



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

Tamizaje molecular de los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en  
individuos con Desordenes del Desarrollo Sexual 46,XY

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A

KARLA ADRIANA CESÁREO CASTORENA

DIRECTOR DE TESIS

DR. LUIS RAMOS TAVERA



2016

México, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **RECONOCIMIENTOS**

*Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,  
Departamento de Biología de la Reproducción laboratorio de Bioquímica hormonal.*

*Al CONACYT por el apoyo financiero otorgado (Proyecto CB2011-166408-M).*

## DEDICATORIA

*A mi madre porque has sido el pilar más importante en mi vida, has sido mi amiga, mi confidente, mi sustento, mi motivación, mi inspiración, mis ganas de seguir; porque eres el claro ejemplo de fuerza y lucha constante. Has estado en los momentos más alegres y difíciles de mi existencia y me has enseñado a ser una mujer de bien. Este logro también es tuyo mami.*

*A mi hermano Alejandro porque eres parte fundamental de mi vida.*

*A mi hermano Saúl que con todo y nuestras indiferencias sabemos que estamos para apoyarnos.*

*A mi buen y gran amigo Samuel que "andábamos sin buscarnos pero sabiendo que andábamos para encontrarnos".*

*A mi padre.*

*A mi tía Silvia.*

*A mi madrina Chayo, Anita, Pepe, Luis, Leo y mi Mami.*

*A Daniel porque has estado de todas las maneras posibles, en todo momento. Porque me has enseñado a enfrentar mis miedos, a ser más feliz y a vivir más ligera.*

*A Norma y Daniela porque las tres sabemos que aunque lejos siempre estamos unidas por aquello tan valioso que se llama amistad porque juntas hemos crecido, tropezado y aprendido tanto al pasar de los años.*

*A mi amigo Víctor, por estar, porque me recuerdas que debo seguir mis sueños cuando dejo de ver claro y haces que me vuelva la confianza y la razón.*

*A mis amigos de la facultad. Ely y David por los momentos que compartimos, aprendiendo y divirtiéndonos; porque si se pueden hacer las dos cosas. A Oscar porque la carrera se hizo más amena a tu lado, por ayudarme, por enseñarme y cuidarme. A Galo, Duly, Shaid, Monkey y todos aquellos con los que comparto tan gratos recuerdos.*

*A mi familia CCHera, a pesar de ser tan dispersa acabe siendo como nuestro querido profesor Margarito.*

*A Gabs que por si no fuera poco con mi Carrera, me sigue enseñando el sentido de la responsabilidad, la disciplina, el trabajo en equipo y profesionalismo. Porque combinar la Ciencia con el arte han sido de las mejores cosas que he experimentado.*

*A Lis, que literalmente salvo mi vida.*

*La primera vez que mis ojos vieron a través de un microscopio fue a la edad de 5 años, era el embrión de un pollo, aún recuerdo la emoción que sentí. Desde ese momento supe que la ciencia tenía que estar presente en mi vida. A todos aquellos que me alentaron, inspiraron, compartieron tiempo y conocimiento. A todos aquellos que como yo están enamorados del saber. Dr. Galindo, Dr. Herrera, Dra. Estela, Dr. Solís, Dra. Galicia, Dra. Cassandra, Dra Dannel y por supuesto Dr. Arteaga y Dra. Isabel García.*

*Al Mtro. Margarito Álvarez.*

## AGRADECIMIENTOS

### A mi Dios

**A mi madre**, gracias por todo tu esfuerzo, porque llevar la batuta de una familia no es fácil y tú lo has logrado sacándonos adelante a mis hermanos y a mí. He llegado a una meta contigo tomándome de la mano, ahora me toca mostrarte los frutos de tanto sacrificio. Porque mereces eso y más. Gracias por depositar tu confianza en mí, por cuidarme y estar a mi lado cuando más lo he necesitado. Te amo mamá.

**A mi hermano Alejandro**, gracias porque tu apoyo ha sido de vital importancia no solo en este proceso sino en toda mi vida. Eres un ejemplo a seguir. Te amo hermanito.

**A Daniel Antonio**, gracias amor por ser mi confidente, mi amigo, mi compañero, mi paño de lágrimas, mi refugio; porque fuiste de las personas que más padecieron este proceso. Gracias por aguantar mi estrés, mi mal humor, los planes cancelados y por tener siempre algo que me volviera a la vida. Porque a tu lado nunca se me olvida sonreír, siempre tuviste una palabra de aliento y me has enseñado a ser más fuerte. Por eso y muchas cosas más gracias.

**A mi asesor** el Dr. Luis Ramos Tavera, gracias porque es muy grato saber que aún existen personas como tú que son capaces de compartir su conocimiento, que se involucran con sus alumnos y sobre todo que hacen su trabajo con pasión y dedicación. Gracias por la paciencia y el tiempo. Definitivamente he aprendido de los mejores.

**A todo el equipo** del laboratorio de bioquímica hormonal en especial al Dr. Felipe Vilchis y a la Dra. Bertha Chávez.

**A mis compañeros** de laboratorio gracias por su apoyo. A Sarita.

### A los sinodales

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M en C. Carlos Bautista Reyes

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Dr. Luis Ramos Tavera

# Índice

|   |        |
|---|--------|
| <b>RESUMEN</b> .....  | - 2 -  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....                                   | - 4 -  |
| DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL .....                 | - 4 -  |
| MECANISMOS DE ACCIÓN DE ANDRÓGENOS.....                     | - 7 -  |
| SÍNTESIS DE ANDRÓGENOS. ....                                | - 8 -  |
| SÍNTESIS ALTERNA DE ANDRÓGENOS.....                         | - 9 -  |
| <i>AKR1C2</i> .....   | - 12 - |
| <i>HSD17B6</i> .....  | - 13 - |
| DESORDENES DEL DESARROLLO SEXUAL 46,XY .....                | - 14 - |
| <br>  |        |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....                                  | - 17 - |
| <b>HIPÓTESIS</b> .....                                      | - 18 - |
| <b>OBJETIVO</b> .....                                       | - 19 - |
| <b>MATERIAL Y MÉTODO</b> .....                              | - 20 - |
| SUJETOS .....   | - 20 - |
| EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.....                             | - 20 - |
| REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....             | - 21 - |
| POLIMORFISMO CONFORMACIONAL DE CADENA SENCILLA (SSCP) ..... | - 23 - |
| PURIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE ELECTROELUCIÓN.....            | - 24 - |
| SECUENCIACIÓN .....   | - 25 - |
| <br>  |        |
| <b>RESULTADOS</b> .....                                     | - 26 - |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....                                      | - 31 - |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....                                   | - 35 - |
| <b>REFERENCIAS</b> .....                                    | - 36 - |

## Resumen

En etapas tempranas del desarrollo embrionario tanto la testosterona (T) como la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) inducen la diferenciación de los genitales externos masculinos. En la vía metabólica clásica, la conversión de T a DHT es mediada principalmente por la isoenzima 5 $\alpha$ -esteroide reductasa tipo 2 (SRD5A2). Alteraciones génicas en el metabolismo y/o acción de DHT pueden resultar en Desordenes del Desarrollo Sexual (DSD), incluyendo virilización incompleta en sujetos 46,XY (DSD 46,XY); no obstante, en ocasiones el diagnóstico no puede ser confirmado a través de este mecanismo, lo cual ha sugerido la existencia una ruta metabólica alterna (“backdoor pathway”), que podría explicar algunos casos de ambigüedad genital. En este estudio se realizó el análisis molecular de *AKR1C2* y *HSD17B6* en 30 pacientes con DSD 46,XY-hipospadias y 50 sujetos control. Los productos génicos de *AKR1C2* y *HSD17B6*, codifican dos enzimas con actividad 3 $\alpha$ / $\beta$ -HSD/HSE y capacidad para formar DHT a partir de precursores esteroides C<sub>19</sub> y C<sub>21</sub>, diferentes a T (i.e. 3 $\alpha$ /3 $\beta$ -androstadiol). Las secuencias codantes completas de ambos genes, incluyendo regiones intrónicas adyacentes, fueron amplificadas a partir de DNA genómico usando iniciadores específicos. Los ensayos de tamizaje molecular se llevaron a cabo mediante PCR-SSCP marcado con [ $\alpha$ <sup>32</sup>P]-dCTP y secuenciación automatizada de DNA. Los resultados mostraron alteraciones en los exones 4, 9 y 11 de *AKR1C2* mientras que el tamizaje molecular del gen *HSD17B6* mostró secuencias normales. El análisis de secuenciación indicó que las alteraciones detectadas en *AKR1C2* son mutaciones silenciosas [i.e. H222H (20%)] y/o posibles variantes polimórficas [A52A, 26200a>g,



(10%)] sin expresión fenotípica. Aunque el número de casos aquí presentados es limitado, los datos permiten concluir que las mutaciones inactivantes en *AKR1C2* y *HSD17B6* parecen no ser una causa frecuente de hipospadias, lo cual no descarta la posibilidad que otros genes AKR/HSD estén involucrados en la patogénesis de este defecto congénito.

## **Introducción**

### **Determinación y diferenciación sexual**

Durante la embriogénesis, la determinación del sexo consiste en tres etapas consecutivas: cromosómica, gonadal y fenotípica (Jost, 1970). La diferenciación sexual cromosómica inicia en el momento de la fertilización. En mamíferos, la determinación del sexo depende del complemento cromosómico, XX en hembras y XY en machos (Koopman et al., 1991). La determinación sexual masculina principalmente se realiza bajo la influencia del gen *SRY*, un factor de transcripción localizado en el brazo corto del cromosoma Y. En etapas tempranas del desarrollo embrionario, el gen *SRY* estimula la diferenciación de los testículos a partir de la gónada indiferenciada (Fig. 1) (Imperato-McGinley y Zhu, 2002).

En la diferenciación sexual, las gónadas aparecen inicialmente como un par de elongaciones longitudinales que se harán más prominentes. A partir de la proliferación del epitelio superficial y la condensación del mesénquima subyacente se dará origen a los pliegues o crestas genitales. A la sexta semana, aparecen las células germinales y las células de Sertoli. Las células de Sertoli se adhieren a las células germinales para formar los cordones seminíferos. Esta es la primera fase de la diferenciación testicular (Voutilainen, 1992; Huhtaniemi, 1994).

