisis), con un peso menor y una disminución de señal de la mutante con respecto a la proteína silvestre.

Con base en nuestros resultados podemos inferir que la mutación p.L162P localizada en la región amino terminal y la mutación Δ G1086 (p.L362del) localizada en el fragmento carboxilo terminal, podrían afectar la función y la estructura tridimensional de la proteína DHH y posiblemente estarían participando en la génesis de estas patologías involucradas en la diferenciación sexual.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas N, Toublanc J, Boucekkine C. A possible common origin of "Y-negative" human XX males and XX true hermaphrodites. *Hum Genet* 1990; 84:356-360.
2. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2447-2454.
3. Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 1999; 22:125-126.
4. Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, Jameson JL. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1829-1833.
5. Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185:17-25.
6. Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard JB. The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech Dev* 1993; 40:85-97.
7. Arn P, Chen H, Tuck-Muller CM, Mankinen C, Wachtel G, Li S, Shen CC, Wachtel SS. SRVX, a sex reversing locus in Xp21.2-->p22.11. *Hum Genet* 1994; 93:389-393.
8. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994; 7:497-501.
9. Barraclough CA, Wise PM. The role of catecholamines in the regulation of the pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 1982; 3:91-119.
10. Behringer RR, Cate RL, Froelick GJ, Palmiter RD, Brinster RL. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing mullerian inhibiting substance. *Nature* 1990; 345:167-170.
11. Bergland RM, Page RB. Can the pituitary secrete directly to the brain? (affirmative anatomical evidence). *Endocrinology* 1978; 102:1325-1338.

12. Berkovitz GD, Fechner PY, Zacur HW, Rock JA, Snyder HM, Migeon CJ, Perlman EJ. Clinical and pathologic spectrum of 46,XY gonadal dysgenesis: its relevance to the understanding of sex differentiation. *Medicine* 1991; 70:375-383.
13. Bernstein R, Pinto MR, Almeida M, Solarsh SM, Meck J, Jenkins T. X;Y translocation in an adolescent mentally normal phenotypic male with features of hypogonadism. *J Med Genet* 1980; 17:437-443.
14. Birk OS, Casiano DE, Wassif CA, Cogliati T, Zhao L, Zhao Y, Grinberg A, Huang S, Kreidberg JA, Parker KL, Porter FD, Westphal H. The LIM homeobox gene *Lhx9* is essential for mouse gonad formation. *Nature* 2000; 403:909-913.
15. Bishop CE, Whitworth DJ, Qin Y, Agoulnik AI, Agoulnik IU, Harrison WR, Behringer RR, Overbeek PA. A transgenic insertion upstream of *Sox9* is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat Genet* 2000; 26:490-494.
16. Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 1995; 172:126-138.
17. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. Sertoli cell signalling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 1996; 6:298-304.
18. Bland ML, Fowkes RC, Ingraham HA. Differential requirement for steroidogenic factor-1 gene dosage in adrenal development versus endocrine function. *Mol Endocrinol* 2004; 18:941-952.
19. Bruening W, Pelletier J. A non-AUG translational initiation event generates novel WT1 isoforms. *J Biol Chem* 1996; 271:8646-8654.
20. Cadigan K, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11:3286-3305.
21. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 1990;60:509-520
22. Canto P, Méndez JP. Estados intersexuales. En: Ahued J, y cols. Editores. *Ginecología y Obstetricia Aplicadas*. México: El Manual Moderno; 2003, p.713-714.