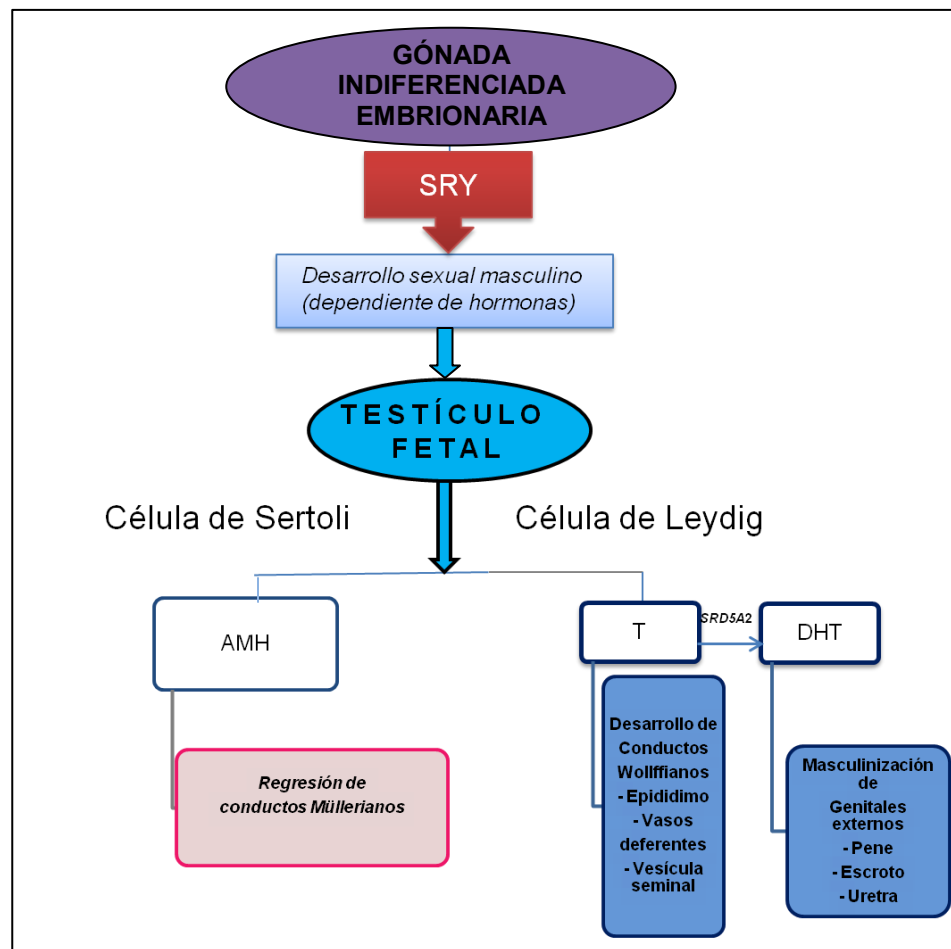
Después de la diferenciación de las células de Sertoli, las gónadas XY se dividen en dos compartimentos necesarios para la función normal de los testículos, la cual incluye la formación de los gametos a través de los cordones del testículo y las células

somáticas (Ungewitte y Yao, 2013). La formación de los cordones testiculares se da en tres pasos: 1) las células del epitelio célomico migran dentro del testículo, 2) la vascularización llega al mesonero, se adentra en la gónada y junto con los cordones darán forma a la gónada y finalmente, 3) los cordones se unen en la capa de la membrana basal, creando un ambiente específico para la producción espermática (Ungewitte y Yao, 2013).

En la octava semana de gestación se realiza la regresión de los conductos Müllerianos mediante la acción de la hormona anti-Mülleriana (AMH), una glicoproteína secretada por las células de Sertoli (Wilson, 1978; Donahoe et al., 1987; Josso et al., 1991; Lee y Donahoe, 1993; Baarends et al., 1994; Lane y Donahoe, 1998; Allard et al., 2000). Al término de la semana 9, el mesénquima que dio origen a los conductos seminíferos cubre a las células intersticiales provocando su diferenciación en células de Leydig (Thigpen et al., 1993; Wilson et al., 1993).

En varones, la diferenciación de los genitales internos y externos es regulada mediante andrógenos. La testosterona (T), el principal andrógeno secretado por los testículos del feto y del adulto, actúa directamente en la formación de estructuras reproductivas (Siiteri y Wilson, 1974; Wilson, 1978; Lee y Donahoe, 1993); mientras que la 5 $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT), andrógeno con mayor potencia biológica, es importante para la masculinización de los genitales externos durante la vida fetal y para la maduración sexual masculina durante la pubertad (Fig. 1) (Matsumoto y Bremner, 2011).

Entre la semana 11 y 18 de gestación, se incrementa la biosíntesis de T, la cual estimula la formación de los conductos Wolffianos (vasos deferentes, epidídimo y vesícula seminal) (Thigpen et al., 1992; Sultan et al., 2001; Hrabovsky y Huston, 2002). Mientras que el desarrollo de la próstata y de los genitales externos (escroto, pene y uretra peneana) dependen de la DHT (Fig. 1) (Thigpen et al., 1993; Wilson et al., 1993; Boehmer et al., 1999; Committee on Genetics, Section on Endocrinology and Section on Urology, 2000; Sultan et al., 2001).



**Fig. 1.** Representación esquemática de la diferenciación sexual masculina durante la etapa embrionaria y fetal en donde se describe la síntesis de la hormona anti-Mülleriana (AMH) y los andrógenos, testosterona (T) y 5 $\alpha$ - dihidro-testosterona (DHT) (Tomado y modificado de Fukami et al., 2013).

## **Mecanismos de acción de andrógenos**

La T es sintetizada en las células de Leydig bajo el control de la hormona luteinizante (LH). La T es secretada al torrente sanguíneo y entra a las células blanco mediante un mecanismo de difusión pasiva. En el interior de la célula, la T puede ser  $5\alpha$ -reducida a DHT. Tanto la T como la DHT se unen al receptor de andrógenos (RA), (Thigpen et al., 1992; McPhaul et al., 1993; Wilson et al., 1993; Geissler et al., 1994; McPhaul y Griffin, 1999; Imperato-McGinley, 2002; Adamovic et al., 2013). El RA pertenece a la superfamilia de receptores nucleares que se caracteriza por presentar un dominio de unión a DNA muy conservado (DBD). La estructura canónica del RA consiste en un dominio amino terminal (NTD), un dominio carboxilo-terminal de unión al ligando (LBD), una región bisagra no conservada que separa al DBD y LBD. El NTD tiene como función la activación de la transcripción independiente de ligando tipo 1 (AF-1), mientras que el DBD y LBD presentan la función de activación de la transcripción dependiente del ligando tipo 2 (AF-2) (Robinson-Rechavi et al., 2003). El RA se encuentra en el citoplasma en forma inactiva y está asociado a complejos de proteínas de choque térmico (Aranda y Pascual, 2001). Después de la unión al ligando, el receptor se disocia de las proteínas de choque térmico para ser activado (Schaufele et al., 2005). La unión al ligando produce homodímeros que se translocan al núcleo, los receptores dimerizados a través de las estructuras denominadas dedos de zinc se unen a secuencias de DNA conocidos como elementos de respuesta a andrógenos. Los receptores dimerizados interactúan con la maquinaria de transcripción y proteínas correguladoras para controlar la expresión de genes andrógeno-dependientes (Wright

et al., 1979; Aranda y Pascual, 2001; Gobinet et al., 2002; Heinlein y Chang, 2002; Schaufele et al., 2005; Haelens et al., 2007; Galani et al., 2008).

### **Síntesis de andrógenos**

La síntesis de esteroides o esteroidogénesis tiene como precursor esencial el colesterol que es transportado a la membrana mitocondrial interna a través de la acción de la proteína StAR, en donde es biotransformado a pregnenolona en un proceso de tres reacciones consecutivas realizadas por el citocromo P450<sub>scc</sub> (Fig. 2). A partir de pregnenolona, la síntesis de andrógenos puede seguir diferentes rutas denominadas  $\Delta^4$  y  $\Delta^5$  (Flück et al., 2003).

En la ruta  $\Delta^4$  la pregnenolona es hidroxilada a progesterona mediante la enzima  $3\beta$ -HSD2. La progesterona es hidroxilada en la posición 17 por la  $17\alpha$ -hidroxilasa (CYP17) para formar  $17\text{OH}$  progesterona, mientras que la  $17,20$  liasa sintetiza la formación de androstendiona. Como consecuencia el esteroide de 19 carbonos puede ser el substrato para la  $17\beta$ -HSD3 y sintetizar T. La formación de DHT a través de la  $5\alpha$ -reductasa 2 requiere de T como intermediario final para su síntesis (Wilson et al., 1993; Auchus et al., 1998; Flück et al., 2003; Fukami et al., 2013).

En la vía  $\Delta^5$  la pregnenolona es biotransformada en  $17\text{OH}$ -pregnenolona ( $17\text{OH}$ -Preg) para formar dehidroepiandrosterona (DHEA) por el citocromo P450<sub>c17</sub>. La DHEA puede ser convertida a androstendiol y androstendiona por la  $17\beta$ -hidroxiesteroide dehidrogenasa tipo 3 ( $17\beta$ -HSD3) y la  $3\beta$ -HSD2 (*HSD3B2*), respectivamente. Ambos esteroides pueden ser substratos para la síntesis de T mediante la  $3\beta$ -HSD2 y  $17\beta$ -

HSD3, respectivamente (Geissler et al., 1994; Flück et al., 2003; Fukami et al., 2013). En ambas rutas metabólicas, la etapa final en la síntesis de andrógenos es la reducción en el carbono 5 de la T para formar DHT mediante la 5 $\alpha$ -reductasa 2 (Wilson et al., 1993).

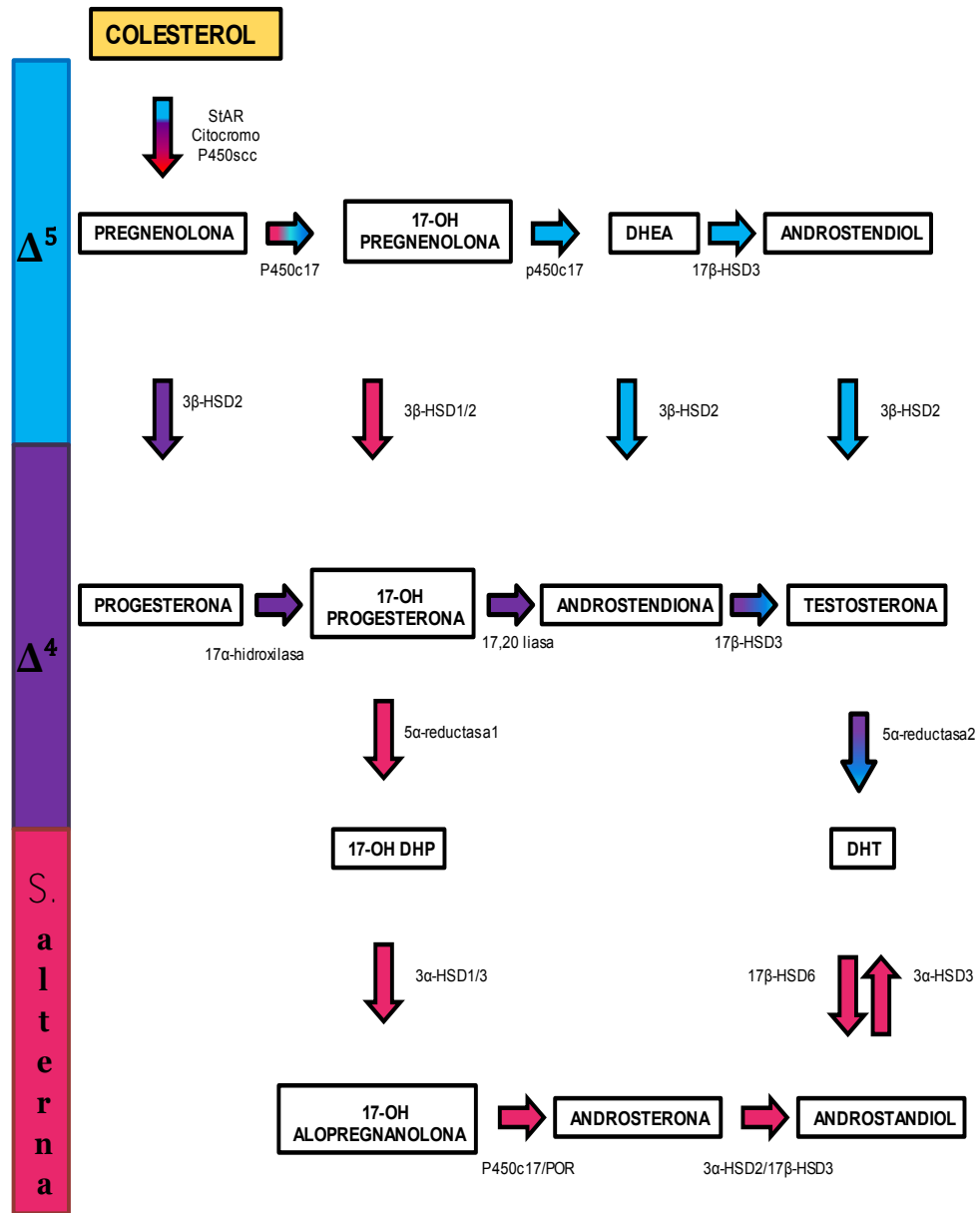
### **Síntesis alterna de andrógenos**

La existencia de una vía alterna para la síntesis de DHT fue demostrada por primera vez en el marsupial *Macropus eugenii* (Shaw et al., 2000; Wilson et al., 2003). El uso de esta especie presenta ventajas para el estudio del desarrollo sexual masculino debido a su característico proceso corto de desarrollo en el útero materno y crecimiento dentro del marsupio (Butler et al., 1999; Wilson et al., 2002; Biason-Lauber, 2013). Durante la embriogénesis, el proceso de masculinización del tracto urogenital en *Macropus eugenii* es principalmente dependiente de la acción de la DHT (Wilson et al., 1999; Shaw et al., 2000; Leihy et al., 2001; Wilson et al., 2003).

Estudios en esta especie se demostró que el testículo embrionario puede sintetizar androstendiol como precursor de DHT por una vía alterna (Fig. 2). La vía alterna de DHT comienza a partir de la biosíntesis de 17OH-pregnenolona a 17OH-progesterona, 17OH-dihidroprogesterona (17OH-DHP), 17OH-alopregnanolona, androsterona y androstandiol, mediante 3 $\beta$ -HSD1/2, 5 $\alpha$ -Reductasa 1, 3 $\alpha$ -HSD1/3, P450c17/POR y 3 $\alpha$ -HSD2/17 $\beta$ -HSD3, respectivamente. La conversión de androstandiol a DHT ocurre mediante la función oxidativa de 3 $\alpha$ -HSD (*HSD17B6*), mientras la reacción inversa utiliza la 3 $\alpha$ -HSD reductiva (*AKR1C2*) (Wilson et al., 2003; Auchus, 2004; Biason-Lauber, 2013).

Los desórdenes génicos en la biosíntesis de esteroides pueden contribuir al desarrollo de diversas alteraciones como hiperplasia prostática benigna, acné, cáncer de próstata, hirsutismo, alopecia androgénica y desordenes del desarrollo sexual 46,XY (Hardoy et al., 2006; Sundaram et al., 2008; Vilchis et al., 2008; Lanišnik, 2009; Vilchis et al., 2010; Miller y Auchus, 2011; van der Sluis et al., 2012; Baptissart et al., 2013; Chávez et al., 2014).





**Fig. 2. Ruta metabólica clásica y alterna (background) para la biosíntesis de andrógenos (Tomado y modificado de Flück et al., 2011; Fukami et al., 2013).**

## ***AKR1C2***

La enzima 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 3 (3 $\alpha$ -HSD3) es una enzima dependiente de NADP(H) que presenta la habilidad de una aldo-ceto reductasa y de biosintetizar DHT sin utilizar T como precursor, en su lugar utiliza 5 $\alpha$ -androstandiol (androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol (androstano-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol) (Wilson et al., 2003; Auchus, 2004; Steiner et al., 2008; Bignon-Lauber, 2013). El gen que codifica para la 3 $\alpha$ -HSD3 es denominado *AKR1C2* su peso molecular es de 36735 Da y tiene una posición cromosómica 10p15-p14; consta de 9 exones y 8 intrones (Khanna et al., 1995; Penning, 1997). Estructuralmente está compuesto por un sitio de unión al cofactor, un sitio de unión al esteroide y un dominio C-terminal. El marco de lectura abierto para la *AKR1C2* consiste de 969 pb que codifican para una proteína de 323 aa. Se ha reportado que la enzima se expresa preferencialmente en testículo fetal y en menor proporción en el adulto; mientras que en adultos su expresión aumenta en la glándula suprarrenal (Penning et al., 2000; Couture et al., 2005; Flück et al., 2011).

Análisis moleculares en pacientes de dos familias con DSD 46,XY asociados a genitales externos ambiguos, mostraron alteraciones en el gen *AKR1C2* el cual actúa en la vía alterna para la biosíntesis de DHT (Flück et al., 2011). Esto podría indicar la posible participación de la vía alterna para la síntesis de DHT y su importancia fisiológica en la diferenciación sexual masculina.

## ***HSD17B6***

La enzima  $17\beta$ -HSD6 también conocida como RoDH pertenece a la familia de las hidroxisteroide deshidrogenasas y presenta la habilidad de catalizar la epimerización de los  $3\alpha$ -hidroxisteroides (Huang y Luu-The, 2000). Esta enzima utiliza como sustratos androsterona y androstandiol para sintetizar androstandiona y DHT, respectivamente. La actividad catalítica esencial es la oxidación de  $3\alpha$ -diol a DHT (Dufort et al., 2001).

La actividad biológica de esta enzima ha sido asociada al metabolismo de andrógenos y síntesis de neuroesteroides. El gen que codifica para la  $17\beta$ -HSD6 es denominado *HSD17B6*, consta de un peso molecular de 35966 Da y se encuentra localizado en el cromosoma 12q13.3. Comprende 5 exones y 4 intrones de los cuales el exón 1 no es codificante. El codón de inicio de la traducción ATG se localiza 19 pb después del inicio del exón 2 (Huang y Luu, 2001). El cDNA que codifica para la  $17\beta$ -HSD6 consta de 951 pb que codifican para una proteína de 317 aa. Estructuralmente, la enzima presenta 3 sitios funcionales: un sitio de activación, un sitio de unión a NADP y un sitio de unión al esteroide. La expresión del mRNA de la RoDH se ha localizado primordialmente en hígado y en menor expresión en bazo, testículo y próstata (Biswas y Russell, 1997; Penning et al., 2000).

## **Desordenes del Desarrollo Sexual 46,XY**

Los desórdenes del desarrollo sexual (DSD) son un grupo de malformaciones congénitas en donde el sexo cromosómico, gonadal o fenotípico es atípico (Hughes et al., 2006). Los DSD pueden ser clasificados en 3 categorías: DSD cromosómico (i.e. 45,X Turner, 47,XXY Klinefelter, 45X/46XY disgenesia gonadal mixta y DSD cromosómico ovotesticular 46XX/46XY tipo quimera o mosaico), DSD 46,XX (i.e. desordenes en el desarrollo ovarico o exceso de andrógenos fetales) y DSD 46,XY (i.e. desordenes en el desarrollo testicular o desordenes en la síntesis y/o acción de andrógenos) (Tabla 1) (Hughes y Deeb, 2006; Lee et al., 2006; Gönül, 2011).

Los DSD resultan de mutaciones en alguno de los genes involucrados en la determinación o diferenciación sexual. Algunas de estas mutaciones están bien identificadas, sin embargo, los mecanismos adicionales aún no se han descrito en más del 50% de los casos de DSD (Hughes et al., 2006). Aunado a la expresión adecuada de los genes implicados en la diferenciación sexual, también es importante el tiempo adecuado de su expresión durante la embriogénesis (Krishnan y Wisniewski, 2015).

El DSD cromosómico está asociado a anomalías numéricas de los cromosomas sexuales que intervienen en el desarrollo gonadal y por lo tanto resultan en gónadas anormales (Dreger et al., 2005; Lee et al., 2006; Siklar et al., 2007; Houk y Lee, 2008; Oliveira et al., 2009; Khandelwal et al., 2010; Balkan et al., 2010; Wijchers et al., 2010; Aaronson, 2011; Barthold, 2011; Nishi et al., 2011).