23. Canto P, Söderlund D, Reyes E, Méndez JP. Mutations in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with 46,XY complete pure gonadal dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4480-4483.
24. Canto P Vilchis F, Söderlund D, Reyes E, Méndez JP. A heterozygous mutation in the Desert hedgehog (DHH) gene in patients with mixed gonadal dysgenesis. *Molecular Human Reproduction*. Vol 11, Nov, 2005: 89: 4480-4483.
25. Capel, B. The battle of the sexes. *Mech. Dev.*, 92:89-103, 2000.
26. Caron KM, Soo SC, Wetsel WC, Stocco DM, Clark BJ, Parker KL: Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 11540–11545.
27. Carlson M. Bruce. (2005). *human embryology and developmental biology*. Third Ed. Mosby, Inc. Elsevier España.
28. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, Sauvage FJ. Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 95:13630-13634
29. Clark AM, Garland KK, Russell LD. *Desert hedgehog (Dhh)* gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biol Reprod* 2000; 63:1825-838.
30. Cohen, Michael .M, Jr. The hedgehog signal network. *American Journal of Medical Genetics* 2003: 123A: 5-28.
31. Conn PM. GnRH regulation of gonadotropin release and target cell responsiveness. En: de Groot L J, y cols.,s. editores. *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 1989. p 284.
32. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, Mendonca BB. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:1767-1772.

33. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003; 33:463-465.
34. Ellinger-Ziegelbauer H, Glaser B, Dreyer C. A naturally occurring short variant of the FTZ-F1-related nuclear orphan receptor xFF1rA and interactions between domains of xFF1rA. *Mol Endocrinol* 1995; 9:872-886.
35. Foster J, Dominguez-Steglich M, Guioli S, Kwok Ch, Weller P, Stevanovic M, Weissenbach J, Mansour S, Young I, Goodfellow P, Brook J, Schafer A. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 1994; 372:525-530.
36. Fowler PA, Cassie S, Rhind SM, Brewer MJ, Collinson JM, Lea RG, Baker PJ, Bhattacharya S, O'Shaughnessy PJ: Maternal smoking during pregnancy specifically reduces human fetal desert hedgehog gene expression during testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 619–626.
37. García-Rubí E, Vazquez-Alemán D, Méndez JP, Salinas JL, Garza-Flores J, Ponce de León S, Pérez-Palacios G, Ulloa-Aguirre A. The effects of opioid blockade and GnRH administration upon luteinizing hormone secretion in patients with anorexia nervosa during the stages of weight loss and weight recovery. *Clin Endocrinol* 1992;37:520-528.
38. Gharib SD, Wierman ME, Badger TM, Chin WW. Sex steroid hormone regulation of follicle-stimulating hormone subunit messenger ribonucleic acid (mRNA) levels in rat. *J Clin Invest* 1987; 80:294-299.
39. Goodfellow P, Darling S. Genetics of sex determination in man and mouse. *Development* 1988; 102:251-258.
40. Griffin J, Wilson J. Disorders of sexual differentiation. In: Walsh P, editor. *Campbell's Urology*. Philadelphia: Saunders; 1995. p. 1819-1832.
41. Grimmond S, Van Hateren N, Siggers P, Arkell R, Larder R, Soares MB, de Fatima Bonaldo M, Smith L, Tymowska-Lalanne Z, Wells C, Greenfield A. Sexually dimorphic expression of protease nexin-1 and vanin-1 in the developing mouse gonad prior to overt differentiation suggests a role in mammalian sexual development. *Hum Mol Genet* 2000; 9:1553-1560.

42. Groth C, Lardelli M. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *Int J Dev Biol* 2002; 46:393-400.
43. Grumbach M, Conte F. Disorders of sex differentiation. In: Wilson J, Foster D, editors. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 1998. p. 1303-1425.
44. Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:9618-9622.
45. Hacker A, Capel B, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* 1995; 121:1603-1614.
46. Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 2001; 106:319-329.
47. Hanley NA, Ball SG, Clement-Jones M, Hagan DM, Strachan T, Lindsay S, Robson S, Ostrer H, Parker KL, Wilson DI. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. *Mech Dev* 1999; 87:175-180.
48. Hanley NA, Hagan DM, Clement-Jones M, Ball SG, Strachan T, Salas-Cortes L, McElreavey K, Lindsay S, Robson S, Bullen P, Ostrer H, Wilson DI. SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 2000; 91:403-407.
49. Harley VR, Clarkson MJ, Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9]. *Endocr Rev* 2003; 24:466-487.
50. Hashimoto N, Kubokawa R, Yamazaki K, Noguchi M, Kato Y. Germ cell deficiency causes testis cord differentiation in reconstituted mouse fetal ovaries. *J Exp Zool* 1990; 253:61-70.
51. Hebert JM, Lin M, Partanen J, Rossant J, McConnell SK. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* 2003; 130:1101-1111.
52. Herzer U, Crocols, I A, Barton D, Howells N, Englert C. The Wilms tumor suppressor gene *Wt1* is required for development of the spleen. *Curr Biol* 1999; 9:837-840.

53. Holter E, Kotaja N, Makela S, Strauss L, Kietz S, Janne OA, Gustafsson JA, Palvimo JJ, Treuter E. Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol Endocrinol* 2002; 16:515-528.
54. Hossain A, Saunders GF. The human sex-determining gene SRY is a direct target of WT1. *J Biol Chem* 2001; 276:16817-16823.
55. Huang B, Wang S, Ning Y, Lamb AN, Bartley J. Autosomal XX sex reversal caused by duplication of SOX9. *Am J Med Genet* 1999; 87:349-353.
56. Humphrey Hung-Chang Yao, Wendy Whoriskey, and Blanche Capel. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes & Development*, 2002 16:1433–1440
57. Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL. Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 1993; 7:852-860.
58. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 1995; 9:478-486.
59. Ikeda Y, Shen WH, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol Endocrinol* 1994; 8:654-662.
60. Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1261-1272.
61. Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi KI. Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. *Dev Dyn* 2001; 220:363-376.
62. Imperato-McGinley J, Gautier T. Male pseudohermaphroditism due to inherited 5 α - reductase deficiency in man. In: Martinez-Mora, editor. *Intersexual Status: disorders of sex differentiation*. Barcelona: Doyma; 1994. p. 231.
63. Ingham Philip W. and McMahon. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Gene & Development* 2007: 15: 3059-3087.

64. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 1997; 17:1476-1483.
65. Jarrah N, El-Shanti H, Khier A, Nouri-Obeidat F, Haddidi A, Ajlouni K. Familial disorder of sex determination in seven individuals from three related sibships. *Eur J Pediatr* 2000; 159:912-918.
66. Jeays-Ward K, Hoyle Ch, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endotelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in the developing mammalian gonad. *Development*. 2003; 130:3663-3670.
67. Jeffs B, Meeks JJ, Ito M, Martinson FA, Matzuk MM, Jameson JL, Russell LD. Blockage of the rete testis and efferent ductules by ectopic Sertoli and Leydig cells causes infertility in Dax1-deficient male mice. *Endocrinology* 2001; 142:4486-4495.
68. Johnson DE, Williams LT. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 1993; 60:1-41.
69. Jeong Juhee and Andrew P. MacMahon. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *The Journal of Clinical Investigation*. 2002,110: 591-596.
70. Jordan BJ, Shen JH-C, Olaso R, Ingraham HA, Vilain E. Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/ β -catenin synergy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:10866-10871.
71. Jordan B, Mohammed M, Ching S, Délot E, Chen X-N, Dewing P, Swain A, Rao N, Elejalde R, Vilain E. Up-regulated of Wnt-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 2001; 68:1102-1109.
72. Jorgez CJ, Klysik M, Jamin SP, Behringer RR, Matzuk MM. Granulosa cell-specific inactivation of follistatin causes female fertility defects. *Mol Endocrinol* 2004; 18:953-967.
73. Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. Studies on sex differentiation in mammals. *Rec Progr Horm Res* 1983; 29:1-41.
74. Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P. A male specific role of SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 1996; 122:2813-2822.
75. Kikuchi H, Takata A, Akasaka Y, Fukuzawa R, Yoneyama H, Kurosawa Y, Honda M, Kamiyama Y, Hata J. Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet* 1998; 35:45-48.