**Tabla 1. Clasificación de los Desórdenes del Desarrollo Sexual (Modificado de Gönül, 2011).**

| <b>Cromosomas Sexuales DSD</b>   | <b>DSD 46,XY</b>   | <b>DSD 46,XX</b>  |
|--|--|---|
| A: 46,X (Síndrome de Turner y variantes).<br>B: 47,XXY (Síndrome de Klinefelter y variantes).<br>C: 45,X/46,XY disgenesia gonadal mixta.<br>D: 46,XX/46,XY (Quimeras). | A: Desordenes del Desarrollo Gonadal (Testículo)<br><br>1. Disgenesia gonadal completa (Síndrome Swyer)<br>2. Disgenesia gonadal parcial<br>3. Regresión gonadal<br>4. DSD ovotesticular   | A: Desordenes del Desarrollo Gonadal (Ovario).<br><br>1. DSD ovotesticular<br>2. DSD testicular (SRY+, dup SOX9)<br>3. Disgenesia gonadal   |
|  | B: Desordenes en la síntesis o acción de andrógenos<br><br>1. Defectos en la biosíntesis de andrógenos ( <i>SRD5A2</i> , <i>HSD17B3</i> )<br>2. Defectos en la acción del RA (CAIS y PAIS) | B: Exceso de andrógenos.<br><br>1. Fetales (deficiencia de 21-hidroxilasa y 11-hidroxilasa)<br>2. Fetoplacentarios (deficiencia de aromatasa, POR)<br>3. Maternos (Luteoma, exógenos, etc.) |
|  | C: Otros.<br><br>Hipospadias severas<br>Síndrome de persistencia de los conductos Müllermanos<br>Otros síndromes.  | C: Otros<br><br>Atresia vaginal,<br>MURCS<br>Otros síndromes  |

Los DSD 46,XX presentan alteraciones en los genitales a causa de desórdenes en el desarrollo de ovario o exceso de andrógenos en la etapa fetal (Damian y Paulo, 2007). Algunas de las causas son la expresión positiva del gen *SRY*, defectos en genes como *WNT4*, *RSPO1* y duplicaciones del gen *SOX9* (Vainio et al., 1999; Parma et al., 2006; Gönül, 2011).

El DSD 46,XY puede ser causado por alteraciones en el metabolismo y acción de andrógenos como son baja producción de T, deficiencia de la 5 $\alpha$ -reductasa 2 o la incapacidad de la respuesta a andrógenos (Síndrome de Insensibilidad a Andrógenos o AIS) (Vilchis et al., 2003; Damian y Paulo, 2007; Chávez et al., 2014). Estos desordenes pueden ser explicados debido a alteraciones en la expresión de genes involucrados en la cascada de determinación y diferenciación testicular (Vilchis et al., 2008; Vilchis et al., 2010; Gönül, 2011). Las malformaciones congénitas de este desorden se caracterizan por la presencia de un fenotipo completamente femenino, criptorquidia es decir problemas en el descenso de uno o los dos testículos, crecimiento de las glándulas mamarias (ginecomastia) o hipospadias, una anomalía en la que la abertura de la uretra no está colocada correctamente en la punta del falo (Wilson et al., 1980; Vilchis et al., 2003; Vilchis et al., 2008; Choi et al., 2008; Allen, 2009; Cheon, 2010; Vilchis et al., 2010; Mendonca et al., 2010; Chávez et al., 2014; Bouty et al., 2015; Fawzy et al., 2015).

El diagnóstico para DSD 46,XY incluye mediciones hormonales, estudios de imagen, citogenética y en raras ocasiones estudios moleculares. La evaluación genética incluye cariotipo, FISH y recientemente estudios moleculares específicos que revelan la presencia de mutaciones en genes como *NR3C4*, *SRY*, *NR5A1*, *WT1*, *SOX9*, *DAX-1*, *HSD17B3* y *SRD5A2* involucrados en la diferenciación sexual (Vilchis et al., 2008; Vilchis et al., 2010; Gönül, 2011; Chávez et al., 2014).

## **Justificación**

Resultados recientes han mostrado que la vía alterna para la síntesis de andrógenos podría ser importante en la diferenciación sexual masculina (Flück et al., 2011), esto indica una posible participación de la vía alterna en la formación de DHT. Por lo tanto, en este estudio se realizarán ensayos moleculares para caracterizar mutaciones en el gen *AKR1C2* y *HSD17B6* en pacientes de origen mexicano con DSD 46,XY asociado a hipospadias.

## **Hipótesis**

Si la vía alterna es una de las principales fuentes de esteroides C19-5 $\alpha$ -reducidos durante la embriogénesis, las deficiencias en la actividad enzimática de la 3 $\alpha$ -HSD (oxidativa y reductiva) podrían ser una causa de DSD 46,XY debido a la incapacidad de formar 3 $\alpha$ -diol o convertir 3 $\alpha$ -diol a DHT. En consecuencia, estos individuos tendrían un cuadro clínico similar al de los sujetos con Síndrome de Insensibilidad a los Andrógenos Parcial.



## **Objetivo**

Identificar y determinar mutaciones en los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en individuos con DSD 46,XY.

## **Material y método**

### **Sujetos**

Se realizó el tamizaje molecular en los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en 30 pacientes con Desorden del Desarrollo Sexual 46,XY asociado a hipospadias y 50 sujetos control.

### **Extracción de DNA genómico**

Se tomaron 10 mL de sangre periférica de pacientes y controles. La muestra se colocó en tubos cónicos de 50 mL con 200  $\mu$ L de EDTA 0.5 M pH 8.0 y se mezcló por inversión. Los tubos fueron colocados sobre hielo y se llevaron a 35 mL con solución fría de sacarosa tritón 2X (Sacarosa 0.64 M, Tris-Base 0.02 M,  $MgCl_2$  0.01 M, Tritón 100X al 2% pH 7.6). Se llevó la mezcla a 50 mL con agua estéril, desionizada y destilada ( $ddH_2O$ ) y se mezcló por inversión. Las muestras se dejaron sobre hielo durante 10 min (mezclando varias veces por inversión). Para obtener el precipitado celular se centrifugó a 1000 xg por 15 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en: 3 mL de solución de lisis nuclear (Tris-Base 10 mM, NaCl 400 mM,  $Na_2EDTA$  2 mM pH 8.2), con 108  $\mu$ L de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% y 100  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL), se mezcló y se colocó a 50°C durante un mínimo de 2 h. Se transfirió el contenido a tubos cónicos estériles de 15 mL y se agregó 1 mL de NaCl saturado, agitando vigorosamente durante 15 seg, las muestras se centrifugaron a 1000 xg durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se transfirió a tubos cónicos de 15 mL estériles. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión hasta que el DNA se precipitó. Se extrajo el DNA

precipitado con una pipeta Pasteur sellada y se lavó el DNA con etanol al 70% durante 30 seg. Se dejó secar el DNA adherido a la pipeta Pasteur por aproximadamente 30 seg. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA (Tris 1.0 mM, EDTA 0.1 mM) a tubos para microcentrífuga de 500  $\mu\text{L}$ , se introdujo la punta de la pipeta Pasteur que tenía adherido el DNA y se agitó hasta que se desprendió. Se dejó disolver el DNA a temperatura ambiente y se cuantificó espectrofotométricamente (DU<sup>R</sup> 650 BECKMAN).

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se realizó la amplificación de los 9 exones del gen *AKR1C2* y los 4 exones del gen *HSD17B6* mediante PCR. Las cantidades para la reacción fueron las siguientes: 10  $\mu\text{L}$  de ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora 5X, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs 20  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido 5' 20  $\mu\text{M}$  (específico para cada exón), 1  $\mu\text{L}$  del oligonucleótido 3' 20  $\mu\text{M}$  (específico para cada exón), 0.2  $\mu\text{L}$  de GoTaq (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3  $\mu\text{L}$  de dCTP[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P], 5% de DMSO y 1.5  $\mu\text{L}$  de DNA de cada individuo. Las condiciones del PCR consistieron en una desnaturalización inicial con un ciclo a 94°C durante 3 min, después 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 58-65°C (temperatura dependiente de cada par de oligonucleótidos, Tabla 2 y 3) por 30 seg y a 72°C por 30 seg con una extensión final de 1 ciclo a 72°C por 3 min. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler Applied Biosystems.

Las reacciones de PCR se analizaron utilizando 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra y 3  $\mu\text{L}$  de solución de carga para DNA (azul de bromofenol 0.25%, cianol xileno 0.25% y Ficol 400 15%). Los amplicones fueron depositados en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y la electroforesis se llevó a cabo en una solución de corrida de TBE

0.5X (TBE 5X: 54 g de Tris base, 27.5 g de ácido bórico, 20 ml de 0.5 M EDTA pH 8) a 90 volts. Finalizada la electroforesis las muestras fueron analizadas en un equipo Molecular Imager<sup>R</sup> Chemi Doc<sup>TM</sup> XRS+ Imaging System with Image Lab<sup>TM</sup>.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos específicos para cada exón del gen *AKR1C2* y su temperatura de alineación.

| EXON | SECUENCIA                       | TEMPERATURA |
|------|---------------------------------|-------------|
| 3    | 5' TGCCAGCTCATTGCTCTTAT 3'      | 62°C        |
|      | 5' CTGGTCAGCTTCCACTTACTC 3'     | 62° C       |
| 4    | 5' CTCTCAGGCACATTAGTCAGAAA 3'   | 62° C       |
|      | 5' CAAGCTCATCATAGGCACAGTA 3'    | 62° C       |
| 5    | 5' ACACAACCTCGTTTCTCTAACC 3'    | 61° C       |
|      | 5' AGCTTAGTTCAAATCTCCATGA 3'    | 60° C       |
| 7    | 5' TCATGGAGGATTAGTGTCCTTAAAT 3' | 62° C       |
|      | 5' ACCTCATCTTTCTTATCCGTTCTC 3'  | 62° C       |
| 8    | 5' GCTCTTCAGTCGACTACACAAAT 3'   | 63°C        |
|      | 5' AGAAAGGAGAGGAGGCTGAG 3'      | 62°C        |
| 9    | 5' TTTCCATCTTGCTCGTCTGC 3'      | 63°C        |
|      | 5' CAGGAAACAGCATGATCTGATTA 3'   | 62° C       |
| 10   | 5' CCTCAGCCTTTCTGCCTTT 3'       | 62° C       |
|      | 5' AGGACACTGTGCAGGAGA 3'        | 62° C       |
| 11   | 5' CCCAATTGGCAATGATGTAATCT 3'   | 62° C       |
|      | 5' CACTCTCAACACCCATCCTAC 3'     | 62°C        |
| 12   | 5' TAACGGAGTCATTGCCATTCA 3'     | 62° C       |
|      | 5'GCAGGAGAGATTTAACCAGAGG 3'     | 62° C       |

**Tabla 3.** Oligonucleótidos específicos para cada exón del gen *HSD17B6* y su temperatura de alineación.

| EXON | SECUENCIA                      | TEMPERATURA |
|------|--------------------------------|-------------|
| 1A   | 5'TTTCTATTGAAAGAGAAGGAAGCAC3'  | 56°C        |
|      | 5' AGCCAGCACTCTCAAGC 3'        | 56°C        |
| 1B   | 5' TTTATCACGGGCTGTGACTC 3'     | 56°C        |
|      | 5'CAGGAGACACCAAGGAACAA 3'      | 56°C        |
| 2A   | 5' GCCTGAAACCAAACCTCCTGATA3'   | 56°C        |
|      | 5' AGACACAGTAGCCTCCTACAA3'     | 56°C        |
| 2B   | 5' CCTTGAGCATGCTTCCTTTG 3'     | 56°C        |
|      | 5' GCAACTAGCACAAATGCCTAAG 3'   | 56°C        |
| 3A   | 5' TTGAAATGGTGGTGGTCTTTAATC 3' | 56°C        |
|      | 5' AAATACTGCTGTCCATAGGTCTC 3'  | 56°C        |
| 3B   | 5' GCATAGTTGAACCTGGCTACT 3'    | 56°C        |
|      | 5' ACCCAGTCTCAGTTATTTCTTCAT 3' | 56°C        |
| 4A   | 5' AGATTGTTGACCACATTTCTT 3'    | 60°C        |
|      | 5' TGTAGTCTGCCAGTGATGTAG 3'    | 60°C        |
| 4B   | 5' GCATCCGCGAACTCGATATT 3'     | 60°C        |
|      | 5' GCCTGGGTTCTAAATCAGGATTAC 3' | 60°C        |

## **Polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP)**

Una vez amplificados y analizados los exones de cada individuo se realizaron los ensayos mediante la técnica de SSCP.

Se tomó 1  $\mu\text{L}$  de la muestra obtenida en el PCR y 14  $\mu\text{L}$  de solución de carga para SSCP (EDTA 20 mM, formamida 95%, azul bromofenol 0.05%). Posteriormente, los amplicones se desnaturalizaron a 94°C durante 5 min. Las muestras desnaturalizadas fueron analizadas en geles de poliacrilamida a una concentración de 5.4% con glicerol [35.91 mL de ddH<sub>2</sub>O, 7.0 mL de glicerol, 14.0 mL de TBE 5X, 12.6 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 24.5  $\mu\text{L}$  de Temed], 5.4% sin glicerol [42.91 mL de ddH<sub>2</sub>O, 14.0 mL de TBE 5X, 12.6 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 24.5  $\mu\text{L}$  de Temed], 8% con glicerol [29.85 mL de ddH<sub>2</sub>O, 7.0 mL de glicerol, 14.0 mL de TBE 5X, 18.66 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 25  $\mu\text{L}$  de Temed] y 8% sin glicerol [36.89 mL de ddH<sub>2</sub>O, 14.0 mL de TBE 5X, 18.66 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1), 0.49 mL de PSA 10%, 25  $\mu\text{L}$  Temed]. Se desgasificó durante 5 min y al finalizar se agregó el Temed.

La electroforesis se dejó correr a 200-250 volts durante 16-18 h. Al finalizar la electroforesis, el gel se transfirió a papel Whatman 3MM y se dejó en el secador Slab Gel Dryer SGD4050 SAVANT durante 60 min a 70°C. Las muestras en el papel fueron colocadas en una pantalla Molecular Imager FX<sup>TM</sup>, Imaging screen-K, BioRad durante 3 h y analizadas en un escáner PMI Personal Molecular Imager BIO-RAD, programa QuantityOne 4.6.

## **Purificación de DNA mediante electroelución**

Las muestras que se identificaron con un patrón de movimiento electroforético diferente fueron amplificadas nuevamente por PCR y observadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y una solución de carga de TBE 0.5X a 90 volts. Se utilizaron 25  $\mu$ L de cada muestra de PCR y 5  $\mu$ L de solución de carga para DNA. Al finalizar la electroforesis, las muestras fueron analizadas en un Molecular Imager<sup>R</sup> Chemi Doc<sup>TM</sup> XRS+ Imaging System with Image Lab<sup>TM</sup>.

Una vez observada la talla esperada de las muestras, con ayuda del transiluminador 2020E UV/ WHITE STRATAGENE fueron ubicadas en el gel y se cortaron los fragmentos. Posteriormente se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Por otra parte se lavaron membranas de diálisis (Spectra/Por<sup>R</sup> molecular porous membrane tubing, Spectra/Por<sup>R</sup> Dialysis Membrane MWCO: 6-8,000, Spectrum Laboratories, Inc) con ddH<sub>2</sub>O y fueron equilibradas con TBE 0.5X. Las muestras previamente cortadas se colocaron en las membranas y se adicionó TBE 0.5X hasta cubrir la muestra. A continuación se dejaron correr las muestras dentro de la membrana en una cámara de electroforesis con solución de carga TBE 0.5X a 100 volts durante 15 min. Se extrajo el TBE 0.5X de las membranas y las muestras se colocaron en tubos de 0.5 mL. Los tubos fueron colocados en columnas Amicon<sup>R</sup> Ultra-4 y se agregaron 3 mL de ddH<sub>2</sub>O. Se centrifugó a 1000 xg durante 10 min, se extrajo el precipitado y se decantó el sobrenadante. Cada muestra fue puesta en tubos eppendorf de 0.5 mL y analizados utilizando 5  $\mu$ L de cada muestra y 3  $\mu$ L de solución de carga para DNA

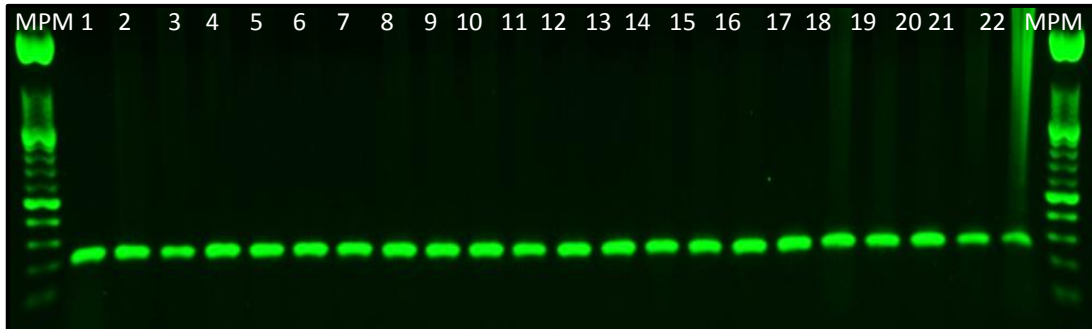
mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y una solución de corrida de TBE 0.5X a 90 volts.

### **Secuenciación**

Una vez que las muestras fueron purificadas se realizó la secuenciación en el equipo 310 Genetic Analyzer ABI PRISM™ Applied Biosystems, Foster City, CA para cada uno de los exones con posibles alteraciones génicas. Se realizó una comparación con los controles para la localización de la mutación. Las muestras fueron secuenciadas en ambos sentidos y por duplicado.

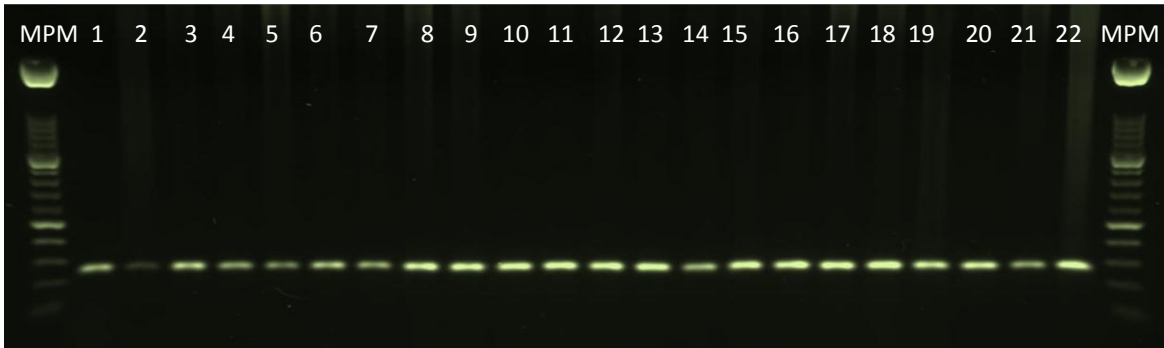
## Resultados

El tamizaje molecular de los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en pacientes diagnosticados con DSD 46,XY asociados a hipospadias inició con la amplificación mediante PCR-dCTP[ $\alpha$ - $^{32}$ P] de la región codante de cada exón. Los productos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa, comparados con un marcador de peso molecular (MPM) y con sujetos control (C). Los resultados indicaron que todos los exones de los dos genes amplificados, presentaban el tamaño esperado y era similar al de los controles (Fig. 3 y 4). De esta manera se pudo descartar la presencia de deleciones, inserciones o duplicaciones de una cantidad grande de pb en los exones analizados.



**Fig. 3.** Patrón de migración representativo de uno de los exones del gen *AKR1C2*. En la figura se muestra el exón 5. Los números indican las muestras amplificadas de sujetos control (1) y de los pacientes (2-22). La talla de las muestras se encuentran entre 200 y 300 pb.