76. Kofman-Alfaro S, Méndez JP, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G. Estudios clínicos, citogenéticos endocrinológicos e histológicos en hermafroditas verdaderos. *Rev Invest Clin* 1992; 44:229-234.
77. Kofman-Alfaro S, Merchant-Larios H, Pérez-Palacios G. Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev Invest Clin* 1990; 34:349-359.
78. Kofman-Alfaro S, Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Angeles A, Schiavon R, Pérez-Palacios G. Studies on gonadal dysgenesis: variable expressivity of the XY testicular dysgenesis syndrome. *Eur J Obstets Gynecols., Reprod Biol* 1999; 32:265-274.
79. Kohler B, Pienkowski C, Audran F, Delsol M, Tauber M, Paris F, Sultan C, Lumbroso S. An N-terminal WT1 mutation (P181S) in an XY patient with ambiguous genitalia, normal testosterone production, absence of kidney disease and associated heart defect: enlarging the phenotypic spectrum of WT1 defects. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:825-830.
80. Koopman P. The genetics and biology of vertebrate sex determination. *Cell* 2001; 105:843-847.
81. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 1993; 74:679-691.
82. Krummen LA, Woodruff TK, DeGuzman G, Cox ET, Baly DL, Mann E, Garg S, Wong WL, Cossum P, Mather JP. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluids. *Endocrinology* 1993; 132:431-443.
83. Kuhnle U, Schwarz H, Löhrs U. Familial true hermaphroditism: paternal and maternal transmission of the hermaphroditism (46, XX) and XX maleness in the absence of Y-chromosomal sequence. *Hum Genet* 1993; 92:571-576.
84. Lalli E, Bardoni B, Zazopoulos E, Wurtz JM, Strom TM, Moras D, Sassone-Corsi P. A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. *Mol Endocrinol* 1997; 11:1950-1960.
85. Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Rassoulzadegan M, Ross A, Cuzin F, van Heyningen V, Hastie ND. Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 1995; 81:391-401.

86. Lee John J, Stephen C. Ekker, Doris P. von Kessler, Jeffery A. Porter, Benjamin I. Sun, Philip A. Beachy. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 1994; 266: 1528-1537.
87. Lee PL, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT. Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor. *Science*. 1989; 245:57-60.
88. Lewis PM, Dunn MP, McMahon JA, Logan M, Martin JF, St-Jacques B, McMahon AP. Cholesterol modification of Sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* 2002;105:599-612.
89. López M, Zenteno JC, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. Heterogeneidad genética y variabilidad fenotípica en la reversión sexual 46,XY. *Rev Invest Clin* 1998;50:171-176
90. López M, Torres L, Méndez JP, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet* 1995; 55:356-358.
91. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; 77:481-490.
92. MacLaughlin DT, Donahoe PK. Sex determination and differentiation. *N Engl J Med* 2004; 350:367-378.
93. Mader S, Kumar V, de Verneuil H, Chambon P. Three amino acids of the oestrogen receptor are essential to its ability to distinguish an oestrogen from a glucocorticoid-responsive element. *Nature* 1989; 338:271-274.
94. Mallet D, Bretones P, Michel-Calemard L, Dijoud F, David M, Morel Y. Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 haploinsufficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:4829-4832.
95. Marigo V, Roberts DJ, Lee SMK, Tsukarov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE, Jenkins NA, Seidman JG, McMahon AP, Tabin C. The cloning, expression and chromosomal location of DHH, SHH and IHH: two human homologues of the *Drosophila* segment polarity gene Hedgehog. *Genomics* 1998; 28:44-51.