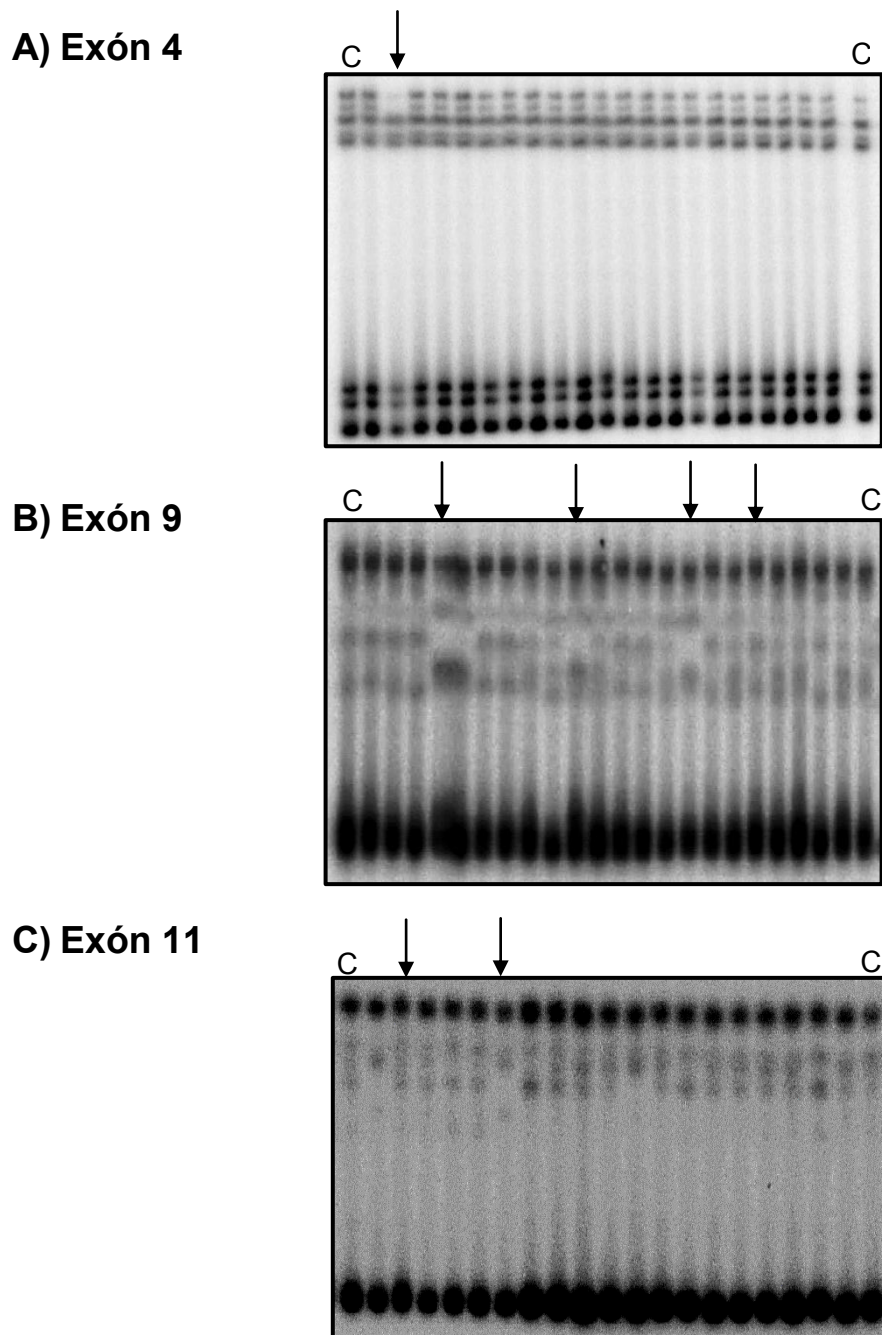




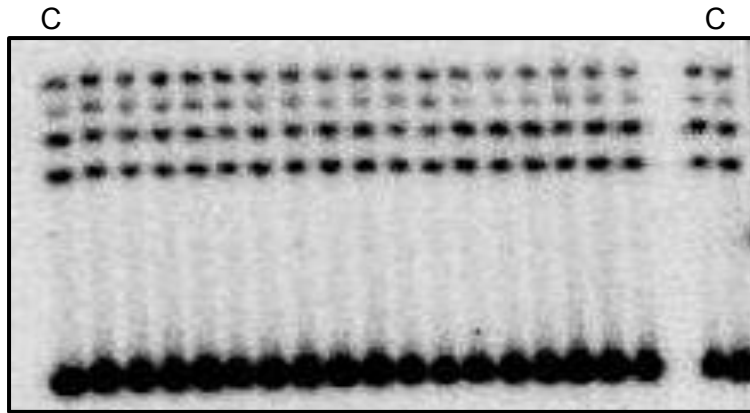
**Fig. 4.** Patrón de migración representativo de uno de los exones del gen *HSD17B6*. En la figura se muestra el exón 1. Los números indican las muestras amplificadas de sujetos control (1) y de los pacientes (2-22). La talla de las muestras se encuentran entre 200 y 300 pb.

Consecutivamente se realizó el tamizaje molecular de los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* mediante la técnica de SSCP. Las muestras amplificadas por PCR fueron sometidas a electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida a diferentes concentraciones con o sin glicerol; es decir, cuatro sistemas distintos por individuo y por cada exón que dan un total de 36 sistemas para el gen *AKR1C2* y 32 para *HSD17B6*. Esto debido a que en algunos geles las alteraciones en el patrón de migración electroforética eran más evidentes que en otras. Aunado a esto los controles se sometieron a la misma cantidad de sistemas y en las mismas condiciones que las muestras para cada exón de cada gen.

Mediante SSCP los resultados mostraron alteraciones en la movilidad electroforética en los exones 4, 9 y 11 del gen *AKR1C2* (Fig. 5) a una concentración de 8.0% sin glicerol, 8.0% con glicerol y 5.4% con glicerol, respectivamente; mientras que el tamizaje molecular del gen *HSD17B6* mostró un patrón de movilidad normal en los cuatro exones en comparación con los controles (Fig. 6).



**Fig. 5.** Tamizaje molecular de los exones 4, 9 y 11 del gen *AKR1C2* en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 8.0% sin glicerol (A), 8.0% con glicerol (B) y 5.4% con glicerol (C). Los pacientes con hipospadias fueron comparados con individuos control (c). Las flechas indican los pacientes con alteraciones en la movilidad electroforética comparadas con los individuos control.



**Fig. 6.** Tamizaje molecular del exón 2 del gen *HSD17B6* en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8.0% con glicerol. Los pacientes con hipospadias fueron comparados con individuos control (c).

Para determinar si las alteraciones génicas localizadas en el *AKR1C2* mediante SSCP eran posibles mutaciones, realizamos los ensayos de secuenciación utilizando el sistema BigDye.

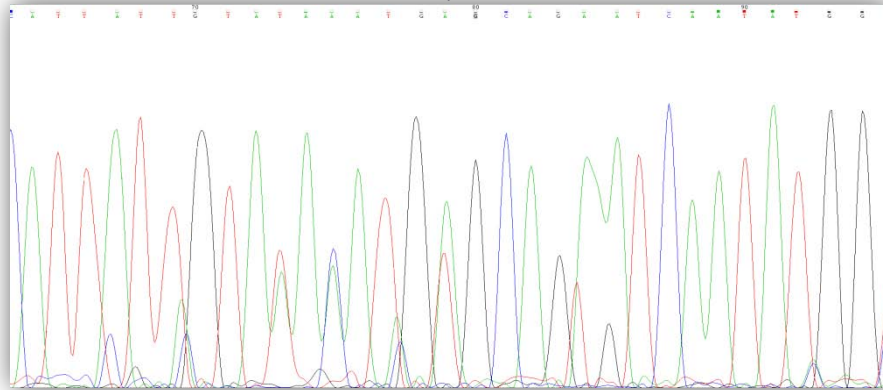
En el exón 4 (Fig. 7A) se pudo identificar una posible variante polimórfica en el nucleótido 114 (GCA-GCT), este cambio puntual originó que la proteína que se codifica presente una Alanina en el codón 52 (c.52A>T).

En el exón 9 (Fig. 7B) se identificó una mutación silenciosa en el nucleótido 666 (CAT-CAC) que codifican para una Histidina 222 (p.H222H).

Mientras que en el intrón 3' del exón 11 (Fig. 7C) se pudo observar una posible variante polimórfica [26200a>g, (10%)] sin expresión fenotípica.

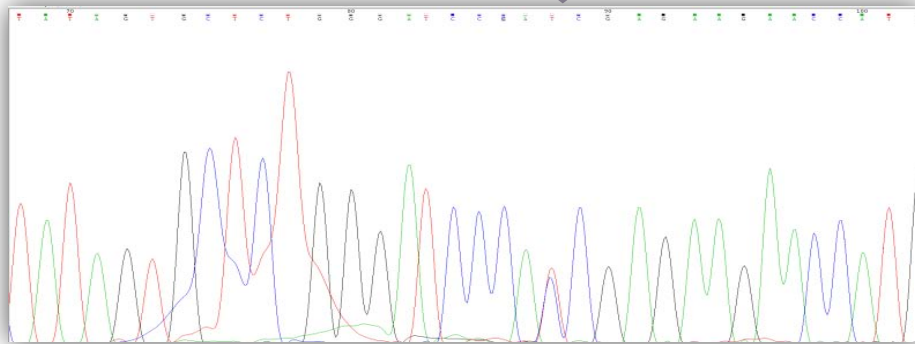
**A) Exón 4**

CAC CAT AAT GAT TCT GCA CAT GTT TAC AAT AAT GAG  
GCT



**B) Exón 9**

TAT AGT GCT CTG GGA TCC CAT CGA GAA GAA CCA TG  
CAC



**C) Exón 11**

CTT GAT ATT gtaagtattttggagatggtt  
gat

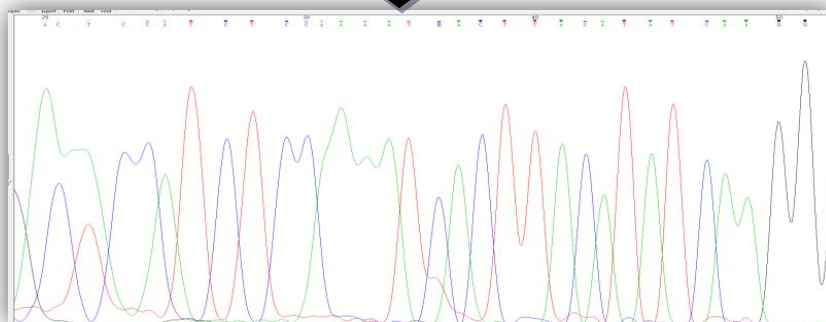


Fig. 7. Secuencia parcial de DNA de los exones 4, 9 y 11 del gen *AKR1C2*.

## Discusión

Los andrógenos juegan un papel esencial en el desarrollo sexual masculino durante la vida fetal. En particular, la DHT es el andrógeno con mayor potencia biológica y es indispensable para la masculinización de los genitales externos desde el periodo fetal hasta la maduración sexual durante la pubertad (Matsumoto y Bremner, 2011). La DHT es sintetizada a partir de T en tejidos blanco como la próstata o la uretra (Hughes, 2006). La síntesis de DHT utilizando como precursor T ocurre a través de la llamada vía clásica. Sin embargo, estudios recientes han reportado una posible vía alterna para la síntesis de DHT sin utilizar T como precursor y demuestran una posible participación en el desarrollo sexual masculino. Esto se basa principalmente en la identificación de mutaciones en el gen *AKR1C2* en cuatro individuos 46,XY con DSD (Flück et al., 2011).

El gen *AKR1C2* codifica para una enzima con actividad de  $3\alpha$ -HSD que regula los pasos críticos en la vía alterna (Fig. 2) (Flück et al., 2011). Estudios *in vitro* han indicado que *AKR1C2* puede convertir androstandiol a DHT (Penning et al., 2000). Asimismo, el gen *HSD17B6* codifica para una enzima con función oxidativa necesaria para la conversión de  $3\alpha$ -diol a DHT y que también está presente en la síntesis alterna de DHT. Estos datos pueden sugerir que la actividad enzimática de *AKR1C2* y *HSD17B6* es crítica para el desarrollo sexual masculino durante el período fetal y que las mutaciones en el gen *AKR1C2* y *HSD17B6* podrían generar DSD 46,XY debido a la reducción de andrógenos provenientes de la vía alterna.

A la fecha no existen reportes sobre el estudio de los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en individuos DSD 46,XY asociado a hipospadias, por lo que en el presente estudio se realizó el tamizaje molecular de la región codante de los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* en individuos con hipospadias.

En este estudio se examinaron 30 individuos con hipospadias y 50 individuos control. Los pacientes analizados no presentaron mutaciones erróneas en los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* que afectaran la expresión fenotípica. Sin embargo se localizaron posibles variantes polimórficas o alélicas en el gen *AKR1C2*. La variación en la secuencia del gen se pudo observar entre individuos control e individuos con DSD 46,XY asociados a hipospadias. En genética de poblaciones para considerar un verdadero polimorfismo, la variación en la secuencia génica debe aparecer con una frecuencia mínima de un 1% (Brookes, 1999). Actualmente, se han catalogado más de 9 millones de variantes en la secuencia de DNA. Se ha reportado que los polimorfismos se presentan uno cada 200 pares de bases en el genoma humano. Basados en ello, se esperaría que existieran aproximadamente 6 millones de polimorfismos en el genoma humano, muchos de los cuales ya han sido descritos en las bases de datos. En este estudio la variante alélica o polimórfica Ala52Ala aún no ha sido catalogada en la literatura. Otro tipo de polimorfismo son los llamados silenciosos, como el His222His, los cuales no alteran la conformación de la proteína; sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún mecanismo aún desconocido (Flück et al., 2011).

Existen variaciones alelo-funcionales que pueden originar enfermedades o susceptibilidad a la misma. Estas variaciones pueden estar localizadas en la región promotora de un gen, ya sea influenciando la actividad transcripcional del gen (regulando la unión de factores transcripcionales), en intrones (regulando la estabilidad de la proteína), en sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones o en regiones intragénicas (Wang et al., 2005). En este caso particular la variante intrónica [26200a>g, (10%)] no modificó la expresión de la proteína.

A pesar de presentar en este trabajo un número reducido de casos, las mutaciones en los genes *AKR1C2* y *HSD17B6* parecen no ser una causa frecuente de DSD; no obstante esto, no se descarta la posibilidad que otros genes *AKR* puedan estar involucrados en la diferenciación sexual masculina. Un posible gen candidato puede ser el *AKR1C4*, el cual presenta acción reductiva primordialmente y oxidativa en baja dirección preferencial (Penning et al., 2000; Flück et al., 2011).

Asimismo, los datos obtenidos sugieren que el gen *AKR1C2* codifica para una proteína altamente polimórfica. El que una proteína presente un alto porcentaje de polimorfismo nos podría indicar varios puntos de discusión al respecto. Uno de ellos es que el polimorfismo pueda ser explicado como un mecanismo de biodiversidad genética el cual responde frecuentemente a la necesidad de adaptación a un medio ambiente determinado (Jez y Penning, 2001).

Las aplicaciones sobre el estudio de los polimorfismos son múltiples y de gran utilidad para explicar el origen de las poblaciones, de esta manera poder reconstruir

parte de la historia evolutiva. Por otra parte, tienen gran aplicación en campos como la medicina forense, en el estudio de las enfermedades multigénicas mediante los ensayos de ligamiento o escaneo genómico y estudios de asociación genética (Isaksson et al., 2000).



## Conclusiones

Los pacientes DSD 46,XY con hipospadias analizados en este estudio presentaron variantes polimórficas sin expresión fenotípica. Aunque el número de casos aquí presentados es limitado, los datos permiten concluir que las mutaciones identificadas y determinadas resultaron ser inactivantes en *AKR1C2* y *HSD17B6* por lo que parecen no ser una causa frecuente de hipospadias, lo cual no descarta la posibilidad que otros genes AKR/HSD presentes en la rutas metabólicas para la biosíntesis de andrógenos estén involucrados en la patogénesis de este defecto congénito.

## Referencias

- ❖ Aaronson I. (2011). Terminology for disorders of sex development: clarity or confusion. *J Urol* 185: 388-389.
- ❖ Adamovic T, Thai HT, Lieden A, Nordenskjold A. (2013). Association of a tagging single nucleotide polymorphism in the androgen receptor gene region with susceptibility to severe hypospadias in a caucasian population. *Sex Dev* 7: 173-179.
- ❖ Allard S, Adin P, Gonedard L, di Clemente N, Josso N, Orgebin-Crist M, ves Picard J, Xavier F. (2000). Molecular mechanisms of hormone mediated Müllerian duct regression: involvement of b-catenin. *Develop* 127: 3349-3360.
- ❖ Allen L. (2009). Disorders of sexual development. *Obstet Gynecol Clin North Am* 36: 25-45.
- ❖ Aranda A, Pascual A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81: 1269-1304.
- ❖ Auchus RJ. (2004). The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab* 15: 432-438.
- ❖ Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. (1998). Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. *J Biol Chem* 273: 3158–3165.
- ❖ Baarends W, van Helmond M, Post M, van der Schoot P, Hoogerbrugge J, de Winter J, Uilenbroek J, Karels B, Wilming L, Meijers J, Themmen A, Grootegoed A. (1994). A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the müllerian duct. *Develop* 120: 189-197.
- ❖ Balkan M, Akbas H, Isi H, Oral D, Turkyilmaz A, Kalkanli S, Simsek S, Fidanboy M, Alp MN, Gedik A, Budak T. (2010). Cytogenetic analysis of 4216 patients referred for suspected chromosomal abnormalities in Southeast Turkey. *Genet Mol Res* 11: 1094-1103.
- ❖ Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM, Volle DH. (2013). Bile acids: from digestion to cancers. *Biochimie* 95: 504-517.
- ❖ Barthold JS. (2011). Disorders of sex differentiation: a pediatric urologist's perspective of new terminology and recommendations. *J Urol* 185: 393-400.
- ❖ Biason-Lauber A, Miller WL, Amit V, Pandey B, Flück C. (2013). Of marsupials and men: “Backdoor” dihydrotestosterone synthesis in male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 371: 124-132.
- ❖ Biswas MG, Russell DW. (1997). Expression cloning and characterization of oxidative 17-beta-and 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *J Biol Chem* 272: 15959-15966.

- ❖ Boehmer A, Brinkmann A, Sandkuijl I, Halley D, Niermeijer M, Andersson S, de Jong F, Kayserili H, de Vroede M, Otten B, Rouwe C, Mendonca B, de Rodrigues C, Bode H, de Ruiten P, Delemarre-Van de Waal H, Drop S. (1999). 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase-3 deficiency: diagnosis, phenotypic variability, population genetics, and worldwide distribution of ancient and de novo mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4713-4721.
- ❖ Bouty A, Ayers KL, Pask A, Heloury Y, Sinclair AH. (2015). The genetic and environmental factors underlying hipospadias. *Sex Dev* 9: 239-259.
- ❖ Brookes AJ. (1999). The essence of SNPs. *Gene* 234: 177-186
- ❖ Butler CM, Shaw G, Renfree MB. (1999). Development of the penis and clitoris in the tammar wallaby. *Anat Embryol* 199: 451-457.
- ❖ Chávez B, Ramos L, Gómez R, Vilchis F. (2014). 46,XY disorder of sexual development resulting from a novel monoallelic mutation (p.Ser31Phe) in the steroid 5 $\alpha$ -reductase type-2 (SRD5A2) gene. *Mol Genet Genomic Med* 2: 292-296.
- ❖ Cheon CK. (2010). Practical approach to steroid 5alpha-reductase type 2 deficiency. *Eur J Pediatr* 170: 1-8.
- ❖ Choi JH, Kim GH, Seo EJ, Kim KS, Kim SH, Yoo HW. (2008). Molecular analysis of the AR and SRD5A2 genes in patients with 46, XY disorders of sex development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 21: 545-553.
- ❖ Committee on Genetics, Section on Endocrinology and Section on Urology. (2000). Evaluation of the newborn with developmental anomalies of the external genitalia. *Pediatrics* 106: 138-142.
- ❖ Couture JF, De Jésus-Tran KP, Roy AM, Cantin L, Côté PL, Legrand P, Luu-The V, Labrie F, Breton R. (2005). Comparison of crystal structures of human type 3 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase reveals an "induced-fit" mechanism and a conserved basic motif involved in the binding of androgen. *Prot Scien* 14: 1485-1497.
- ❖ Damian D, Paulo S. (2007). Disorder of sexual development-still a big challenge!. *J Pediatr Endocrinol Metab* 20: 749-750.
- ❖ Donahoe P, Cate R, MacLaughlin D, Epstein J, Fuller A, Takahashi M, Coughlin J, Ninfa E, Taylor L. (1987). Müllerian inhibiting substance: gene structure and mechanism of action of a fetal regressor. *Recent Prog Horm Res* 43: 431-467.
- ❖ Dreger AD, Chase C, Sausa A, Gruppasa A, Frader J. (2005). Changing the nomenclature/taxonomy for intersex: a scientific and clinical rationale. *J Pediatr Endocrinol Metab* 18: 729-733.

- ❖ Dufort I, Labrie F, Luu-The V. (2001). Human types 1 and 3 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases: differential lability and tissue distribution. *Clin Endocrinol Metab* 86: 841-846.
- ❖ Fawzy F, Hussein A, Mahmoud M, Mahmoud A, Khairy H. (2015). Cryptorchidism and fertility. *Clin Med Insights Reprod Health* 9: 39-43.
- ❖ Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ, Bignon-Lauber A. (2011). Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet* 89: 201-218.
- ❖ Flück CE, Miller WL, Auchus RJ. (2003). The 17,20-lyase activity of cytochrome P450c17 from human fetal testis favors the  $\Delta 5$  steroidogenic pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3762-3766.
- ❖ Fukami M, Homma K, Hasegawa T, Ogata T. (2013). Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: Implications for normal and abnormal human sex development. *Dev dyn* 242: 320-329.
- ❖ Galani A, Kitsiou-Tzeli S, Sofokleous C, Kanavakis E, Kalpini-Mavrou A. (2008). Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects. *Hormones* 3: 217-229.
- ❖ Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S. (1994). Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7: 34-39.
- ❖ Gobinet J, Poujol N, Sultan Ch. (2002). Molecular action of androgens. *Mol Cell Endocrinol* 198: 15-24.
- ❖ Gönül Öçal. (2011). Current concepts in Disorders of Sexual Development. *J Clin Res Ped Endo* 3: 105-114.
- ❖ Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F. (2007). The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation and transactivation of the androgen receptor. *Cancer Res* 9: 4514-4523.
- ❖ Hardoy MC, Serra M, Carta MG, Contu P, Pisu MG, Biggio G. (2006). Increased neuroactive steroid concentrations in women with bipolar disorder or major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 26: 379-384.
- ❖ Heinlein CA, Chang C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23: 175-200.
- ❖ Houk CP, Lee PA. (2008). Consensus statement on terminology and management: Disorders of sex development. *Sex Dev* 2: 172-180.
- ❖ Hrabovsky Z, Huston J. (2002). Androgen imprinting of the brain in animal models and humans with intersex disorders: review and recommendations. *J Urol* 168: 2142-2148.