96. Marshall JC, Kelch RP. Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med* 1986; 315:1459-1468.
97. Mason AJ, Berkemeir LM, Schmelzer CH, Schwall RH. Activin B: precursor sequence, genomic structure and "in vitro" activities. *Mol Endocrinol* 1989; 3:1352-1358.
98. Matsuo H, Baba Y, Nair RMV, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:1334-1339.
99. Matsuzawa-Watanabe Y, Inoue J, Semba K. Transcriptional activity of testis-determining factor SRY is modulated by the Wilms' tumor 1 gene product, WT1. *Oncogene* 2003; 22:7900-7904.
100. McKay D. Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rev* 1983; 117:201-206.
101. McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 1984; 38:7-23.
102. Meeks JJ, Crawford SE, Russell TA, Morohashi K, Weiss J, Jameson JL. Dax1 regulates testis cord organization during gonadal differentiation. *Development* 2003; 130:1029-1036.
103. Merchant-Larios H. Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Van Blerkom J, Motta P, editores. *Ultrastructure of Reproduction*. Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers; 1984. p. 19.
104. Mertin S, McDowall SG, Harley VR. The DNA-binding specificity of SOX9 and other SOX proteins. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:1359-1364.
105. Michael T. Lewis and Jacqueline M. Veltmaat. *Next Stop, the Twilight Zone: Hedgehog Network Regulation of Mammary Gland Development*. Plenum Publishing Corporation 2004: 1083-3021/04/0400-0165/0.
106. Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1244-1247.
107. Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S. Defects of urogenital development in mice lacking *Emx2*. *Development* 1997; 124:1653-1664.

108. Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 100:81-86.
109. Morais da Silva S, Hacker A, Harley V, Goodfellow P, Swain A, Lovell-Badge R. Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat Genet* 1996; 14:62-68.
110. Norgren RB, Lehman MN. Neurons that migrate from the olfactory epithelium in the chick express luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 1991; 128:1676-1678.
111. Oba K, Yanase T, Nomura M, Morohashi K, Takayanagi R, Nawata H. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226:261-267.
112. Ogata T, Hawkins JR, Taylor A, Matsuo N, Hata J, Goodfellow PN. Sex reversal in a child with a 46,X,Yp+ karyotype: support for the existence of a gene(s), located in distal Xp, involved in testis formation. *Med Genet* 1992; 29:226-230.
113. Ohno S. Sex chromosomes and sex-linked genes. En: Labhart A, editor. *Monographs on Endocrinology*. Berlin: Springer Verlag; 1967. p. 5.
114. Ozisik G, Achermann JC, Jameson JL. The role of SF1 in adrenal and reproductive function: insight from naturally occurring mutations in humans. *Mol Genet Metab* 2002; 76:85-91.
115. Park SY, Jameson JL. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinology* 2005;146:1035-1042.
116. Park SY, Tong M, Jameson JL: Distinct roles for steroidogenic factor 1 and desert hedgehog pathways in fetal and adult Leydig cell development. *Endocrinology* 2007; 148: 3704–3710.
117. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 1997; 18:361-377.
118. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; 67:437-447.

119. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev* 1991; 5:1345-1356.
120. Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; 67:437-447.
121. Pereira E, Cabal de Almeida J, Gunha A. Use of probes for ZFY, SRY, and the Y-pseudoautosomal boundary in XX males, XX true hermaphrodites and an XY female. *J Med Genet* 1991; 28:591-595.
122. Perez de Nanclares G, Castano L, Bilbao JR, Vallo A, Rica I, Vela A, Martul P. Molecular analysis of Frasier syndrome: mutation in the WT1 gene in a girl with gonadal dysgenesis and nephronophthisis. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15:1047-1050.
123. Philip W. Ingham and Andrew P. McMahon. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & Dev* 2001 15: 3059-3087.
124. Pierucci-Alaves, Ann M. Clark, and Lonnie D. Russell. A developmental study of the Desert hedgehog-Null mouse testis. *Biology of Reproduction* 2001; 65, 1392-1402.
125. Pirvola U, Ylikoski J, Trokovic R, Hebert JM, McConnell SK, Partanen J. FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron* 2002; 35:671-680.
126. Porter JA, Ekker SC, Park W-J, von Kessler DP, Young KE, Chen C-H, Ma Y, Woods AS, Cotter RJ, Koonin EV, Beachy PA. Hedgehog patterning activity: role of lipophilic modification mediated by the carboxy-terminal autoprocessing domain. *Cell* 2003; 86:21-34.
127. Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, Beachy PA. The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling. *Nature* 1998; 374:363-366.
128. Rahnama, Fahimeh, Rune Toftgard and Peter G. Zaphiropoulos. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signaling. *Biochem. J.* 2004; 378, 325–334
129. Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T. Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 1990; 250:1259-1262.

130. Rice DP, Rice R, Thesleff I. Fgfr mRNA isoforms in craniofacial bone development. *Bone* 2003; 33:14-27.
131. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Rev* 1994; 15:725-742.
132. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, Simburger K, Milbrandt J. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:10939-10943.
133. Sambrook, J. and Russel D. W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third Ed. Vol 1, 2 y 3. Cols.,d Spring Harbor Laboratory Press
134. Sanlaville D, Vialard F, Thepot F, Vue-Droy L, Ardalan A, Nizard P, Corre A, Devauchelle B, Martin-Denavit T, Nouchy M, Malan V, Taillemite JL, Portnoi MF. Functional disomy of Xp including duplication of DAX1 gene with sex reversal due to t(X;Y)(p21.2;p11.3). *Am J Med Genet A* 2004; 128:325-330.
135. Saylam K, Simon P. WT1 gene mutation responsible for male sex reversal and renal failure: the Frasier syndrome. *Eur J Obstet Gynecols., Reprod Biol* 2003; 110:111-113.
136. Sawchenko PE, Plotsky PM, Pfeiffer SW, Cunningham ET, Vaughan J, Rivier J, Vale W. Inhibin beta in central neural pathways involved in the control of oxytocin secretion. *Nature* 1988; 334:615-627.
137. Schally A, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1971; 43:393-399.
138. Scherer G, Schempp W, Baccichetti C, Lenzini E, Bricarelli FD, Carbone LD, Wolf U. Duplication of an Xp segment that includes the ZFX locus causes sex inversion in man. *Hum Genet* 1989; 81:291-294.
139. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'rahilly S, Aparicio SA. Two Novel Missense Mutations in GPR54 in a Patient with Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:1849-1855.

140. Shimamura R, Fraizer GC, Trapman J, Lau Y-FC, Saunders GF. The Wilms' tumor gene WT1 can regulate genes involved in sex determination and differentiation: SRY, Mullerian-inhibiting substance, and the androgen receptor. *Clin Cancer Res* 1997; 12:2571-2580.
141. Shimasaki S, Koga M, Buscaglia ML, Simmons DM, Bicsak TA, Ling N. Follistatin gene expression in the ovary and extragonadal tissues. *Mol Endocrinol* 1989; 3:651-659.
142. Shivers BD, Harlan RD, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of estradiol in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature* 1983; 304:345-347.
143. Sim E U-H, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH, Little M H. Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* 2002; 21:2948-2960.
144. Sinclair AH, Berta P, Palmer M, Hawkins J, Griffiths B, Smith M, Foster J, Frischauf A, Lovell-Badge R, Goodfellow P. A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346:240-244.
145. Stryer. Lubert (1993). *Biochemistry*. Third Ed. Mosby, Reverte, S.A. España.
146. Südbek P, Lienhard Schmitz M, Baeuerle PA, Scherer G. Sex reversal by loss of the C-terminal transactivation domain of human SOX9. *Nat Genet* 1996; 13:230-232.
147. Sullivan KA, Silverman AJ. The ontogeny of gonadotropin-releasing hormone neurons in the chick. *Neuroendocrinology* 1993; 58:597-608.
148. Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev* 1999; 13:755-767.
149. Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM, Seldin MF. Homologs of Drosophila Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics* 1995; 25:565-567.
150. Tate G, Satoh H, Endo Y, Mitsuya T. Assignment of DHH to human chromosome bands 12q12→q13.1 by *in situ* hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2002; 88:93.