- ❖ Huang X, Luu-The V. (2000). Molecular characterization of a first human 3(alpha-->beta)-hydroxysteroid epimerase. *J Biol Chem* 275: 29452-29457.
- ❖ Huang X, Luu-The V. (2001). Gene structure, chromosomal localization and analysis of 3 ketosteroid reductase activity of the human 3(alpha-->beta)-hydroxysteroid epimerase. *Biochim Biophys Acta* 1520: 124-130.
- ❖ Hughes IA, Deeb A. (2006). Androgen resistance. *Best Pract and Res* 20: 577-598.
- ❖ Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *J Pediatr Urol* 2: 148-162.
- ❖ Huhtaniemi I. (1994). Fetal testis—a very special endocrine organ. *Eur J Endocrinol* 130: 25-31.
- ❖ Imperato-McGinley J, Zhu Y. (2002). Androgens and male physiology the syndrome of 5alpha-reductase-2 deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 30: 51-59.
- ❖ Isaksson A, Landegren U, Syvänen A, Bork P, Stein C, Ortigao F, Brookes AJ. (2000). Discovery, scoring and utilization of human single nucleotide polymorphisms: a multidisciplinary problem. *Eur J Hum Genet* 8: 154-156.
- ❖ Jez J, Penning T. (2001). The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact* 130-132: 499-525.
- ❖ Josso N, Boussin L, Knebelmann B, Nihoul-Fekete C, Picard J-Y. (1991). Anti müllerian hormone and intersex states. *Trends Endocrinol Metab* 2: 227-233.
- ❖ Jost A. (1970). Hormonal factors in the sex differentiation of the mammalian foetus [and discussion]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 259: 119-130.
- ❖ Khandelwal A, Agarwal A, Jiloha RC. (2010). A 47,XXY female with gender identity disorder. *Arch Sex Behav* 39: 1021-1023.
- ❖ Khanna M, Qin K, Klisak I, Belkin S, Sparkes R, Cheng K. (1995). Localization of multiple human dihydrodiol dehydrogenase (DDH1 and DDH2) and chlordecone reductase (CHDR) genes in chromosome 10 by the polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 25: 588-590.
- ❖ Koopman P, Gubbay J, Vivain N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nat* 351: 117-121.
- ❖ Krishnan S, Wisniewski AB. (2015). Ambiguous Genitalia in the Newborn. In: *Endotext* [Internet] De Groot LJ; et al., editors. South Dartmouth (MA): MD Text.com, Inc.; 2000.
- ❖ Lane A, Donahue P. (1998). New insights into Müllerian inhibiting substance and its mechanism of action. *J Endocrinol* 158: 1-6.
- ❖ Lanišnik Rižner T. (2009). Estrogen metabolism and action in endometriosis. *Mol Cell Endocrinol* 307: 8-18.

- ❖ Lee M, Donahoe P. (1993). Müllerian inhibiting substance: A gonadal hormone with multiple functions. *End Rev* 14: 152-164.
- ❖ Lee PA, Houk CP, Ahmet F, Hughes IA and in collaboration with participants in the international consensus conference on intersex organized by the Lawson Wilkinns Pediatric Endocrine Society and the European Society for Pediatric Endocrinology (2006). Consensus statement on management of intersex disorders. *Pediatrics* 118: 488-500.
- ❖ Leihy MW, Shaw G, Wilson JD, Renfree MB. (2001). Virilization of the urogenital sinus of the tammar wallaby is not unique to 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol. *Mol Cell Endocrinol* 181: 111-115.
- ❖ Matsumoto AM, Bremner WJ. (2011). Testicular disorders. In: Williams textbook of endocrinology. Melmed S, et al; editors. 12th ed. Philadelphia: Saunders. 688-777.
- ❖ McPhaul MJ, Griffin JE. (1999). Male pseudohermaphroditism caused by mutations of the human androgen receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3435–3441.
- ❖ McPhaul MJ, Marcelli M, Zoppi S, Griffin JE, Wilson JD. (1993). Spectrum of mutations in the androgen receptor gene that causes androgen resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 17-23.
- ❖ Mendonca B, Costa E, Belgorosky A, Rivarola M, Domenice S. (2010). 46,XY DSD due to impaired androgen production. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab* 24: 243-262.
- ❖ Miller WL, Auchus RJ. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev* 32: 81-151.
- ❖ Nishi MY, Costa EM, Oliveira SB, Mendonca BB, Domenice S. (2011). The role of SRY mutations in the etiology of gonadal dysgenesis in patients with 45,X/46,XY disorder of sex development and variants. *Horm Res Paediatr* 75: 26-31.
- ❖ Oliveira RM, Verreschi IT, Lipay MV, Eca LP, Guedes AD, Bianco B. (2009). Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. *Sao Paulo Med J* 127: 373-378.
- ❖ Parma P, Radi O, Vidal V, Chaboissier MC, Dellambra E, Valentini S, Guerra L, Schedl A, Camerino G. (2006). R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. *Nat Genet* 38: 1304-1309.
- ❖ Penning TM. (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 18: 281-305.
- ❖ Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K. (2000). Human 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1–AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily : functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351: 67-77.

- ❖ Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 116: 585-586.
- ❖ Schaufele F, Carbonell X, Guerbodot M, Borngraeber S, Chapman M, Ma A, Miner J, Diamond M. (2005). The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9802-9807.
- ❖ Shaw G, Renfree M, Leihy M, Shackleton C, Roitman E, Wilson J. (2000). Prostate formation in a marsupial is mediated by the testicular androgen 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12256-12259.
- ❖ Siiteri P, Wilson J. (1974). Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 113-125.
- ❖ Siklar Z, Berberoglu M, Adiyaman P, Salih M, Tukun A, Cetinkaya E, Aycan Z, Evliyaoglu O, Ergur AT, Ocal G. (2007). Disorders of gonadal development: a broad clinical, cytogenetic and histopathologic spectrum. *Pediatr Endocrinol Rev* 4: 210-217.
- ❖ Steiner AZ, Chang L, Ji Q, Ookhtens M, Stolz A, Paulson RJ, Stanczyk F. (2008). 3-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase type III deficiency: a novel mechanism for hirsutism. *J Clin Endocr Metab* 93: 1298-1303.
- ❖ Sultan C, Paris F, Terouanne B, Balaguer P, Georget V, Poujol N, Jeandel C, Lumbroso S, Nicolas J. (2001). Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Hum Reprod Update* 7: 314-322.
- ❖ Sundaram SS, Bove KE, Lovell MA, Sokol RJ. (2008). Mechanisms of disease: inborn errors of bile acid synthesis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5: 456-468.
- ❖ Thigpen A, Davis D, Milatovich A, Mendonca B, Imperato-McGinley J, Griffin J, Francke U, Wilson J, Russell D. (1992). Molecular genetics of steroid 5 alpha reductase 2 deficiency. *J Clin Invest* 90: 799-809.
- ❖ Thigpen A, Silver R, Guileyardo J, Casey M, McConnell J, Russell D. (1993). Tissue distribution and ontogeny of steroid 5a-reductase isozyme expression. *J Clin Invest* 92: 903-910.
- ❖ Ungewitte E, Yao H. (2013). How to Make a Gonad: Cellular Mechanisms Governing Formation of the Testes and Ovaries. *Sex Dev* 7: 7-20.
- ❖ Vainio S, Heikkil AM, Kispert A, Chin N, McMohon AP. (1999). Female development in mammals is regulated by WNT4 signalling. *Nat* 4: 405-409.
- ❖ van der Sluis TM, Meuleman EJ, van Moorselaar RJ, Bui HN, Blankenstein MA, Heijboer AC, Vis AN. (2012). Intraprostatic testosterone and dihydrotestosterone. Part II: concentrations after androgen hormonal manipulation in men with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *BJU Int* 109: 183-188.



- ❖ Vilchis F, Ramos L, Kofman-Alfaro S, Zenteno J, Méndez J, Chávez B. (2003). Extreme androgen resistance in a kindred with a novel insertion/deletion mutation in exon 5 of the androgen receptor gene. *J Hum Genet* 48: 346-351.
- ❖ Vilchis F, Ramos L, Mendez J P, Benavides S, Canto P, Chávez B. (2010). Molecular analysis of the SRD5A2 in 46, XY subjects with incomplete virilization: the P212R substitution of the steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients. *J Androl* 31: 358-364.
- ❖ Vilchis F, Valdez E, Ramos L, García R, Gómez R, Chávez B. (2008). Novel compound heterozygous mutations in the SRD5A2 gene from 46,XY infants with ambiguous external genitalia. *J Hum Genet* 53: 401-406.
- ❖ Voutilainen R. (1992). Differentiation of the fetal gonad. *Horm Res* 38: 66-71.
- ❖ Wang X, Tomso DJ, Liu X, Bell D. (2005). Single nucleotide polymorphism in transcriptional regulatory regions and expression of environmentally responsive genes. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 84-90.
- ❖ Wijchers PJ, Yandim C, Panousopoulou E, Ahmad M, Harker N, Saveliev A, Burgoyne PS, Festenstein R. (2010). Sexual dimorphism in mammalian autosomal gene regulation is determined not only by SRY but by sex chromosome complement as well. *Dev Cell* 19: 477-484.
- ❖ Wilson JD. (1978). Sexual differentiation. *A Rev Physiol* 40: 279-306.
- ❖ Wilson JD, Aiman J, MacDonald PC. (1980). The pathogenesis of ginecomastia. *Adv Intern Med* 25: 1-32.
- ❖ Wilson JD, George FW, Shaw G, Renfree MB. (1999). Virilization of the male pouch young of the Tammar Wallaby does not appear to be mediated by plasma testosterone or dihydrotestosterone. *Biol Reprod* 61: 471-475.
- ❖ Wilson JD, Griffin JE, Russell DW. (1993). Steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Endocr Rev* 14: 577-593.
- ❖ Wilson JD, Leihy M, Shaw G, Renfree MB. (2003). Unsolved problems in male physiology: studies in a marsupial. *Mol Cell Endocrinol* 211: 33-36.
- ❖ Wilson JD, Shaw G, Leihy ML, Renfree MB. (2002). The marsupial model for male phenotypic development. *Trends Endocrinol Metab* 13: 78-83.
- ❖ Wright F, Kirchoffer MO, Mauvais-Jarvis P. (1979). Antagonist action of dihydroprogesterone on the formation of the specific dihydrotestosterone-cytoplasmic receptor complex in rat ventral prostate. *J Steroid Biochem* 10: 419-22.