151. Torres L, López M, Méndez JP, Canto P, Cervantes A, Alfaro G, Pérez-Palacios G, Erickson R, Kofman-Alfaro S. Molecular analysis in true hermaphrodites with different karyotypes and similar phenotypes. *Am J Med Genet* 1996; 63:348-355.
152. Traiffort, E. Christele, Dubourg.Helene, Faure, Didier, Rognan. Sylvie, Odent, Marie-Renee, D. Veronique, David and Martial, Ruat. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 42889-42897.
153. Tsukiyama T, Ueda H, Hirose S, Niwa O. Embryonal long terminal repeat-binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 1992; 12:1286-1291.
154. Ueda H, Sun GC, Murata T, Hirose S. A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol Cell Biol* 1992; 12:5667-5672.
155. Ulloa-Aguirre A, Méndez JP, Díaz-Sánchez V, Altamirano A, Pérez-Palacios G. Self priming effect of LH/hCG upon the biphasic testicular response to exogenous hCG. I. Plasma testosterone profile. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61:926-932.
156. Umehara F, Tate G, Itoh K, Yamaguchi N, Douchi T, Mitsuya T, Osame M. A novel mutation of *desert hedgehog* in a patient with 46,XY partial gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy. *Am J Hum Genet* 2002; 67:1302-1305.
157. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989; 57:1139-1146.
158. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon A. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999; 397:405-409.
159. Veitia RA, Salas-Cortés L, Ottolenghi Ch, Pailhoux E, Citinit C, Fellous M. Testis determination in mammals: more questions than answers. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 179:3-16
160. Veldhuis JD. Dynamics of the hypothalamic pituitary-testicular axis. En: Yen SSC, Jaffe RB, editores. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: Saunders; 1991; 409-416.
161. Vidal VPI, Chaboissier M-C, de Rooij DG, Schedl A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 2001; 28:216-217.

162. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY related gene SOX9. *Cell* 1994; 49:1111-1120.
163. Wang ZY, Qiu QQ, Deuel TF. The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem* 1993; 268:9172-9175.
164. Wilson JD. Metabolism of testicular androgens. In Greep RO, Astwood EB, editors. *Handbook of Physiology. Endocrinology, Male Reproductive System vol V*. Washington: American Physiological Society; 1995. p. 491-508.
165. Wilson TE, Paulsen RE, Padgett KA, Milbrandt J. Participation of non-zinc finger residues in DNA binding by two nuclear orphan receptors. *Science* 1992; 256:107-110.
166. Winters SJ, Ishizaka K, Kitahara S, Troen P, Attardi B. Effects of testosterone on gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid in the presence or absence of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1992; 130:726-734.
167. Wong M, Ramayya MS, Chrousos GP, Driggers PH, Parker KL. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 1996; 17:139-147.
168. Wray S. Development of luteinizing hormone releasing hormone neurones. *J Neuroendocrinol* 2001; 13:3-11.
169. Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8132-8136.
170. Yao HH. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 230:87-93.
171. Ying SY. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev* 1988; 9:267-293.
172. Yun Zhao, Chao Tong and Jin Jiang. Hedgehog regulates smoothed activity by inducing a conformational switch. *Nature* 2007 doi: 1030-1038.
173. Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* 1998; 20:353-357.

174. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 1994; 372:635-641.
175. Zhang H, Thomsen JS, Johansson L, Gustafsson JA, Treuter E. DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* 2000; 275:39855-39859.